



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CENTRO DE QUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Estudio de la interacción de las proteínas NFAT, AP-1, NF-kB,
Sp1 y STAT3 y su participación en la expresión del gen de IL-10
en macrófagos**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

PRESENTA:

Q.F.B. JORGE ALFREDO CALZADA MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. LOURDES MILLÁN PÉREZ PEÑA
CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS**

ASESORA DE TESIS

**DRA. SANDRA RAQUEL REYES CARMONA
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PUEBLA, PUEBLA. DICIEMBRE 2015



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:


Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dr. Julio Roberto Reyes Leyva, Dra. Bertha Alicia León Chávez y Dra. Lilian Karem Flores Mendoza, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada "Estudio de la interacción de las proteínas NFAT, AP-1, NF-KB, Sp1 y STAT3 y su participación en la expresión del gen de IL-10 en macrófagos", que presenta el alumno Jorge Alfredo Calzada Martínez para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veinticinco días del mes de noviembre del año dos mil quince.

ATENTAMENTE



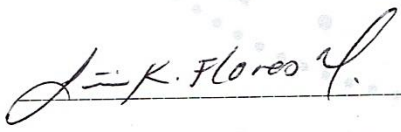
Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta



Dr. Julio Roberto Reyes Leyva



Dra. Bertha Alicia León Chávez



Dra. Lilian Karem Flores Mendoza

Agradecimientos

Para cursar el programa de Maestría en Ciencias en el área de Bioquímica y Biología Molecular del Posgrado en Ciencias Químicas de la BUAP y elaborar esta tesis se contó con beca del CONACyT
(CVU:-/Becario) 553577/293213

Para la realización del proyecto de investigación de esta tesis se recibió financiamiento por los proyectos: Redes Temáticas BUAP-CA-147, VIEP MIPP-NAT14-I y MIPP-NAT15-I

Agradecimientos

A Dios,

por acompañar todos los días a mi familia, amigos, conocidos y mi ser.

Quiero agradecer especialmente a,

mi directora de tesis la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, que me brindo su ayuda, conocimiento y todas las facilidades para realizar este proyecto, quien además estuvo pendiente todos los días de mi persona y a quien agradezco su paciencia.

A la estimada,

Dra. Sandra Raquel Reyes Carmona que compartió lecciones de trabajo que nadie regala, me enseñó y brindo la libertad de tomar decisiones, quien fue guardián y guía de mi desarrollo.

A todos los compañeros y amigos,

que formaron parte día a día de este proyecto, aportando un invaluable apoyo durante horas en el laboratorio.

Estudio de la interacción de las proteínas NFAT, AP-1, NF- κ B, Sp1 y STAT3 y su participación en la expresión del gen de IL-10 en macrófagos

RESUMEN: *La Interleucina-10 (IL-10) es una potente citocina antiinflamatoria clave para mantener la homeostasis celular. Mediante el uso de programas bioinformáticos se ha determinado en el promotor de IL-10 la presencia de un gran número de elementos de unión a factores de transcripción (TF), cuya función en la regulación de la expresión de IL-10 aún no se comprende completamente, en este trabajo estudiamos la interacción funcional de las proteínas NFAT, AP-1, NF- κ B, Sp1 y STAT3 en la región del promotor de IL-10 de -827/+38 pb mediante el ensayo ChIP y si estos factores de transcripción forman complejos multiproteicos, así como su relación con la expresión de il-10 a nivel de ARNm y proteína; para entender los mecanismos moleculares implicados en la regulación de este gen. Los resultados mostraron que la expresión de IL-10 a nivel de ARNm y proteína presenta un aumento a las 0.5 h y el pico máximo de expresión a las 8 cuando se estimulan monocitos U937 con LPS/PGE₂, se encontraron interacciones funcionales con los sitios NF- κ B (-464 pb), Sp1 (-636 pb) y NFAT/AP-1 (-656 pb), no se encontró interacción funcional de los factores de transcripción en los sitios: NFAT -181 pb y NF- κ B -1973 pb y -2049 pb del promotor de IL-10. Mediante los ensayos de IP con p50 se identificaron complejos donde participan proteínas NFAT, Sp1 y p65 que pudieran participar en la expresión de IL-10, con esta evidencia se contribuye a una mejor comprensión del mecanismo de activación de la expresión de esta interesante citocina antiinflamatoria.*

PALABRAS CLAVE: *ChIP, IP, IL-10, factores de transcripción, monocitos.*

ABSTRACT: *The interleukin-10 (IL-10) is a powerful anti-inflammatory key cytokine for the maintaining of cellular homeostasis. The use of bioinformatics programs has determined the presence of a great number of union elements to transcription factors (TF) in the IL-10 promoter, whose functions in the regulation of the IL-10 expression is not well understood. In this work we are studying the functional interaction of the proteins NFAT, AP-1, NF- κ B, Sp1 and STAT3 in the IL-10 promoter región of -827/+38 bp through the use of the ChIP assay also, we are looking forward if this transcription factors form multiprotein complexes and their relationship with IL-10 mRNA and protein expression; in order to understand the molecular mechanisms implicated in the regulation of this gene. The results showed that the IL-10 expression at mRNA and protein levels had an increase at 0.5h and the maximal peak of expression at 8h; functional interactions with the sites: NF- κ B (-464 bp), Sp1 (-636 bp) and NFAT/AP-1 (-656 bp) were evaluated trough ChIP assay and no functional interactions were found of the transcription factors in the sites NFAT(-181 bp) and NF- κ B (-1973 bp) and (-2049 bp). IP assessments with p50 identified complexes where NFAT, Sp1 and p65; these complexes could participate in the IL-10 expression. This evidence contributes to a better comprehension of the activation mechanism of the transcription of this interesting anti-inflammatory cytokine.*

KEY WORDS: *ChIP, IP1122, IL-10, transcription factor, monocytes.*

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Índice de figuras y tablas	ii
CAPÍTULO I	1
1. Introducción	2
1.1 Antecedentes generales	3
1.2 Monocitos	4
1.3 Citocinas	10
1.4 Interleucina 10 (IL-10)	11
1.5 Promotor de IL-10 y su regulación	13
1.6 Factores de transcripción implicados en la activación del promotor de IL-10	15
1.7 Vías de señalización implicadas en la expresión de IL-10	18
1.8 Lipopolisacárido y prostaglandina E2	19
2. Justificación	21
3. Planteamiento del problema	21
4. Hipótesis científica	22
5. Objetivos	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
CAPÍTULO II	23
6. Material y métodos	24
6.1 Diseño experimental	24
6.2 Cultivo celular	24

6.3	Conteo celular	25
6.4	Grupos experimentales y estimulación	25
6.5	Expresión de IL-10 por RT-PCR	26
6.5.1	Extracción de ARN total	26
6.5.2	Retrotranscripción	27
6.5.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la expresión de IL-10	27
6.6	Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	29
6.6.1	Fijación de proteínas	29
6.6.2	Fragmentación de la cromatina	29
6.6.3	Inmunoprecipitación de complejos	30
6.6.4	Extracción y purificación del ADN	30
6.6.5	Reacción en cadena de la polimerasa para el ChIP	31
6.7	Extractos proteicos totales para la expresión de IL-10	32
6.8	Determinación de la concentración de proteínas	33
6.9	Inmunoprecipitación (IP)	34
6.9.1	Lisis celular	34
6.9.2	Pre-aclarado	35
6.9.3	Inmunoprecipitación	35
6.10	Análisis de proteínas por SDS-PAGE y western blot	35
6.10.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida	35
6.10.2	Electrotransferencia de proteínas	37
6.10.3	Inmunodetección	37
6.11	Análisis <i>in silico</i>	39

CAPÍTULO III	40
7. Resultados	41
7.1 Análisis <i>in silico</i> del promotor de IL-10 de <i>Homo sapiens</i>	41
7.2 Cinética de expresión de IL-10	44
7.3 Cinéticas de expresión de los factores de transcripción	48
7.4 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	52
7.4.1 Estandarización de la fijación de proteínas al ADN y fragmentación de la cromatina	52
7.4.2 Ensayos de ChIP para los factores de transcripción: p50, NFAT y Sp1	59
7.5 Inmunoprecipitación de proteínas (IP).....	67
8. Discusión de resultados	71
CAPÍTULO IV	84
9. Conclusiones	85
10. Perspectivas	86
11. Bibliografía	87
Apéndice A Soluciones generales	96
Apéndice B Soluciones western blot	97
Apéndice C Soluciones ChIP	98
Apéndice D Soluciones IP	100

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Citocinas antiinflamatorias
AP-1	Proteína Activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
AMPc	3', 5'-adenosin mono-fosfato cíclico
ADNc	DNA complementario
C	Células control
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CRE	Elemento de respuesta al AMPc
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
CSIF	Factor inhibidor de la síntesis de citocinas
DBD	Dominio de unión al ADN
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dil.	Dilución
dNTP	Desoxirribonucleósidos trifosfato
E	Células estimuladas
E4h	Células estimuladas 4 horas
E6h	Células estimuladas 6 horas
FR-M1	Factor de reprogramación a macrófagos tipo M1
FR-M2	Factor de reprogramación a macrófagos tipo M2
FSB	Suero Fetal Bovino
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos - macrófagos
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
HPR	Peroxidasa de rábano
IFN- γ	Interferón- gamma
I κ B	Inhibidor de NF- κ B

IKK	Complejo cinasa de I κ -B
IL-	Interleucina-
IP	Inmunoprecipitación de proteínas
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisacárido
mL	mililitro
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NHR	Región de homología de NFAT
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Par de bases
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PI	Citocinas proinflamatorias
pIL-10	Promotor de interleucina 10
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RHD	Dominio de homología de la familia Rel
rpm	Revoluciones por minuto
STAT	Señal de transducción y activación de la transcripción
Sp1	Proteína de especificidad 1
TAD	Dominio de transactivación dependiente de fosforilación.
TBE	Buffer TRIS-Borato-EDTA
TCR	Receptor de células T
TF	Factores de transcripción
Th	Células T cooperadoras
Tm	Temperatura de alineamiento
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α
UV	Luz ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1. Macrófagos fenotipo M1, M2 y M3 o fenotipo de conmutación</i>	8
<i>Figura 2. Representación esquemática del promotor del gen de IL-10</i>	15
<i>Figura 3. Diseño experimental</i>	24
<i>Figura 4. Análisis “in silico” del promotor de IL-10</i>	42
<i>Figura 5. Cobertura de sitios del análisis “in silico” para TF en el promotor de IL-10</i>	44
<i>Figura 6. RT-PCR para IL-10 y β-actina</i>	45
<i>Figura 7. Nivel de transcripción de IL-10 en monocitos U937 control y estimulados</i>	46
<i>Figura 8. Expresión del ARNm de IL-10 en monocitos U937 control y estimulados</i>	47
<i>Figura 9. Expresión de IL-10 en monocitos U937 control y estimulados con LPS/PGE₂</i>	48
<i>Figura 10. Cinéticas de expresión de NF-κB en monocitos U937</i>	49
<i>Figura 11. Cinética de expresión de AP-1 (c-Fos) en monocitos U937</i>	50
<i>Figura 12. Cinéticas de expresión de NFATc1 en monocitos U937.</i>	50
<i>Figura 13. Cinéticas de expresión de Sp1 en monocitos U937.</i>	51
<i>Figura 14. Western blot de β-actina</i>	51
<i>Figura 15. Fijación de proteínas y fragmentación de la cromatina de monocitos U937</i>	54
<i>Figura 16. Fijación de proteínas con formaldehído al 0.5 % y fragmentación de la cromatina.</i>	55
<i>Figura 17. Fragmentación de la cromatina por sonicación</i>	57
<i>Figura 18. Fragmentación de la cromatina por sonicación</i>	58
<i>Figura 19. Sonicación de la cromatina de monocitos control y estimulados</i>	59
<i>Figura 20. ChIP para NF-κB (p50)</i>	61
<i>Figura 21. ChIP para NF-κB (p50), ChIP para Sp1 y ChIP para NFAT</i>	62
<i>Figura 22. ChIP para p50 y NFAT</i>	63
<i>Figura 23. ChIP para NF-κB (p50) de la región distal del pIL-10</i>	64
<i>Figura 24. ChIP-p50 de monocitos U937 control y estimulados con LPS</i>	65

<i>Figura 25. ChIP-NFAT</i>	66
<i>Figura 26. ChIP-NFAT</i>	67
<i>Figura 27. IP de NF-κB (p50) de monocitos U937 control y estimulados</i>	68
<i>Figura 28. Membrana PVDF empleada en el western blot de la IP para p50</i>	69
<i>Figura 29. IP para los factores de transcripción p50, Sp1 y NFAT</i>	70
<i>Tabla 1. Iniciadores para el análisis de expresión de IL-10 por RT-PCR.</i>	28
<i>Tabla 2. Iniciadores para el análisis de regiones del pIL-10 por PCR de punto final</i>	32
<i>Tabla 3. Rango efectivo de separación de proteínas en geles SDS-Poliacrilamida</i>	36
<i>Tabla 4. Especificaciones generales de los anticuerpos</i>	38

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

A mediados del siglo XX se descubrieron eventos moleculares en la célula; la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN), la manera en que la información genética era transmitida a las siguientes generaciones y cómo se relacionaba esta información contenida en el ADN de un alfabeto genético de cuatro nucleótidos al alfabeto de las proteínas constituido de 20 aminoácidos, necesarias para llevar a cabo procesos celulares, otorgando una capacidad de respuesta a cambios de: la osmolaridad, la temperatura, el pH, las condiciones redox, la radiación, el estrés mecánico, la disponibilidad de nutrientes, los factores de crecimiento, las citocinas, etc. Todos estos cambios controlan la función celular, la migración, la proliferación, la diferenciación y hasta la muerte celular (Chang *et al.* 2001; Kyriakis *et al.* 2001).

Muchas evidencias apuntaban a la expresión específica de genes ante un estímulo y se obligó a cuestionar los eventos de regulación durante la activación de un gen, así como cuestionar si la transcripción de los genes está regulada por proteínas activadoras específicas de unión al ADN que se requieren para iniciar la síntesis del ARNm (Ptashne & Gann. 1997), como resultado se entendió que el medio influencia a las células en la toma de decisiones para llevar a cabo respuestas adecuadas que favorecen su adaptación y supervivencia, para esto muchas rutas de transducción de señales cooperan durante estos procesos y múltiples estudios reconocen que los factores de transcripción (TF) son activados y tienen un papel insustituible para controlar la transcripción génica en respuesta dependiente del tipo(s) de señales (Seger. *et al.* 1995). La mayoría de los factores de transcripción presentan dominios de transactivación dependientes de fosforilación (TAD); sin embargo, en algunos casos presentan dominios dependientes de fosforilación que reprimen la actividad transcripcional, otros más controlan su misma expresión mediante bucles de autorregulación positivos y negativos o controlan a otros factores de transcripción que los regulan, también se puede regular la estabilidad y degradación del factor de transcripción por su naturaleza proteica, el sistema se vuelve más complejo cuando se trata de una célula que puede diferenciarse o no, que además presenta heterogeneidad, es decir, presentar una amplia gamma de respuestas ante un mismo estímulo, originando su polarización y/o diferenciación a una subpoblación como es el caso de los macrófagos.

Las interacciones entre los factores de transcripción en general pertenecen a un grupo específico de interacciones de co-regulación, las asociaciones entre estas proteínas se clasifican según el tipo de interacción y la actividad que desarrollan: cointeracción, correulación y colocalización (Rivas *et al.* 2004).

- cointeracción corresponde a una asociación directa entre proteínas
- correulación consiste en la asociación entre proteínas que desarrollan una misma actividad biomolecular, pero que no interactúan directamente
- colocalización es la asociación entre proteínas que actúan en el mismo compartimiento celular

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

Los organismos superiores cuentan con un sistema inmune que lo protegen en respuesta a otros organismos patógenos, esta respuesta de defensa comprende barreras físicas, químicas, células de defensa, etc., y esta respuesta inmune provoca la rápida activación de citocinas proinflamatorias que inician la defensa del huésped contra la invasión de patógenos; sin embargo, el exceso de una respuesta inflamatoria da lugar a trastornos metabólicos sistémicos, como por ejemplo, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), existen células dentro de este sistema inmune que provienen de células primordiales pluripotentes a través de dos líneas principales de diferenciación: la línea linfóide y línea mielóide, esta última conduce a la formación de monocitos, macrófagos y granulocitos.

La inflamación se conoce desde antes de nuestra era, Aulo Cornelio Celso, médico romano, se refirió al “cuadrilátero de la inflamación” donde se presenta: calor, rubor, tumor y dolor, Virchow, patólogo alemán (1821-1902), adicionó la impotencia funcional y John Hunter, anatomista y cirujano escocés (1728-1793), afirmó que no era una enfermedad, sino una respuesta inespecífica que producía un efecto saludable en el organismo donde tenía lugar (Cotran *et al.* 1999). La inflamación es la respuesta del organismo al daño que desencadena una serie compleja de acontecimientos, que en lo posible cura y reconstruye el tejido dañado en

forma inmediata y continua mediante fenómenos celulares de rodamiento, adhesión, trans migración, quimiotaxis y fagocitosis (Darnell *et al.* 1993), sin embargo, ante una respuesta inflamatoria el sistema inmune en respuesta desarrolla un mecanismo antiinflamatorio paralelo que frena y regula las moléculas proinflamatorias y limita el daño al tejido para restablecer la homeostasis (Moore *et al.* 2001), lo anterior, a través de distintos mecanismos moleculares que terminan en la liberación de otras citocinas clasificadas como antiinflamatorias, las cuales tienen la capacidad de inhibir la liberación de las citocinas inflamatorias y de contrarrestar o disminuir algunas de las acciones y efectos nocivos que ellas provocan en el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

1.2 MONOCITOS

Los glóbulos blancos o leucocitos son un grupo de diversos tipos celulares, el sistema de fagocitos mononucleares representa un subgrupo de glóbulos blancos, que circulan en la sangre como monocitos y en los tejidos habitan como macrófagos (Moore *et al.* 2001). Los fagocitos mononucleares son producto de un proceso denominado monocitopoyesis que comienza con la generación de precursores mieloides en la médula ósea, el bazo e hígado fetal a partir de células pluripotenciales estimuladas con interleucina 3 (IL-3), los precursores mieloides son estimulados por el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y la interacción con el estroma de órganos hematopoyéticos da lugar a los promonoblastos (Rutherford *et al.* 1993). Los promonoblastos se diferencian a monoblastos y éstos a promonocitos que posteriormente se convertirán en monocitos que abandonaran la médula ósea entrando al torrente sanguíneo, se dirigirán a los diferentes tejidos por ayuda de los quimioatrayentes, en los tejidos los monocitos se especializan y diferencian en macrófagos residentes con un fenotipo determinado por el microambiente tisular, la matriz extracelular (MEC), los productos de secreción y las moléculas de superficie de las células vecinas. Esta especialización contribuye al desarrollo de su heterogeneidad, la cual se ha definido como la propiedad de los macrófagos de expresar amplios rangos de fenotipos morfológicos y funcionales con respuesta variable ante el estímulo (Turpin *et al.* 1993). Líneas heterogéneas de subconjuntos definidos de monocitos y macrófagos no han

sido identificados, por la plasticidad y versatilidad de respuestas a la exposición de señales presentes en el microambiente de estas células (Stein *et al.* 1992). Aunque la mayoría de los macrófagos presentes en los tejidos derivan de los monocitos circulantes, existen evidencias que indican que pueden proliferar localmente en estado basal o en respuesta a daños específicos del tejido (Gordon & Taylor., 2005).

La activación de los macrófagos fue descrita como un “estado alterado” donde se presentaba un incremento en la actividad bactericida de los macrófagos inmunizados e infectados con bacterias facultativas intracelulares, su estado fue definido como no específico, dependiente de una respuesta inmune adaptativa donde los linfocitos sensibilizados producían linfocinas, que modificaban la función de los macrófagos (Mackness *et al.* 1962; North *et al.* 1978). Los macrófagos activados presentaban una apariencia particular durante la respuesta inmune, que indicaba el perfeccionamiento de la capacidad fagocítica y digestiva, caracterizado por: cambios de la membrana plasmática y aumento del contenido de colesterol (Kondo *et al.* 1977), capacidad de adhesión al vidrio o plástico, incremento de la fagocitosis y la pinocitosis (Cohn *et al.* 1978), actualmente se considera a los macrófagos como una de las células más versátiles del cuerpo con respecto a su capacidad de migrar, cambiar de forma y de secretar factores de crecimiento y citocinas (Burke & Lewis. 2002; Huysentruyt *et al.* 2008), además tienen la capacidad de reconocer y destruir células neoplásicas (Fink *et al.* 1977).

Las herramientas moleculares actuales basan su perfil en moléculas de membrana que constituyen marcadores de diferenciación o activación de las poblaciones de monocitos o macrófagos, por ejemplo: CD33 presente en la línea progenitora mieloide, CD14, CD32 y CD35 en monocitos no activados, CD26 y CD23 en macrófagos, pero CD29 y CD143 sólo están presentes en macrófagos activados; sin embargo, sigue sin encontrarse un marcador común para todas las poblaciones de monocitos y macrófagos. Otros estudios de caracterización *in vitro* determinaron diferencias de marcadores entre subpoblaciones de macrófagos (Akagama *et al.* 2002; Verreck *et al.* 2006; Amaya *et al.* 2009), como se describe a continuación:

Macrófagos proinflamatorios; (CD11b+, CD11c+, CD14 -, CD71+, CD163 -, CD209 -, CD64+, CD32+, CD16 -)

Macrófagos antiinflamatorios (CD11b+, CD11c+, CD14+, CD71 -, CD163+, CD209+, CD64+, CD32+, CD16 -)

También se sugiere que muchos tipos de cánceres humanos de pulmón, mama, colon, riñón, etc., contienen células neoplásicas con propiedades de los macrófagos (Huysentruyt & Seyfried. 2010) y actualmente no está claro si algún subtipo de macrófagos es parte de la población de células malignas de cánceres metastásicos como el del sistema nervioso central, las evidencias apuntan a que posterior a un daño mitocondrial surgen híbridos de fusión entre las células madre neoplásicas y los macrófagos de la microglia (Leanne *et al.* 2011), sin embargo, no está determinado como influyen en la progresión tumoral la presencia de subpoblaciones de macrófagos asociados a tumores (TAM).

Comparando la nomenclatura de las células T, las subpoblaciones de macrófagos se han clasificado como M1, para designar a los macrófagos activados clásicamente y cuyos estímulos típicos son IFN- γ y LPS, y macrófagos tipo M2 o activados alternativamente, que a su vez han tenido que ser clasificados en subgrupos debido a la gran diversidad de estímulos que provocan una activación “no clásica”: M2a después de la exposición a IL-4 o IL-13; M2b por exposición a inmunocomplejos [IC] en combinación con IL-1 β o LPS y M2c por tratamiento con IL-10, TGF- β o glucocorticoides (Martínez *et al.* 2008). Los macrófagos M1 tienen propiedades microbicidas y promueven las respuestas Th1 dependientes de IL-12 p70, mientras que los M2 están asociados a respuestas de tipo Th2 con un papel en la resolución de la inflamación gracias a la alta capacidad fagocítica y a la síntesis de factores tróficos, acompañados por la reducción de la secreción de citocinas proinflamatorias (Varin & Gordon. 2009).

Algunos autores han propuesto otra clasificación de macrófagos activados de acuerdo con sus funciones de; defensa del organismo, reparación de heridas y regulación inmunitaria. Además de estos tres grupos es posible definir numerosos estados funcionales intermedios, lo

que indica que existe un amplio rango de estados de activación de los macrófagos (Mosser & Edwards. 2008). Los macrófagos M2 muestran propiedades funcionales distintas a los que se integran en el infiltrado de leucocitos de tumores y reguladores de la respuesta inflamatoria estas evidencias sugieren que son insustituibles elementos reguladores de los circuitos inflamatorios (Mantovani *et al.* 1992; Balkwill *et al.* 2001).

Múltiples publicaciones han referido el espectro de la activación del macrófago como dos extremos pro- y anti- inflamatorio y particularmente el uso del término de macrófago tipo I (M1) o macrófago tipo II (M2), esta nomenclatura tiene la ventaja de reflejar la dicotomía que presentan las células como en los linfocitos Th1/Th2, sin embargo, realmente está extendida a otras poblaciones de células como por ejemplo; linfocitos T citotóxicos (Tc1/Tc2), Natural Killer (NK1/NK2) y células endoteliales, que describen la producción diferencial de citocinas característica del tipo celular en estadios polarizados (Mantovani *et al.* 2004).

Se estableció que existe reprogramación de los macrófagos durante una enfermedad y esta se asocia con una alteración inadecuada de un fenotipo específico, por ejemplo; la inadecuada adquisición del fenotipo M2 conlleva a la producción excesiva de citocinas antiinflamatorias que disminuyen las funciones bactericidas y antivirales de la respuesta inmune provocando reacciones alérgicas y asmáticas (Hagemann *et al.* 2008; Duluc *et al.* 2009) y que favorecen el crecimiento del tumor (Chanmee *et al.* 2014). En general, el cambio de fenotipo M1 a M2 protege al organismo de la inflamación excesiva, mientras que el cambio de M2 al fenotipo M1 protege de las reacciones alérgicas y asmáticas (Hagemann *et al.* 2008; Duluc *et al.* 2009). Actualmente se sabe que el fenotipo M1 puede ser reprogramado para el fenotipo M2 y viceversa bajo influencia de estímulos; sin embargo, se ha demostrado que el fenotipo M1 se puede transformar en M2 en condiciones de inflamación en tejidos (Malyshev I. & Malyshey Y. 2015).

La diversidad de macrófagos engloba otro fenotipo más complejo, donde M1 en respuesta al factor de reprogramación M1 (FR-M1) induce un aumento de citocinas antiinflamatorias (M2) produciendo el fenotipo M1/2 y por el contrario, M2 en respuesta al factor de

reprogramación M2 (FR-M2), induce un aumento en la producción de las citocinas proinflamatorias (M1) originando el fenotipo M2/1, estos fenotipos son referidos como macrófagos tipo M3 o el fenotipo de conmutación (Figura 1) (Malyshev I. & Malyshey Y. 2015).

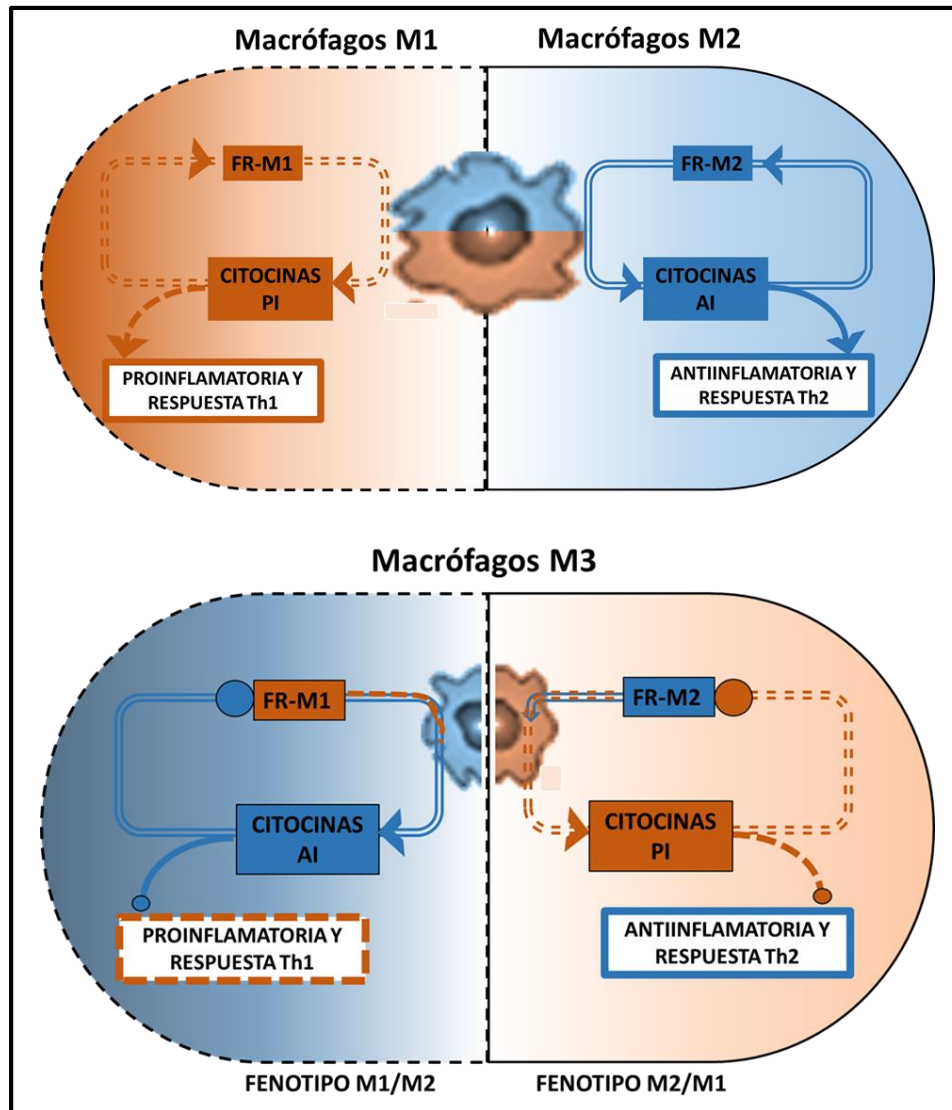


Figura 1. Macrófagos fenotipo M1, M2 y M3 o fenotipo de conmutación. (Superior) El fenotipo de macrófagos M1 induce la producción de citocinas proinflamatorias (PI) en respuesta a un estímulo o factor de reprogramación M1 (FR-M1); el fenotipo de macrófagos M2 induce la producción de citocinas antiinflamatorias (AI) en respuesta a un estímulo o factor de reprogramación M2 (FR-M2); (Inferior) el fenotipo M3 regula la producción de citocinas AI en respuesta al estímulo FR-M1 dando como resultado la reprogramación al fenotipo M2 al fenotipo M1/M2 y, por el contrario, la producción de citocinas PI en respuesta a un estímulo FR-M2 da como resultado la reprogramación a M1 fenotipo M2/M1. Tomado y modificado de (Malyshev I. & Malyshey Y. 2015).

Tanto la diferenciación de macrófagos y polarización pueden dar lugar al comportamiento de fenotipos similares, así GM-CSF puede inducir macrófagos M1, mientras que M-CSF induce macrófagos M2. Una diferencia importante entre la diferenciación y la polarización es el hecho de que, mientras que en muchos casos la polarización puede ser un proceso reversible, la diferenciación parece ser irreversible (Porcheray *et al.* 2005).

Se considera que el estado de activación de un macrófago es el producto de la historia de su desarrollo; origen, maduración y ambiente donde se encuentra, estos factores se asocian a sus modificaciones funcionales, bioquímicas y moleculares, por lo que el fenómeno de activación es un cambio en su fenotipo. El descubrimiento de que las células T contribuían a la activación del macrófago produciendo citocinas capaces de activarlo estableció que; la calidad e intensidad de la activación del macrófago dependía de la naturaleza de la señal generada, se definieron entonces dos estados de activación, el primero de ellos, el iniciador, donde los macrófagos exhibían un aumento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH II) y la presentación antigénica, donde los macrófagos pueden controlar el crecimiento bacteriano y presentar funciones tumoricidas y que el TNF- α y los interferones tipo I son considerados como inductores de este estado. Los macrófagos en un estado iniciador pueden responder a un estímulo secundario para alcanzar un segundo estado de activación denominado completo, caracterizado por una máxima secreción de mediadores de la inflamación, que incluyen el TNF- α , PGE₂, IL-1 e IL-6. Los agentes capaces de producir la segunda señal incluyen al LPS, esteres de forbol, GM-CSF y di- y tri-péptidos de muranillo y aunque se incrementan una o varias funciones ambas señales sinergizaban para dar expresiones máximas de las mismas (Duque-correa & Rojas-López., 2007) sin embargo la activación clásica del macrófago es fuertemente descrita por la exposición al IFN- γ , TNF- α , o inductores como ligandos de los receptores tipo Toll (TLR) (complejos inmunes, LPS y señales HSP de 60 y 70 Kda) (Cella *et al.* 1999).

1.3 CITOCINAS

Se reconoce que gran parte de la comunicación celular en la respuesta inmune es por medio de las citocinas, estas son pequeñas moléculas de naturaleza proteica, secretadas en respuesta a estímulos específicos que tienen influencia en los procesos celulares, dentro de ellas se encuentran: interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral. Algunos autores consideran a las citocinas como inmunohormonas que ejercen su acción en forma autócrina o parácrina, produciendo efectos variables que comprenden la modulación de la respuesta inmune, el crecimiento celular, la diferenciación de las células, la regeneración tisular y la angiogénesis, entre otras. Durante la activación celular ocasionada en respuesta a un estímulo, se producen y se unen citocinas de forma transitoria a receptores específicos de membrana.

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular generalmente menor de 30 KDa, muchas tienen estructuras terciarias parecidas, formadas por cuatro hélices alfa, con escasos dominios en lámina beta. Aunque existen muchos tipos de células productoras de citocinas, en el sistema inmune innato se considera a los macrófagos como las células más activas en la síntesis de citocinas, mientras que en el sistema inmune específico son las células T colaboradoras (Th), ya que sus citocinas son esenciales para que se produzca la respuesta inmune, una vez activadas por el contacto con las células presentadoras de antígeno.

La producción de las citocinas suele ser breve (transitoria) y limitada al periodo de tiempo que dura el estímulo, lo cual se debe a que los correspondientes ARNm tienen una vida media corta. Cuando los ARNm son traducidos y las proteínas son liberadas al microambiente donde se encuentre la célula, las citocinas interaccionarán con receptores específicos de la membrana de células vecinas y/o en receptores de ella misma, iniciando una cascada intracelular de transducción de señales que altera el patrón de expresión génica, produciendo una respuesta biológica específica. Las citocinas pueden ejercer su acción de múltiples formas: pleiotrópica, múltiples efectos al actuar sobre las mismas células. Redundancia, varias citocinas que ejercen

el mismo efecto que otra. Sinergismo, dos o más citocinas producen un efecto que se potencia mutuamente. Antagonismo, inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos.

En general, las citocinas y los productos microbianos afectan la función de los fagocitos mononucleares, durante la respuesta inmune (RI) se induce la activación de citocinas tipo proinflamatorias, paralelamente se desarrolla un mecanismo antiinflamatorio; sin embargo, las citocinas asociadas con respuestas de tipo polarizado II (Macrófagos tipo 2, M2) son las interleucinas -4, -13 y -10, considerada por excelencia como la principal citocina capaz de regular el proceso inflamatorio es la IL-10 que induce una “activación alternativa” programada en los macrófagos (Stein *et al.* 1992; Goerdt *et al.* 1999), esta activación alternativa se genera para regular la respuesta inmune y llegar a mantener la homeostasis.

1.4 INTERLEUCINA 10 (IL-10)

La Interleucina 10 (IL-10) es una citocina antiinflamatoria, cuya deficiencia o expresión puede mejorar la respuesta inflamatoria, promover la eliminación de patógenos o conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes (O'garra *et al.* 2008), es una citocina tardía, producida después de la liberación de los mediadores proinflamatorios (Sabat *et al.* 2010). Se describió inicialmente como una citocina derivada de células Th2, la cual inhibía la síntesis de citocinas producidas por células Th1, particularmente al interferón gama (IFN- γ), por esta razón fue llamada factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF), la identificación de las fuentes celulares de IL-10 y los mecanismos moleculares que la regulan son indispensables para el manejo de la respuesta inmune (Stordeur *et al.* 1998).

Las principales fuentes de IL-10 son las células T cooperadoras, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Maloy *et al.* 2001), sin embargo, otros tipos de células efectoras inmunes son capaces de producir IL-10 bajo ciertos estímulos, como son las células B, células T citotóxicas, células NK (Natural Killer), neutrófilos y eosinófilos (Ouyang *et al.* 2011), así como células efectoras no inmunes como células epiteliales y queratinocitos (Maloy *et al.* 2001; Jung *et al.* 2004).

El descubrimiento de subpoblaciones de linfocitos T permitió establecer que, tanto las células dendríticas como los linfocitos T vírgenes son atraídos a una zona por quimiocinas que activan receptores, las células dendríticas presentan los antígenos sobre las moléculas del CMH y también expresan coestimuladores que pueden proporcionar segundas señales a los linfocitos T mediante los receptores de coestimuladores, como resultado ese linfocito T se activa, diferencia y especializa en un linfocito efector (Th), originando la aparición del paradigma Th1/Th2 que sugirió a las células Th1 como productoras de IFN- γ e IL-2 y a las células Th2 productoras de IL-4, IL-5 e IL-10 (Stordeur *et al.* 1998; Kim *et al.* 1992). La IL-10 actúa en forma de homodímero a través de un complejo de receptores transmembrana, que se compone por IL-10R1 e IL-10R2. En monocitos y macrófagos la IL-10 afecta tres funciones importantes:

- 1) La presentación del antígeno, inhibiendo la expresión de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH II) y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (De Waal Malefyt *et al.* 1991b).
- 2) La liberación de mediadores inflamatorios (citocinas antiinflamatorias) en las células diana que han sido estimuladas por algunas citocinas proinflamatorias (De Waal Malefyt *et al.* 1991a) y la síntesis de COX-2 (Niino *et al.* 1997), mientras se potencia la liberación de mediadores antiinflamatorios, como el antagonista del receptor de IL-1 β o de TNF- α (Jenkins *et al.* 1994).
- 3) El aumento de la fagocitosis de antígenos y la diferenciación de subpoblaciones de células T reguladoras.

La mayor parte de los estudios sobre la regulación de IL-10 se han realizado en modelos de ratón que utilizan la ruta de reconocimiento por receptores tipo Toll-4 (TLR4) que reconoce el lipopolisacárido. La IL-10 puede regular directamente la inmunidad innata y adaptativa limitando la activación y diferenciación de las células T en los nódulos linfáticos, suprimiendo la respuesta proinflamatoria en los tejidos, polarizando y activando macrófagos que a su vez

controlan la eliminación de los patógenos, reduciendo el daño tisular y modulando la respuesta de otras células vecinas como monocitos, macrófagos y células dendríticas (Couper *et al.* 2008).

Mediante cristalografía de rayos X se demostró que la estructura de la IL-10 humana (hIL-10) se presenta como un homodímero predominantemente, con base a su alto contenido de cadenas α - hélices se postuló que IL-10 es un miembro de una familia de citocinas helicoidales y factores de crecimiento, los cuales han sido estructuralmente caracterizados, la estructura terciaria de hIL-10 está formada por homodímeros en forma de **V** y 6 cadenas α hélices unidos mediante asas, esta estructura es similar a la del interferón $-\gamma$, así como a la IL-10 de bovino y murino (Zdanov & Schalk-Hihi., 1995).

1.5 PROMOTOR DE IL-10 Y SU REGULACIÓN

El gen de la IL-10 humana se encuentra localizado en la región “q31-q32” del cromosoma 1, consta de 5 exones y 4 intrones, la secuencia completa abarca ~7.2kb (Kim *et al.* 1992), el gen contiene varias secuencias no codificantes que controlan la transcripción y la estabilidad del ARNm. La modificación post-transcripcional de IL-10 también se ha propuesto como un mecanismo regulatorio por el gran número de elementos ricos en AU en la zona 3'UTR del ARN mensajero (Powell *et al.* 2000) o mediante micro ARN (Sharma *et al.* 2009).

La secuencia de nucleótidos del gen de la IL-10 humana tiene una homología del 73 % con la IL-10 de murinos y un 84 % con la IL-10 viral (Gesser *et al.* 1997), el descubrimiento de que el gen de la IL-10 viral no contiene intrones a diferencia de los genes humano y murino, sugiere que los genes humano y murino se originaron de un ancestro común, mientras que el gen de la IL-10 viral surgió por la modificación del gen ancestral (Gesser *et al.* 1997). La IL-10 es única entre las citocinas hematopoyéticas que tiene relación con genomas virales (Moore *et al.* 2001), dentro de la patogénesis viral, se han identificado por homología la secuencia de IL-10 en múltiples miembros de la familia *Herpesvirales* y *Poxviridae*, incluyendo citomegalovirus humano y el virus de *Epstein-Barr*, estos tipos de virus que han logrado incluir los homólogos de IL-10 buscan desallorar un entorno que limite la capacidad de respuesta del

huésped, mediante la estrategia de limitar su reconocimiento (Slobedman *et al.* 2009). Otro estudio donde se analizó el fragmento de ~4.2 Kb del promotor de IL-10 mostró regiones altamente polimórficas que se combinan para formar haplotipos asociados con una mayor o menor secreción de IL-10 (Kube *et al.* 2001).

El promotor del gen de IL-10 contiene el sitio principal de inicio de la transcripción y una caja TATA (-77pb); mediante el uso de programas informáticos se han determinado diversos posibles elementos de unión a factores de transcripción (TF), algunos de los cuales se han identificado y corroborado de forma experimental, tales como: elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), elemento transactivador E2 de respuesta al virus del papiloma, AP-1, Stat-3 (Benkhart *et al.* 2000), Sp (*specific protein*) 1 y 3 (Brightbill *et al.* 2000; Tone *et al.* 2000), c-Maf (Cao *et al.* 2005), NY-F (Lin *et al.* 2006), NF-κB (Cao *et al.* 2006; Leghmari *et al.* 2008; Gringhuis *et al.* 2009), Pbx1b (*pre-B cell leukemia transcription factor-1b*) (Chung *et al.* 2007), C/EBP (*CCAAT-enhancer binding protein*) (Brenner *et al.* 2003), NFAT (Goodridge *et al.* 2007) y CREB (Platzer *et al.* 1999; Hu *et al.* 2006). Así mismo, cambios epigenéticos dependientes de la acetilación de histonas pueden regular la accesibilidad de los factores de transcripción al promotor de IL-10 y explicar la regulación a través de factores constitutivamente activos como Sp1 y Sp3 en las células mieloides. Se ha reportado en células de linfoma de Burkitt la presencia de secuencias reguladoras positivas en la región de -1 Kb a -0.9 Kb), así como secuencias reguladoras negativas en la región -750 pb a -350 pb) para la expresión de este gen (Mori *et al.* 1997; Ma W *et al.* 2001). En la Figura 2 se muestra un esquema del análisis de sitios de unión a factores de transcripción en el promotor de IL-10 realizado anteriormente en nuestro laboratorio (Landeros, 2005), donde se muestra la presencia de múltiples sitios de unión para AP-1, CRE, NFAT, GRE, C/EBP, STAT3, LS4, Sp1 y NF-κB en una región de 3 Kb.

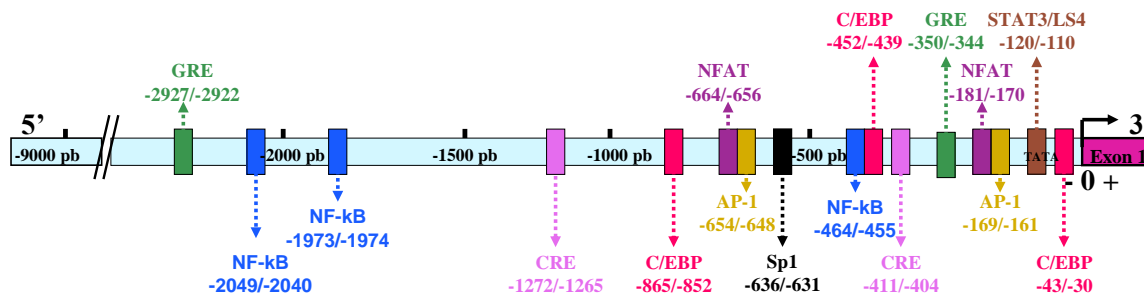


Figura 2. Representación esquemática del promotor del gen de IL-10. Se muestran diferentes sitios para la unión de factores de transcripción destacando los sitios AP-1, CRE, NFAT, GRE, C/EBP, STAT3, LS4, Sp1 y NF- κ B. Tomado de Landeros, 2005.

1.6 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DEL PROMOTOR DE IL-10

Dentro de los factores de transcripción que conciernen a este proyecto podemos describir al factor de transcripción STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción), codificado en humanos por el gen *stat3*, esta proteína es miembro de la familia STAT, que en presencia de citocinas y factores de crecimiento es fosforilada en los residuos Tyr⁷⁰⁵ y Ser⁷²⁷ por la tirosin cinasa (JAK2) asociada al receptor, formando homo o heterodímeros que se translocan al núcleo donde actúan como activadores de la transcripción en respuesta a interferón, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-5, IL-6 y factor inhibidor de leucemia (LIF) (Akira *et al.* 1994; Yuan *et al.* 1994). Se han descrito tres transcritos alternativos del gen de *stat3* que codifican para varias isoformas de la proteína. El receptor de EGF y algunos otros receptores de tirosina cinasas como el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met) fosforilan a STAT3 en respuesta a sus correspondientes ligandos, STAT3 también es blanco de las proteínas de la familia tirosina cinasas no receptoras (c-Src) (Akira *et al.* 1994). En otro estudio en macrófagos humanos primarios derivados de monocitos de sangre periférica se comparó la señalización de IL-10 e IL-6, el pretratamiento de los macrófagos con PMA o con mediadores proinflamatorios de LPS o TNF-alfa indujo la activación de STAT3, mientras que la activación de STAT3 inducida por IL-10 no se afectó (Niemand *et al.* 2003).

Los factores de transcripción NF- κ B pertenecen a una familia de proteínas relacionadas estructuralmente. En mamíferos se han descrito cinco miembros de la familia NF- κ B: RelA (p65), RelB y c-Rel, y las proteínas precursoras NF- κ B1 (p105) y NF- κ B2 (p100), las cuales se procesan para producir p50 y p52 respectivamente, estos factores de transcripción se unen como dímeros a sitios κ B de promotores y *enhancers* de una variedad de genes, para inducir o reprimir la transcripción (Pahl *et al.* 1999; Hayden & Ghosh. 2004). Se encuentran como hetero u homodímeros en el citoplasma de muchos tipos de células. Cada miembro de la familia contiene una secuencia conservada de 300 aa en la región N-terminal llamada: Dominio de homología Rel (RHD) involucrado en la unión con el ADN, la dimerización de los dominios y con la señal de localización nuclear (NLS) (May *et al.* 1998). Únicamente p65, c-Rel y RelB son producidas como proteínas activas transcripcionalmente y contienen un dominio de transactivación (TAD) el cual promueve la transcripción de genes ya que facilita el reclutamiento de coactivadores y el desplazamiento de represores (Matthews S. & Ghosh S., 2004).

Las proteínas p105 (NF- κ B1) y p100 (NF- κ B2) son producidas como moléculas precursoras, las cuales después son procesadas lo que resulta en la fosforilación de p100 y p105, que conduce a la ubiquitinación y la degradación proteosomal parcial originando moléculas más pequeñas (p52 y p50) con actividad transcripcional (May *et al.* 1998; Matthews S. & Ghosh S., 2004). En las células en reposo, los dímeros de NF- κ B están unidos a las proteínas inhibitoras de κ B (I κ B), las cuales secuestran los complejos de NF- κ B en el citoplasma. Cuando se estimulan las células, se induce la degradación de las proteínas I κ B mediante fosforilaciones por el complejo de la cinasa de I κ B (IKK), que incluye dos cinasas catalíticas activas, IKK α e IKK β y la subunidad reguladora IKK γ . Las proteínas I κ B fosforiladas son marcadas para la ubiquitinación y degradación en el proteosoma, liberando los dímeros de NF- κ B y permitiendo su translocación al núcleo (Jeong & Lee. 2011).

El factor nuclear de células T activadas “NFAT”, es un regulador central en la expresión de genes de células inmunes, en células inactivas NFAT reside en el citoplasma en forma fosforilada; en respuesta a una estimulación antigénica, NFAT es translocado al núcleo después de ser desfosforilado por la calcineurina-fosfatasa dependiente de calcio, en donde se une a

promotores específicos e induce la expresión de genes. Se han descrito varias isoformas de NFAT (1-5) que derivan de empalmes alternativos, con dos secuencias de homología presentes que comprenden el dominio de unión al DNA (DBD) y la región de homología NFAT (NHR) (Jain *et al.* 1995). El dominio DBD es altamente conservado (RAHYETEG) y se localiza entre los residuos 400 a 700 aa. La región de NHR de ~300 aa se localiza en el extremo N-terminal del dominio de unión al DNA y se define como un dominio regulador activado por la calcineurina (Lou *et al.* 1996).

La proteína activadora AP-1 fue identificada como un factor de transcripción que se une a un elemento cis-esencial del promotor de la metalotioneína II humana (hMTIIa). El sitio de unión de AP-1 fue reconocido como TRE por sus siglas de elemento de respuesta a TPA (12-O-tetradecanoylforbol 13-acetato), el cual se encuentra en varios genes virales y celulares, como la colagenasa humana, MTIIa, SV40, poliovirus e IL-2. El TPA es un potente activador de la proteína cinasa C (PKC), otros agentes que también conducen a la activación de PKC son los factores de crecimiento que inducen su expresión. La comparación de varios sitios TRE condujo a la derivación de una secuencia consenso reconocida por AP-1: 5'-TGA(G/C)TCA-3' (Lee *et al.* 1987). La unión de la proteína activadora es suficiente y necesaria para la activación transcripcional de genes dependientes de AP-1 siguiendo la vía de activación de PKC. La familia de AP-1 consta de homo y heterodímeros de las proteínas Jun (v-Jun, c-Jun, Jun B, Jun D), Fos (v-Fos, c-Fos, Fos B, Fra1, Fra2) o del factor activador de la transcripción (ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF). Los dímeros Jun-Jun y Jun-Fos se unen al elemento TRE, mientras que los dímeros Jun-ATF o ATF-ATF se unen preferentemente a CRE (5'-TGACGTCA-3') (Lee *et al.* 1987).

El factor de transcripción Sp1 regula la expresión de múltiples genes en la diferenciación y proliferación celular, apoptosis y tumorigénesis. Pertenece a la familia de los factores de transcripción Sp/KLF. Tiene 785 aa con un motivo dedo de zinc del tipo Cys₂/His₂, que le permite unirse directamente al ADN en la secuencia consenso 5'-(G/T)GGGCGG-(G/A)(G/A)(C/T)-3'. Se ha demostrado que Sp1 es capaz de interactuar con los factores de transcripción; MEF2C, MEF2D, E2F1, RELA, CEBPB, GABPA y con proteínas como las

histona deacetilasas: HDAC1, HDAC2, entre otras (Yuna *et al.* 2010), y que se organiza en multidominios, por ejemplo, diferentes autores han demostrado que la cooperación entre Sp1 y AP-1 no depende de la distancia entre sus respectivos sitios de unión al ADN (Noti *et al.* 1996; Banks *et al.* 1998), lo cual sugiere que Sp1 puede producir un cambio conformacional en el ADN que contribuye a la activación génica, donde se facilita la unión de otros factores de transcripción; además es un mediador de la señalización nuclear en respuesta a estímulos hormonales. Se ha descrito que Sp1 puede ser fosforilado y glicosilado, lo cual la habilita para formar interacciones homotípicas que derivan en complejos multiméricos; además se han reportado interacciones heterotípicas con diferentes proteínas nucleares de la transcripción, como la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y factores asociados a TBP (Jackson *et al.* 1990; Murata *et al.* 1994).

1.7 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA EXPRESIÓN DE IL-10

La IL-10 ejerce su actividad biológica en la regulación de la respuesta inflamatoria como inmunosupresor, la cual es mediada por el receptor heterodimérico (IL-10R1/IL-10R2), este complejo receptor-IL-10 activa la vía de señalización de JAK/STAT, que conduce a cambios en el perfil de expresión de los genes inmunomoduladores de citocinas y receptores que inhiben la liberación de mediadores proinflamatorios, disminuyendo la capacidad de la presentación de antígenos y la fagocitosis, además promueve la liberación de moléculas antiinflamatorias (Foey *et al.* 1998). En monocitos, la IL-10 estimula la expresión de receptores solubles del TNF (sTNFR), inhibidor natural de esta molécula y estimula la expresión del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) que inhibe competitivamente la unión de IL-1 con su receptor (Foey *et al.* 1998). La desactivación de monocitos por IL-10 involucra la inhibición de la actividad de proteínas tirosina cinasas inducidas por lipopolisacárido (LPS) y el bloqueo de la vía de señalización Ras. En monocitos de sangre periférica de humano, se ha reportado que IL-10 suprime la transcripción del gen TNF- α , inhibiendo la activación del factor de transcripción NF- κ B el cual se considera un blanco para la acción antiinflamatoria de IL-10 (Wurfel *et al.* 1995).

1.8 LIPOPOLISÁCARIDO Y PROSTAGLANDINA E2

El lipopolisacárido (LPS) es un componente de la pared de las bacterias gram negativas, consiste en un heteropolisacárido fosforilado, estructuralmente está formado por dos regiones hidrofílicas y un dominio hidrofóbico compuesto por seis cadenas de ácidos grasos que están covalentemente unidas a un lípido de la membrana externa que contiene glucosamina, el lípido A. La porción de polisacárido que se expone de la membrana externa de las bacterias ha sido dividida en dos regiones principales: una región interna o central (núcleo o core) y una porción externa denominada cadena 0 (antígeno 0 ó polisacárido 0). La región del núcleo ha sido a su vez subdividida en una región interna y una región externa. La cadena 0 constituye la porción inmunodominante de la molécula y los cambios estructurales de esta región son la base de la clasificación serológica de la familia *Enterobacteriaceae* (Davis *et al.* 1990). La estructura mínima del lipopolisacárido es activa como endotoxina y se constituye del lípido A y dos unidades de ácido 3-desoxi manooctulosónico (Kdo), este motivo es conservado entre los distintos grupos bacterianos y todas las porciones de la molécula distales a los residuos de Kdo no son estrictamente esenciales para el crecimiento y función bacteriana (Raetz *et al.* 1990). En patologías como la sepsis, el lipopolisacárido activa los sistemas de señalización y estimula diferentes tipos celulares mediante moléculas de reconocimiento como el CD14 y los receptores TLR. La molécula CD14 se encuentra asociada a la membrana (mCD14) o soluble (sCD14), la cual es liberada por monocitos, macrófagos y polimorfos nucleares; facilitando la transferencia de las lipoproteínas. Aunque se creía que se asociaba al complejo LBP-LPS, puede unirse de forma directa al LPS o mediante el proceso catalítico causado por la proteína de unión al LPS (LBP) (Wurfel *et al.* 1995; Hailman *et al.* 1994). La cascada de los TLR activa diversas vías de transducción de señales como la vía de la MAP cinasa p38 que activa a Sp1. Paralelamente el LPS ejerce su efecto sobre la vía de señalización de NF- κ B activando p50/p65, teniendo así un papel fundamental en la inducción de la producción de citocinas y enzimas como la sintasa del óxido nítrico o la ciclooxigenasa. Se sugiere que la variabilidad de estructuras y composición de la cadena "0" se desarrolló durante la evolución en especies endosimbióticas, con el fin de evadir al sistema inmune del hospedero escondiendo las unidades de lípido A y el núcleo interno, los cuales son esenciales para el crecimiento y la multiplicación bacteriana, así la

cadena “0” protegería a las bacterias contra la fagocitosis y contra la acción bactericida del huésped debido a que ocasiona una señal reguladora en el medio de la colonia bacteriana (Mayer *et al.* 1989; Bengoechea *et al.* 2004).

Las prostaglandinas se sintetizan a partir de los ácidos grasos esenciales por la acción de enzimas como ciclooxigenasas, lipooxigenasas, el citocromo P-450, peroxidasas, entre otras. La ciclooxigenasa da lugar a prostaglandinas, tromboxano A-II y prostaciclina (PGI₂); la lipooxigenasa da lugar a los ácidos HPETEs, HETE y leucotrienos; el citocromo P-450 genera HETEs y hepóxidos (EETs). La vía por la cual el ácido araquidónico se metaboliza a eicosanoides depende del tipo de tejido, la fosfolipasa A2 y de la presencia de inductores o inhibidores endógenos (Ricciotti *et al.* 2011). La prostaglandina E2 (PGE₂) participa en la regulación de la función de los linfocitos T y B, así como de los macrófagos, la migración de las células dendríticas, la diferenciación de células T cooperadores (Th1, Th2 y Th17), también contribuye a regular la expresión de las citocinas; como el TNF α en células T en diferenciación, puede suprimir la diferenciación de las células Th1 y estimular la acción antiinflamatoria en células de la inmunidad innata como neutrófilos, monocitos y células Natural Killer (NK) (Ricciotti *et al.* 2011). La prostaglandina E2 también participa en múltiples procesos fisiológicos, incluyendo los reproductivos, neuronales, metabólicos e inmunes. Se considera generalmente como una molécula proinflamatoria asociada a la producción de enrojecimiento, hinchazón y dolor (Legler *et al.* 2010). Otros estudios en animales pusieron de manifiesto que tras la inyección sistémica de LPS bacteriano o IL-1 (pirógenos exógeno y endógeno), la concentración de PGE₂ cerebral contribuye de forma paralela al incremento de la temperatura y que posiblemente, el LPS estimularía la secreción de IL-1 por los macrófagos residentes que a su vez activarían el mecanismo del aumento de la temperatura (Sirko *et al.* 1989). Los diferentes efectos fisiológicos de la PGE₂ están mediados por los cuatro tipos de receptores a prostaglandinas que la reconocen (EP1, EP2, EP3 y EP4), los receptores EP2 y EP4 participan en la regulación de los niveles intracelulares de AMP cíclico (Breyer *et al.* 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

En trabajos previos en nuestro laboratorio, se determinó la expresión de IL-10 en macrófagos estimulados con LPS/PGE₂ y se mostró la presencia de las proteínas c-Fos y NFAT en extractos nucleares y citoplasmáticos de macrófagos control y estimulados, otros estudios de interacción ADN-proteína *in vitro* mostraron la presencia de complejos con los sitios NF-kB, NFAT, Sp1, AP-1, y también se determinó la presencia de las proteínas p50 y p65 en el sitio NF-kB distal y de la proteína c-Jun en el sitio compuesto NFAT/AP-1 proximal de regiones del promotor de IL-10. Estos estudios han permitido mostrar *in vitro* la interacción de estos factores de transcripción con sitios en el promotor de IL-10; sin embargo, aún no está claro cómo los factores de transcripción: NFAT, AP-1, STAT3, NF-kB y Sp1 participan en la regulación del gen de IL-10 en macrófagos estimulados con LPS y PGE₂.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La IL-10 es una importante citocina antiinflamatoria e inmunosupresora cuya expresión es clave para mantener la homeostasis celular durante los procesos inflamatorios. Se sabe que la región promotora del gen de IL-10 es muy compleja debido a que contiene varios sitios de unión a factores de transcripción. Se ha reportado la participación de algunos sitios del promotor de IL-10 en la regulación de su expresión, y de igual forma en trabajos previos en nuestro laboratorio se han determinado las interacciones de diferentes factores de transcripción con sus sitios en el promotor de IL-10 de macrófagos estimulados con LPS/PGE₂ y otros estímulos. En este trabajo nos planteamos estudiar la interacción funcional de las proteínas NFAT, AP-1, NF-kB, Sp1 y STAT3 para determinar su participación en la regulación de la expresión del gen de IL-10 en monocitos estimulados con LPS/PGE₂ y también explorar si ésta regulación es mediada por la formación de complejos multiproteicos, lo cual representa un gran potencial de estudio para entender mejor la función antiinflamatoria de la IL-10.

4. HIPÓTESIS CIENTÍFICA.

Las proteínas NFAT, AP-1, STAT3, Sp1 y NF- κ B regulan la expresión del gen de IL-10 mediante la interacción con sus secuencias consenso y la formación de complejos multiproteicos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la interacción de los factores de transcripción NFAT, AP-1, Sp1, NF- κ B y STAT3 en el promotor de IL-10 y la formación de complejos multiproteicos en monocitos estimulados con LPS/PGE₂.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la interacción de las proteínas NFAT, AP-1, NF- κ B, Sp1 y STAT3 con sus secuencias consenso dentro del promotor de IL-10 mediante ensayos de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)
- Explorar mediante la inmunoprecipitación de proteínas (IP) si los factores de transcripción NFAT, AP-1, NF- κ B, Sp1 y STAT3 regulan la expresión del gen de IL-10 a través de la formación de complejos multiproteicos

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

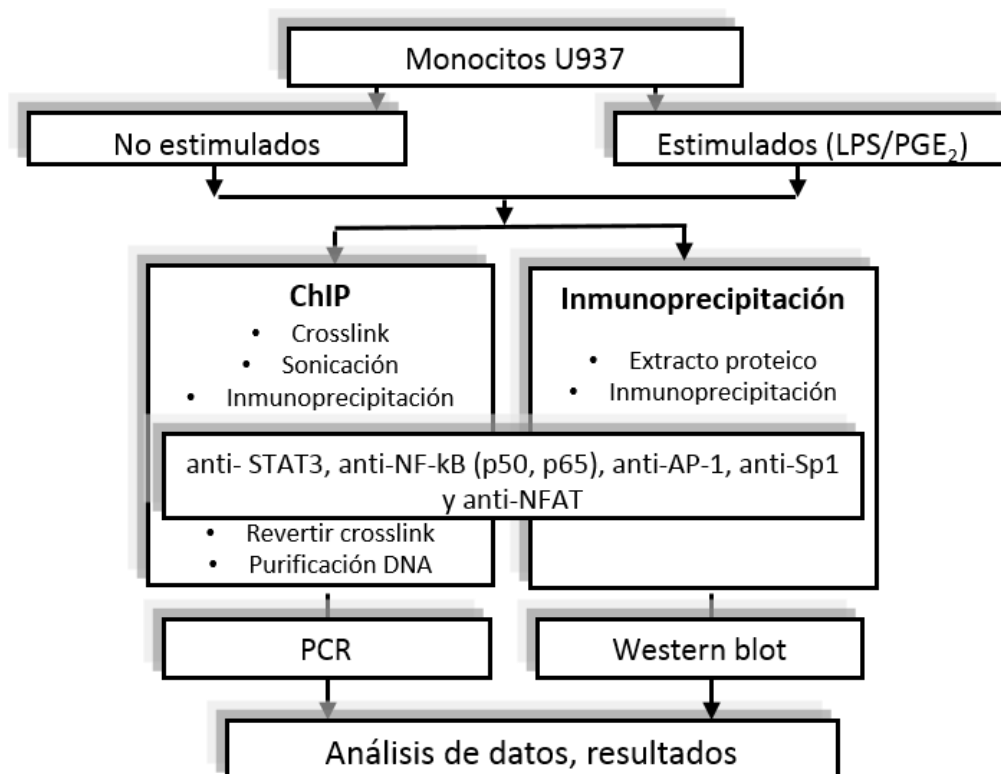


Figura 3. Diseño experimental. Monocitos U937 no estimulados (C) y estimulados (E) con LPS y PGE₂ por 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 horas fueron analizados por la técnica de ChIP e IP.

6.2 CULTIVO CELULAR

Para todos los ensayos se utilizó la línea celular mielocítica de monocitos U937 obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), la cual se cultivó en medio RPMI-1640 con L-glutamina y bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich), suplementado al 5 % con suero fetal bovino (FBS ATCC 30-2020) y al 1 % de penicilina [200 U/mL]/estreptomycin [0.2 mg/mL](SIGMA ALDRICH P4333) y anfotericina B [25 µg/mL] al 1 % (SIGMA ALDRICH A5955). El cultivo celular se mantuvo en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5 % a 37 °C. Para el mantenimiento adecuado de las células, se realizó cambio de medio cada tres días y según la densidad celular diariamente se adicionan 5 ó 10 mL de medio fresco suplementado.

6.3 CONTEO CELULAR

Los monocitos U937 se cultivan en botellas de 72 cm², cuando llegan a una confluencia del 80 % se colectan en un tubo falcón de 50 mL y se centrifugan a 750 rpm durante 10 min, se retira el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 2 mL de medio RPMI-FSB al 5 %. Para el conteo de las células se hace una dilución 1:25 tomando una alícuota de 20 µL de la suspensión celular más 480 µL de PBS 1X, se homogeniza y depositan 10 µL de la dilución en la cámara de Neubauer, se coloca en el microscopio, enfoca con el objetivo a 10X y se cuentan las células presentes en los cuatro cuadrantes de conteo de leucocitos, para obtener el número total de células presentes en la suspensión, el cálculo del número total de monocitos se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$No. Total = \left(\frac{X}{4}\right) (F. Dil)(Vol mL)(10^4)$$

Formula del cálculo de conteo celular, donde:

X= No. total de células contadas en los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer

F. Dil = Factor de Dilución

Vol= Volumen en mL de la suspensión de monocitos (2 mL)

10⁴= Constante equivalente al área por cuadrante relacionada con vol. de 1 mL

De esta manera es posible conocer la cantidad de células contenidas, una vez cuantificadas, se ajusta el volumen con medio para tener una concentración final de 10⁶ células por mL y se procede a la organización de grupos experimentales para realizar los ensayos.

6.4 GRUPOS EXPERIMENTALES Y ESTIMULACIÓN

Antes de la estimulación, los monocitos se arrestaron disminuyendo la cantidad de suero fetal bovino de medio RPMI-FSB (5 %) a medio fresco RPMI-FSB (1.5 %) durante 24 h. Las células arrestadas se contaron por el método de la cámara de Neubauer, ajustando la concentración a 10⁶ células por mL de medio fresco RPMI suplementado con suero fetal bovino

al 5 %, se formaron dos grupos experimentales: Grupos de monocitos control no estimulados (C) y grupos de monocitos estimulados (E) con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS y 1 μM de PGE_2 durante 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h, para cada condición se colocaron 10^7 células en cajas de Petri de 100 mm en una concentración final de 10^6 células/mL, después del tratamiento las células se utilizaron para los diferentes ensayos.

6.5 EXPRESIÓN DE IL-10 POR RT-PCR

6.5.1 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

Para extraer el ARN total, grupos de 10^6 monocitos control y estimulados 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h con LPS/ PGE_2 , se recolectaron por separado en tubos falcón de 15 mL y centrifugaron a 800 rpm por 10 min, las pastillas se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS 1X en un eppendorf de 1.5 mL, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 0.5 mL del reactivo de TRIzol (Sigma), las pastillas celulares se homogeneizaron pipeteando repetidamente hasta no dejar grumos; se incubaron 15 min a temperatura ambiente, se adicionaron 0.1 mL de cloroformo y se mezclaron vigorosamente en vórtex durante 10 s, las muestras se centrifugaron a 12000 g por 15 min a 4 °C. Después de la centrifugación, se observan tres fases: la inferior de color rosa que corresponde al fenol:cloroformo, una inter-fase blanca correspondiente a las proteínas y ADN, y la fase superior incolora acuosa que contiene el ARN total. La fase acuosa se transfirió a un tubo estéril, y se le adicionaron 0.5 mL de alcohol isopropílico se agita por inversión y el ARN se dejó precipitar a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 12,000 g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se removió cuidando de no perder la pastilla y se lavó 2 veces con etanol al 75 % en $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ (dietil pirocarbonato) frío. Las muestras se mezclaron en vórtex 15 s y se centrifugaron 12000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se quitó el sobrenadante y las pastillas del ARN se dejaron secar de 5 a 10 min a temperatura ambiente, cada pastilla de ARN total se resuspendió en 20 μL de $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ e incubó a 65 °C/5 min y se alícuotaron en fracciones de 5 μL que se congelaron a -70 °C hasta su uso. Para conocer la concentración y la calidad del ARN, el ARN total obtenido se cuantificó y evaluó por espectrofotometría mediante las absorbancias a 280, 260 y 230 nm en el equipo NanoDrop 2000c de *Thermo SCIENTIFIC* y *T60 UV-Vis spectrophotometer*, con los datos recabados de

las absorbancias: $A_{230\text{nm}}$, $A_{260\text{nm}}$ y $A_{280\text{nm}}$, se determinó la pureza mediante las relaciones: $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ y $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$, las cuales deben tener un valor de 1.8 a 2.0.

Para valorar la integridad del ARN, 2 μg de ARN total cada muestra se sometieron a un corrimiento electroforético a 60 voltios durante 20 min en un gel de agarosa al 1 % en buffer TBE al 0.5 X teñido con bromuro de etidio, evidenciando la presencia de las bandas de ARN ribosomales 28S y 18S íntegras, esto nos permitió continuar con la reacción de RT-PCR.

6.5.2 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT - REVERSE TRANSCRIPTION)

Se preparó el ADNc mediante el kit (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis) a partir de 1 μg del ARN total y se llevó a un volumen de 6 μL , se adicionaron 10 U de inhibidor de RNasa, 2 μL de tampón de retrotranscripción 5X (Tris-HCl pH 8.3, 50 mM, KCl 75 mM, MgCl_2 4 mM, DTT 10 mM), 0.2 μL de oligo (dT₁₈); 1 μL de mezcla de desoxinucleósidos trifosfato 10 mM (dNTP Mix), transcriptasa reversa M-MuLV 100U (0.5 μL), y se completó a un volumen final de 10 μL con H₂O-DEPC, la mezcla se llevó a un ciclo de 42 °C por 60 min, después de ese tiempo se inactivó la enzima M-MuLV incubando a 70 °C durante 5 min en el termociclador *MULTIGENE MINI* de *LABNET*. Todas las muestras de ADNc obtenidas se diluyeron 1:4 adicionando 30 μL de H₂O libre de nucleasas con el propósito de disminuir el número de copias obtenido y no saturar la siguiente reacción (PCR), se mezclaron y prepararon alícuotas de 10 μL que se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6.5.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR - POLYMERASE CHAIN REACTION) PARA LA EXPRESION DE IL-10

La amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa se optimizó de manera individualizada para cada par de primers, también se ajustó la temperatura de alineamiento (T_m) y el número de ciclos de la reacción mediante el uso de PCR de gradiente de temperatura, utilizando el kit Dream Tag Green PCR Master Mix (Thermo Scientific).

Para determinar la expresión de IL-10 se emplearon 2 μ L de ADNc dilución 1:4, adicionando los siguientes reactivos: 5 μ L de Master Mix para PCR 2X (0.05 U/ μ L de Dream Taq polimerasa en un buffer de $MgCl_2$ 4 mM y 0.4 mM de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); 0.25 μ L de iniciadores sentido y anti sentido de concentración 10 μ M, se completó con agua estéril libre de nucleasas a un volumen final de 10 μ L. La reacción se procesó en un termociclador (*MULTIGENE MINI* de *LABNET*) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 min, 29 ciclos de: desnaturalización 95 °C/35 s, alineamiento 53 °C/35 s y extensión 72 °C/35 s y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min. Se utilizó a β -actina como gen constitutivo para normalizar la expresión de IL-10. Los iniciadores fueron diseñados con el programa OligoAnalyzer 3.1 de *INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES* (IDT), la posición y el tamaño del amplicon se muestran en la siguiente tabla:

Iniciador	Secuencia	Posición pb	Tm °C	Amplicon pb
Sentido IL-10 RT	5'-CAT CTA CAA AGC CAT GAG TGA G 3'	323/344	53.3	348
Antisentido IL-10 RT	5'-GTG TCA CCC TAT GGA AAC AG -3'	651/670	53.0	
Sentido β-actina	5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3'	187/206	70.9	540
Antisentido β-actina	5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'	703/726	56.2	

Tabla 1. Iniciadores para el análisis de expresión de IL-10 por RT-PCR. Iniciadores sentido y antisentido para IL-10 y β -actina

Los productos de la PCR se separaron mediante corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.5 % en TBE 0.5X teñido con bromuro de etidio, aplicando una corriente de 100 voltios, los amplicones se observaron en un transiluminador UV (U1001) y se obtuvieron las imágenes correspondientes. Se realizó un análisis densitométrico (área e intensidad) de las bandas obtenidas mediante el programa ImageJ 1.48v, los datos obtenidos fueron agrupados y analizados en el programa Graph Pad Prism 5.03.

Se determinó la relación matemática de la densidad relativa de cada una de las bandas obtenidas de: la expresión del ARNm de IL-10 de células estimuladas con respecto a la densidad de la banda de expresión del ARNm de células control ($RE_{IL-10} = \text{Densidad ARNm IL-10}$

monocitos E / Densidad ARNm IL-10 monocitos C); de la misma forma fue realizado el análisis para el gen constitutivo β -actina determinando que no hubo diferencias en la relación de las bandas de β -actina de células control y estimuladas ($RE_{\beta\text{-actina}}$). Los datos de RE_{IL-10} de la expresión de ARNm de IL-10 fueron normalizados dividiéndolos entre el valor correspondiente de $RE_{\beta\text{-actina}}$ (control de carga). Aplicando este modelo matemático se obtuvieron valores de expresión directamente proporcionales a la cantidad absoluta del transcrito de IL-10, con respecto al gen constitutivo β -actina, y con respecto a los diferentes tiempos de estimulación.

6.6 ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)

6.6.1 FIJACIÓN DE PROTEÍNAS

Grupos de 10^7 monocitos control y estimuladas con LPS/PGE₂ en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 5 % se sometieron al ensayo de ChIP como se describe a continuación: Se cosechan los monocitos control y estimulados en un tubo falcón de 15 mL, se lavaron con PBS 1X y la pastilla se resuspendió en 10 mL de PBS 1X, las proteínas se fijan al ADN con formaldehído (*Mercurio FA* al 38 %) a una concentración final de 0.5 % durante 4 min a temperatura ambiente en agitación suave, la reacción fue detenida con glicina a una concentración final de 0.125 M en frío durante 5 min. Los monocitos se lavaron 2 veces con PBS 1X y se resuspendieron en 50 μ L de *buffer ChIP de lisis* por cada 10^6 células, se incubó 10 min en frío y se hicieron alícuotas de 50 μ L en tubos eppendorf de 1.5 mL.

6.6.2 FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA

Después de la fijación, se adicionaron 150 μ L de *buffer ChIP de dilución* con 6 μ L inhibidores de proteasas (*SIGMA-ALDRICH*), 1.5 μ L de ADN de esperma de salmón, (ver Apéndice C de soluciones) y la cromatina se fragmenta por sonicación de las células a 3 ciclos de 10" ON y 30" OFF a 30 % de amplitud en el equipo *Ultrasonic Processor GE-130* de *SIGMA-ALDRICH* y una punta de titanio de 6 mm de diámetro manteniendo las muestras en hielo, para obtener fragmentos de ~1 Kb. Una vez obtenidos los productos sonicados se reagrupan formando un *pool*, el cual se centrifugó a 13000 g por 10 min a 4 °C para eliminar los residuos

celulares, se hacen fracciones de 400 μL (2×10^6 células) que se conservaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. A partir de una fracción de 20 μL fue purificado el ADN y resuspendió en 20 μL de agua libre de nucleasas, esta fracción es denominada el *INPUT*, del cual se analizaron 3 μL de la muestra en un gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5X para verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos después de la fragmentación. Puesto que el *INPUT* es una muestra representativa que contiene todo el ADN, también sirve de control para la PCR ya que debe obtenerse amplicon con cualquier par de iniciadores.

6.6.3 INMUNOPRECIPITACIÓN DE COMPLEJOS

Alícuotas de 400 μL del producto sonicado se ajustan a un volumen final de 500 μL con *buffer CHIP de dilución* y se incuban con 2 μg del anticuerpo de interés toda la noche. Al siguiente día se incubaron con 20 μL de perlas magnéticas acopladas a proteína G (PM) (*$\mu\text{MACS molecular}$ de Miltenyl Biotec*) o perlas de agarosa acopladas a proteína G (PA) (*rec-Protein G-Sepharose de invitrogen*) por 6 h. Posteriormente sí se usaron PA se realizaron lavados astringentes con 1 mL de las soluciones: “*buffer RIPA*”, “*buffer de alta sal*”, “*buffer de LiCl*” y “*buffer TE*”, en el caso donde se usaron PM se lavaron con 1 mL de: “*buffer de lavado de baja sal*”, “*buffer de alta sal*”, “*buffer de LiCl*” y “*buffer TE*”. El producto de la inmunoprecipitación de las perlas PA se recuperó mediante centrifugación a 1000 rpm por 5 min y el de las perlas PM con un campo magnético continuo durante 6 h. Los complejos recuperados [Perla-Ac-Proteína-ADN] se resuspendieron en 250 μL de “*buffer TE*” y se sometieron a tratamiento con 2 μL de RNasa “A” [20 mg/mL], 2 μL de proteínasa K [20 mg/mL] y 15 μL SDS [10 %] a $55\text{ }^\circ\text{C}$ por 3 h; después fue revertida la fijación de proteínas del ADN incubando a $65\text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche.

6.6.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN

El ADN liberado fue extraído con 250 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (*SIGMA-ALDRICH*) relación 1:1 con la muestra, se mezcló en vórtex por 30 s y dejó reposar 1 min, se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$, la fase acuosa (superior) fue recuperada en un

tubo eppendorf estéril, se realizó una segunda extracción adicionando cloroformo en relación del volumen de la muestra 1:1, se mezcló en vórtex 30 s y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 4 °C, el sobrenadante fue recuperado y depositado en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril. EL ADN se precipitó adicionando acetato de sodio [3 M] a pH 5.2 correspondiente al 10 % del volumen de la muestra y 1 µL de glucógeno [20 mg/mL] (*Thermo Scientific*), se agitó por inversión suavemente y se adicionó 1 mL de etanol 100 % frío mezclando nuevamente de forma suave, se dejó a -20 °C toda la noche. Al día siguiente el ADN se centrifugó a 13000 rpm por 20 min a 4 °C y la pastilla se lavó 2 veces con 1 mL de etanol frío al 70 % centrifugando a 13000 rpm por 10 min y fue desechado el sobrenadante, la pastilla se dejó secar de 5 a 10 min y se resuspendió en un volumen de 20 µL de agua libre de nucleasas. Una vez resuspendida la muestra se incubó a 50 °C por 5 min y se analiza por PCR de punto final, si no se analiza inmediatamente se congela a -80 °C hasta su uso.

6.6.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL ChIP

Para la PCR del ChIP se diseñaron diferentes iniciadores para obtener los amplicones de: 962 pb (región distal) y 867 pb (región proximal) del promotor de IL-10, para hacer un escaneo de las interacciones entre los factores de transcripción y el ADN. También se analizaron regiones más cortas y excluyentes para los sitios de unión a factores de transcripción cercanos de NFAT y NF-κB (Tabla 2).

Para realizar la PCR de los ensayos de ChIP se utilizó el kit Dream Taq Green PCR Master Mix (*Thermo Scientific*), también fue estandarizada la PCR para cada par de iniciadores, utilizando 2 µL de *INPUT* (ADN) dilución 1:100 o 12 µL del producto del ChIP como plantilla, la amplificación se realizó adicionando los siguientes reactivos: 12.5 µL de Master Mix para PCR 2 X, 0.25 µL de los iniciadores sentido y anti sentido respectivos a una concentración de 10 µM, se completó con agua libre de nucleasas a un volumen final de 25 µL. La reacción se realizó en el termociclador *MULTIGENE MINI* de *LABNET* con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C/3 min; 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C/35 s, alineación de 35 s a una temperatura de 55 a 58 °C dependiendo del par de iniciadores, y

extensión de 50 s/72 °C; un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 min. Los iniciadores utilizados se muestran en la tabla 2.

Iniciador	Secuencia	Tm °C	Región	Tamaño pb
Sen IL-10 -2519	5'- CCTCCCTTCTCCCTGACATTTTG-3'	57.5	-2519/-2497	962
AntiSen IL-10 -1557	5'- CTTTCTGCATCAGCAATGGGACAACCTC-3'	60.0	-1584/-1557	
Sen IL-10 -827	5'- GCAATGGTACCAAATAGAGACGGTAGGG-3'	60.3	-827/-799	865
Rev 1 (IL-10 +38)	5'- GCT GTG CAT GCC TTC TTT TGC AAG -3'	59.8	+15/+38	
Sen IL-10 -527	5'- GCTAAGGTACCACCTAAGGTGACTGCCTAAG-3'	62.4	-527/-497	565
Rev 1 (IL-10 +38)	5'- GCT GTG CAT GCC TTC TTT TGC AAG -3'	59.8	+15/+38	
Sen IL-10 -827	5'- GCAATGGTACCAAATAGAGACGGTAGGG-3'	60.3	-827/-799	487
Rev 4 (IL-10 -340)	5'- CTG TGG GTT CTC ATT CGC GTG TT -3'	59.8	-362/-340	
Sen 4 (IL-10 -508)	5'- GAA ACT AAG GCC CAG AGA CCT AAG -3'	56.7	-508/-485	546
Rev 1 (IL-10 +38)	5'- GCT GTG CAT GCC TTC TTT TGC AAG -3'	59.8	+15/+38	
Sen 4 (IL-10 -508)	5'- GAA ACT AAG GCC CAG AGA CCT AAG -3'	56.7	-508/-485	168
Rev 4 (IL-10 -340)	5'- CTG TGG GTT CTC ATT CGC GTG TT -3'	59.8	-362/-340	
Sen IL-10 -827	5'- GCAATGGTACCAAATAGAGACGGTAGGG-3'	60.3	-827/-799	872
AntiSen IL-10 +45	5'- CTTCATGGTGGCTTTACCAACAGTACC -3'	61.0	+18/+45	
Sen IL-10 -785	5'- TAGGGGTCATGGTGAGCACTACCTGACTAGC -3'	64.8	-785/-755	445
Rev 4 (IL-10 -340)	5'- CTG TGG GTT CTC ATT CGC GTG TT -3'	59.8	-362/-340	

Tabla 2. Iniciadores para el análisis de regiones del pIL-10 por PCR de punto final. Tamaño de los fragmentos amplificados para los grupos de iniciadores en el análisis de regiones del promotor de IL-10 por PCR de punto final del ChIP.

Los productos de amplificación de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5X a 100 voltios por 55 min teñido con bromuro de etidio.

6.7 EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES PARA LA EXPRESIÓN DE IL-10

Para el análisis de la expresión de IL-10 y de los factores de transcripción en estudio, así como para los ensayos de inmunoprecipitación se obtuvieron extractos proteicos totales de monocitos U937 control y estimulados con LPS/PGE₂ por 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h; para lo cual se utilizó el método modificado de lisis por congelación “Tansey Lab Protocols, 2002”, se

cosecharon y recolectaron 2.5×10^6 monocitos control y estimulados, se lavaron 2 veces con PBS 1X frío centrifugando a 13000 g por 1 min y desechando el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 120 μ L de *buffer RT-lisis* sin generar burbujas y el tubo se sumergió en nitrógeno líquido hasta su congelación en un tiempo aproximado de 10 s, posteriormente las muestras se mezclaron en vortex 15 s, se repitió este procedimiento de congelación-descongelación 2 veces más. El lisado fue clarificado por centrifugación a 13000 g por 5 min para retirar los restos celulares, el sobrenadante (extracto proteico total) fue trasferido a un tubo limpio y se cuantificó el contenido de proteínas en 5 μ L de la muestra por el método de Sedmak & Groosberg (1977).

6.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Sedmak & Groosberg. El fundamento de la técnica se basa en la reacción que se lleva a cabo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 con los grupos amino de las proteínas, la sensibilidad del método es de 1 a 10 μ g de proteína.

Se hizo una curva patrón con albúmina bovina (BSA) de 1 a 10 μ g y se graficó la absorbancia a 620 nm (dato experimental $A_{620\text{nm}}$), contra los μ g de proteína. Los datos fueron normalizados por regresión lineal simple obteniendo la ecuación de la línea recta que permitió recalcular la absorbancia teórica (dato teórico ideal $A_{620\text{nm}}$), con la que se correlaciona la absorbancia obtenida de cada extracto proteínico total para el cálculo de la concentración de cada uno.

Ecuación de la recta:

$$y = m(x) \pm b \quad \text{siendo; } R^2 > 0.97$$

Fórmula del cálculo del valor teórico ideal de $A_{620\text{nm}}$, donde;

X = Valor de $A_{620\text{nm}}$ experimental obtenida

m = Pendiente de la recta

b = Constante de ajuste de la recta de intersección en el eje Y

R^2 = Coeficiente de determinación – relación lineal de los datos

Para determinar la concentración de proteína de cada muestra, se adicionaron 5 μL de extracto proteico total de la muestra, 495 μL de H_2O milliQ estéril y 0.5 mL de la solución al 0.06 % de azul brillante de Coomassie G-250 en 3 % de ácido perclórico; se mezcló vigorosamente y se leyó la absorbancia a 620 nm. Para obtener la concentración de proteína se interpola el valor de $A_{620\text{nm}}$ de las muestras en la curva patrón de albúmina aplicando la siguiente formula:

$$[\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \frac{(y_1) + \left(\frac{y_2 - y_1}{x_{2i} - x_{1i}}\right)(x_{exp} - x_{2i})}{5 \mu\text{L}}$$

Tubo	$A_{620 \text{ nm}}$ Experimental	BSA [μg]	$A_{620\text{nm}}$ V. Ideal
	0	$Y_0 = 0$	X_{0i}
1	X_1	$Y_1 = 1$	X_{1i}
2	X_2	$Y_2 = 2$	X_{2i}
3	X_3	$Y_3 = 4$	X_{3i}
4	X_4	$Y_4 = 6$	X_{4i}
5	X_5	$Y_5 = 8$	X_{5i}
6	X_6	$Y_6 = 10$	X_{6i}

Formula del cálculo de concentración de proteína por correlación, donde;

X_{exp} = Valor de $A_{620\text{nm}}$ experimental de la muestra

y_1 o y_2 = Limites superior e inferior de concentración de proteína BSA

x_{1i} o x_{2i} = Valor de $A_{260\text{nm}}$ ideal teóricos para los límites inferior y superior de BSA

6.9 INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)

6.9.1 LISIS CELULAR

Grupos de 10^7 monocitos control y estimulados se lavaron con 1 mL de PBS 1X a 13 000 rpm por 1 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla de células se incubó en 1 mL de *buffer de lisis IP* en hielo durante 20 min, mezclando continuamente con una pipeta para lisar las células cuidando de no generar burbujas, una vez lisadas se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C, los sobrenadantes se pasan a un tubo limpio y se cuantifica la concentración de proteínas por el método de Sedmak & Groosberg.

6.9.2 PRE-ACLARADO

Muestras de 600 o 700 µg de proteína se ajustan a un volumen de 600 µL con *buffer de lisis* con inhibidor de proteasas, los lisados se incubaron 3 h a 4 °C en rotación continua con 5 µL perlas de agarosa acopladas a proteína G para disminuir pegados inespecíficos de proteínas. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min a 4 °C y el lisado celular se transfirió a otro tubo limpio y estéril.

6.9.3 INMUNOPRECIPITACIÓN

Los lisados celulares aclarados se incubaron durante toda la noche a 4 °C en rotación continua con 2 µg del anticuerpo de interés: anti-p50, anti-p65, anti-Sp1, anti-NFATc1 o anti-NFAT1, (Tabla 4). Paralelamente se trata una muestra con iguales condiciones, pero sin la adición del anticuerpo como control negativo del ensayo. Al día siguiente se adicionaron 20 µL de perlas magnéticas acopladas a proteína G o perlas de agarosa acopladas a proteína G por 3 h en agitación. Se obtiene la separación de los complejos [Perla-Ac-Proteína] por centrifugación 1000 rpm por 5 min en frío para las perlas de agarosa (PA) o por interacción con un campo magnético continuo por 6 h para las perlas magnéticas (PM), y se desecha el sobrenadante. Los complejos se lavaron tres veces con buffer PBS 1X centrifugando a 3,000 rpm por 30 s entre cada lavado o manteniendo el campo magnético. A cada una de las muestras se le agregan 10 µL de buffer de carga SDS-PAGE, se pone a ebullición por 10 min y se le agregan 30 µL de buffer de elución, los complejos obtenidos se someten a una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y se transfieren a una membrana de PVDF de 0.2 µm para su análisis por western blot.

6.10 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

6.10.1 ELECTROFRESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) es una técnica empleada para separar las proteínas en función de su peso molecular a través del

cual van a migrar aplicando un campo eléctrico, la presencia del detergente anfipático SDS desnaturaliza las proteínas en su estructura primaria y les confiere una densidad de carga general negativa que permitirá separarlas solo en función de su peso molecular. Se empleó el sistema de electroforesis “mini-PROTEAN tetra cell” de *BIO RAD* para geles de poliacrilamida al 8, 10 y 12 % en función del peso molecular de las proteínas de interés a separar (Tabla 3), el cambio del porcentaje tiene como objeto que se localicen las proteínas de interés en la parte central del gel posterior al corrimiento; el grosor del gel fue de 0.75, 1 o 1.5 mm de acuerdo a la concentración de proteína de las muestras para poder mantener la relación de concentración y volumen (C/V) y no saturar los pozos del gel.

Concentración de Acrilamida	Rango lineal de separación (Kda)
12	12 – 60
10	20 – 80
7.5	36 – 94
RELACIÓN MOLAR DE BISACRILAMIDA:ACRILAMIDA 1:29	

Tabla 3. Rango efectivo de separación de proteínas en geles SDS-Poliacrilamida. Tabla de concentración de acrilamida para electroforesis en buffer Tris-Glicina, (Modificada de Harlow & Lane, 1988).

Los extractos proteicos totales así como a los productos de la IP se les adicionó buffer de carga para SDS-PAGE 4X, se colocaron a ebullición por 5 min y después se mantuvieron en hielo. Los geles fueron montados en los soportes de la cámara de electroforesis y cubiertos con tampón de corrimiento para electroforesis, se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular en los pozos correspondientes. Los geles se corrieron a 60 voltios por 30 min o hasta que la muestra entrará en el gel concentrador, posteriormente se corrió a 100 voltios por 1.5 h en el gel separador, evitando que salga el frente de corrimiento. Se retiran los geles de la cámara de electroforesis y se colocan en recipientes limpios, se equilibran con buffer de transferencia por 10 min para posteriormente realizar la transferencia de proteínas a una membrana PVDF.

6.10.2 ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS: WESTERN BLOT

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, se hizo una transferencia semi-seca a una membrana de PVDF en un Mini Trans Blot-Cell de *BIO RAD*, para lo cual se colocaron en el aparato 2 hojas de papel Wathman, una gruesa y una delgada humedecidas por capilaridad en tampón de transferencia, enseguida se colocó la membrana PVDF, la cual fue activada previamente (5 a 10 s en metanol, 5 min en agua milli-Q estéril y 10 min en tampón de transferencia), posteriormente se colocó el gel de poliacrilamida encima de la membrana PVDF y sobre este se colocaron nuevamente 2 hojas de papel Wathman, una delgada y una gruesa; la transferencia se realizó a 23 voltios durante 55 min. Después de la transferencia se recuperó la membrana y se marcó la cara transferida, se lavó en agua milli-Q estéril 30 s, se fijaron las proteínas en metanol 10 s e inmediatamente se deja secar hasta su totalidad por 5 o 10 min sobre una superficie limpia. La membrana se reactiva en metanol por 5 a 10 s, se lava nuevamente en agua milli-Q estéril por 2 min y se equilibra en una solución de TBS-Tween al 0.05 % frío. Para verificarla calidad de la transferencia la membrana fue teñida con rojo de ponceau durante 10 min, donde se visualizaran una serie de bandas definidas en cada carril para verificar el contenido proteico y su integridad, la membrana es lavada cuantas veces sea necesario con agua destilada estéril hasta retirar todo el colorante y se equilibra durante 5 min en agitación con TBS-Tween al 0.05 % frío.

6.10.3 INMUNODETECCIÓN: WESTERN BLOT

Antes de la inmunodetección, se bloquean los sitios inespecíficos colocando la membrana en una solución fresca de leche descremada al 5 % (*Svelty Figura 0 %* de la marca *Nestle*) en TBS-Tween al 0.05 % durante 2 h en agitación a 30 rpm (balanc *rocker25* de *Labnet*). Se enjuaga la membrana 2 veces con TBS-Tween 0.05 % y posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en TBS-Tween al 0.05 % adicionado con leche descremada al 5 % durante toda la noche a 4 °C (Tabla 4). Al día siguiente se realizaron 3 lavados con TBS-Tween 0.05 % durante 10 min y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (HRP), durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se

realizó el revelado de la membrana mediante quimioluminiscencia y autorradiografía, en un cuarto oscuro, para lo cual se adicionaron a la membrana 50 µL de la solución de sustrato para HRP (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate MILLIPORE), se cubrió la membrana con una película plástica transparente (acetato) y se colocó encima una película radiográfica sensible al verde (Kodak_{FILM} T-MAT G/RA) de 8 x 10 cm durante 30 - 180 s a temperatura ambiente; el film se reveló de la siguiente manera: la película radiográfica se colocó en la solución reveladora (Kodak GBX developer 1:6) durante 2 min, después se lavó con agua destilada y se colocó en solución fijadora (Kodak GBX fixer 1:6) por 5 min, finalmente se lavó dos veces con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

Anticuerpo	Marca / # Catalogo	Región de reconocimiento	Dilución
anti-c-Jun	Santa Cruz Biotechnology H-79: sc-1694	N-TERMINAL	1: 500
anti c-Fos	Santa Cruz Biotechnology (4): sc-52	N-TERMINAL	1: 500
anti-NF-κB (p50)	Santa Cruz Biotechnology H-119: sc-7178	N-TERMINAL	1:2000
anti-NF-κB (p65)	Santa Cruz Biotechnology C-20: sc-372	N-TERMINAL	1: 500
anti Sp1	GeneTex, Inc GTX110593	-----	1: 500
anti-NFATc1	Santa Cruz Biotechnology H-110: sc-13033	N-TERMINAL	1: 500
anti-NFAT1	GeneTex, Inc GTX127932	N-TERMINAL	1: 500
anti-STAT3	Santa Cruz Biotechnology C-20: sc-482	C-TERMINAL	1: 200
Anti-IL-10	Abcam ab34843	-----	1:2000
anti-β-actina	GeneTex, Inc GTX629630	C-TERMINAL	1:6000
anti-Rabbit (HRP)	Abcam 14141	Fc de IgG	1:4000
anti-Rabbit easy blot (HRP)	GeneTex, Inc GTX221666-01	Fc de IgG	1:3000
anti-mouse (HRP)	Millipore MAB1501	Fc de IgG	1:4000

Tabla 4. Especificaciones generales de los anticuerpos. Especificaciones generales de los anticuerpos empleados para los ensayos de ChIP e IP y dilución empleada para el análisis de western blot.

6.11 ANÁLISIS *IN SILICO*

Se realizó un análisis *in silico* del promotor de IL-10 de la región de 2600 pb a +38 pb, el análisis bioinformático abarco sitios con secuencias consenso para los factores de transcripción: NF-κB, Sp1, NFAT, AP1 y STAT3 con versiones actuales de los siguientes software libres: **PATCH** (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/patch/bin/patch.cgi>) que utiliza el conjunto de sitios de unión de TRANSFAC. **ConSite** (<http://consite.genereg.net>), integra la predicción del sitio de unión generado con modelos de factores de transcripción de alta calidad y filtra comparando entre especies (*footprinting* filogenético). **LASAGNA 2.0** (http://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search), se basa en la hipótesis de que los sitios de unión a factores de transcripción comparten un núcleo (secuencia corta y altamente conservada). **AliBaba 2.1** (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>), utiliza los sitios almacenados en la base de datos TRANSFACT, no usa las matrices de cada factor de transcripción pero identifica los sitios conocidos para una secuencia desconocida para posteriormente formar pequeños conjuntos de sitios por posición y clase. **P-MATCH** (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/pmatch/bin/p-match.cgi>), analiza secuencias consenso combinando el uso de matrices, para ello utiliza la librería de matrices peso posicionales de TRANSFAC. La importancia del uso de diferentes programas para el análisis del promotor tiene como objetivo obtener una información más completa debido a las diferencias del tipo de algoritmo empleado por el software.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS

7.1 ANÁLISIS *IN SILICO* DEL PROMOTOR DE IL-10 DE *Homo Sapiens* (pIL-10)

Resultados previos de nuestro laboratorio del análisis *in silico* del promotor de IL-10 mostraron secuencias importantes que funcionan como sitios de unión a factores de transcripción necesarios para reclutar la maquinaria general de transcripción; sitios con secuencias consenso para NF- κ B, Sp1, STAT3 y sitios compuestos para NFAT/AP1, así como una caja TATA en la posición -77 río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Landeros, 2005).

Con el fin de refinar la búsqueda de sitios donde interactúan los factores de transcripción de estudio, en este trabajo, se realizó un nuevo mapeo del pIL-10 para obtener los posibles sitios de interacción mediante un análisis *in silico* con versiones actuales de programas libres para los factores de transcripción Sp-1, STAT3, NF- κ B (p50, p65), NFAT y AP1 en la región del promotor de -2600 pb a +38 p. Para el análisis se utilizaron los programas: ConSite, LASAGNA 2.0, AliBaba 2.1, P-MATCH y PATCH, encontrándose 109 posibles sitios de unión a los factores de transcripción de interés, después de un filtrado de los datos donde se excluyeron sitios repetidos o con diferencia de 1 a 4 bases nucleotídicas de cercanía y que además fueron determinados por diferentes programas, se evidenció la presencia de 86 diferentes posibles sitios de unión a factores de transcripción, esto se debe a que cada programa emplea diferentes modelos matemáticos. En un segundo filtro de los datos obtenidos se determinó la presencia de 18 probables sitios de unión en la región de análisis de -827 pb a +38 pb y otros 22 sitios probables en la región distal de -2519 pb a -1557 pb del pIL-10, además se corroboró el sitio de inicio de la transcripción (+1) y la posición de la caja TATA dentro del promotor analizado (-61 pb), esta información esta descrita de forma gráfica en la Figura 4.

-2608 Sp1 AP-1 (+)
 CCGAGACTCT GTCTCAAAA AAAAAAAGAA
 -2578 Sp1 (+)
GTCAGATCCT AACCTCAACC CTATTTAACA GATTATAGAT GAAAGAAAGG TACAAATGGC
 -2518 TTTTACATAC CTCCCTTCTC CCTGACATTT TGTATGTGTG TGTGTGTGTA TTTACACACA
NFAT AP-1 (-/+) /NF-κBSp1
 -2458 CATCTCATAT AAGGAAATTG AAGGGAGGCT GCCTGCATCC CTGAGTCACT CTCCCTCTCC
 -2398 TTCTGAATGC TTACCTGTGC CCAGACCACC TCCTTAGCCT CGCACCTCC AGGCTTACAG
STAT3 (+) /NF-κB
 -2338 GGCACCTCTC TATGCCCATC CCAAGTATAG CTGATACCTT CCAAGGGCCA GACTTGGTGC
 -2278 TAAGTACCAA GTACGCAAAG ATTAATAAAA CAATGTCCTG TTTCAGGGAG CTCAAAGCTG
Sp1 AP-1 (+) NFAT (-)
 -2218 ATTCGGCAGG GCATGGTGTG TACATGAATG ATAACCACGT AGGGTTGCAG GTTTCCTAGT
AP-1 (-) Sp1 Sp1
 -2158 GAGGTAAGCA CAAGCAAGA TGGGAAACAA AGGAAGGAGG GGTTCACAGC CTCACCCAGA
AP-1 (-) NF-κB (+) Sp1
 -2098 GTCCAGAACC CCTGGCCTGC CTGGTGCCCA TGCTGAGTCC ACTTCTGGAA CACCCAGCTC
Sp1 Sp1 NF-κB Sp1 (+)
 -2038 AGAGAGGGGG TTAGACCTGC AGGCTAACAC AGACACAGCC AGAAAACCC AGGAGCCGAG
NFAT (+) NF-κB (-)
 -1978 GGGGAAGGAG AAAGGTCAA GAAGGGGAAA CCCAGGTCCT GGTCCCCTTC TCTCTGCTTC
 -1918 CTGGCAGCAG AACTCAGACA GAACCCTTAA GCCAGTCTAA GTCTGGCAGG ACCAGTAAGT
STAT3 (-)
 -1858 TCTGAGTTAG CTCCATACTA GTTTCTAGCA GGCTCTTTCT CACTTCCTGA TTCTTAGGTT
Sp1
 -1798 TCTACATTGA CACTCCCTGA AGAGTTGGGA AGAGACACCA CAGTCCCCTG ACCCTGATCC
NF-κB AP-1 (+) Sp1 (+) Sp1 (-)
 -1738 ATAGGTCACA CAGCAGGGAC ATCCACAGGG TGGGCGTGGG CCCTCTCATC CCTCCCTCCC
 -1678 ACTCACTTCA CGCTGGCTGG GCCCAAGGT GTTTGCACCC CTTCAGTGA GTGACCTTCT
NFAT (+)
 -1618 CTAGTGCAGC AAGCTCAGAA CCTGCTGCCA CTGGAGTTGT CCCATTGCTG ATGCAGAAAG
NF-κB (-) /STAT3 (+) /Sp1
 -1558 GTGAAGAACT AGCAGAACAC TGGAATGCC CTCCATCTGG GTCCATGGCT ACTTAAGCTC
 -1498 AATGCTCCCT GGCAGGCAGG AGGACAGGTG CTATTGCCCT GTTGGGACAG ATGAAAAACA
AP-1 (-) Sp1
 -1438 GACACAGGGA GGATGAGTGA TTTGCCCTGA CTATAGAGTG GCAGGGCCAA GGCAGAGCCC
Sp1
 -1378 AGGCCTCCTG CACCTAGGTC AGTGTTCTC CCAGTTACAG TCTAAACTGG AATGGCAGGC
NF-κB NF-κB (+)
 -1318 AAAGCCCCTG TGGAAGGGGA AGGTGAAGGC TCAATCAAAG GATCCCAGA GACTTTCCAG
AP-1 Sp1 Sp1
 -1258 ATATCTGAAG AAGTCCTGAT GTCACTGCC CGGTCTTCC CCAGGTAGAG CAACTCCT
 -1198 CGCCGCAACC CAACTGGCTC CCCTTACCTT CTACACACAC ACACACACAC ACACACACAC
Sp1 NFAT (+) /Sp1
 -1138 ACACACACAC ACACAAATCC AAGACAACAC TACTAAAGGCT TCTTTGGGAA GGGGAAGTAG
Sp1 STAT3 (-) /AP-1 (+)
 -1078 GGATAGGTAA GAGGAAAGTA AGGGACCTCC TATCCAGCCT CCATGGAATC CTGACTTCTT

rígidos que no permiten encontrar ciertos sitios de unión, o el caso contrario que sean menos específicos y por lo tanto, reconocen múltiples secuencias como sitios posibles de unión (Figura 5).

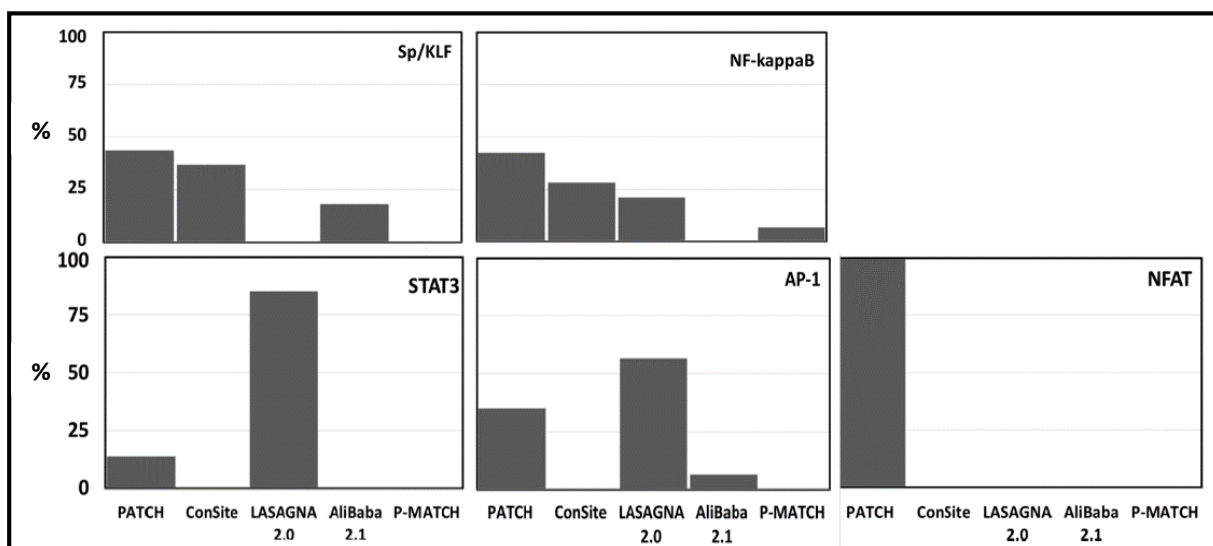


Figura 5. Cobertura de sitios del análisis in silico para factores de transcripción en el promotor de IL-10. Porcentaje de cobertura de los programas PATCH, ConSite, LASAGNA 2.0, Alibaba 2.1 y P-MATCH empleados para el análisis in silico de sitios para los factores de transcripción (Sp1, NF- κ B, NFAT, STAT3 y AP-1) en el promotor de IL-10 en la región de -2600 pb a+45 pb.

El inconveniente de un análisis *in silico* es que no es capaz de distinguir entre sitios que tienen una función *in vivo* y los sitios que tienen secuencias no funcionales, obteniéndose un elevado número de sitios falsos positivos, aun empleando un criterio de búsqueda restrictivo donde el porcentaje de identificación de la matriz fue de 80 % y conservándose de 6 a 8 nucleótidos en el sitio.

7.2 CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE IL-10

Si bien en estudios previos en el laboratorio ya se había determinado que el tiempo máximo de expresión del ARN es a las 8 h; en este trabajo se realizaron cinéticas de expresión a nivel de ARNm y de proteína para tener una idea más certera de los tiempos a los que se realizarían los ensayos de ChIP e IP. Inicialmente se determinó la expresión de IL-10 a nivel de

ARNm mediante RT-PCR en monocitos U937 control sin estímulo y estimulados con LPS/PGE₂ a 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h. En la Figura 6 se muestran los productos de amplificación para IL-10 de 347 pb y para β -actina de 540 pb se corrieron en un gel de agarosa al 1 % y buffer TBE al 0.5 X teñido con bromuro de etidio.

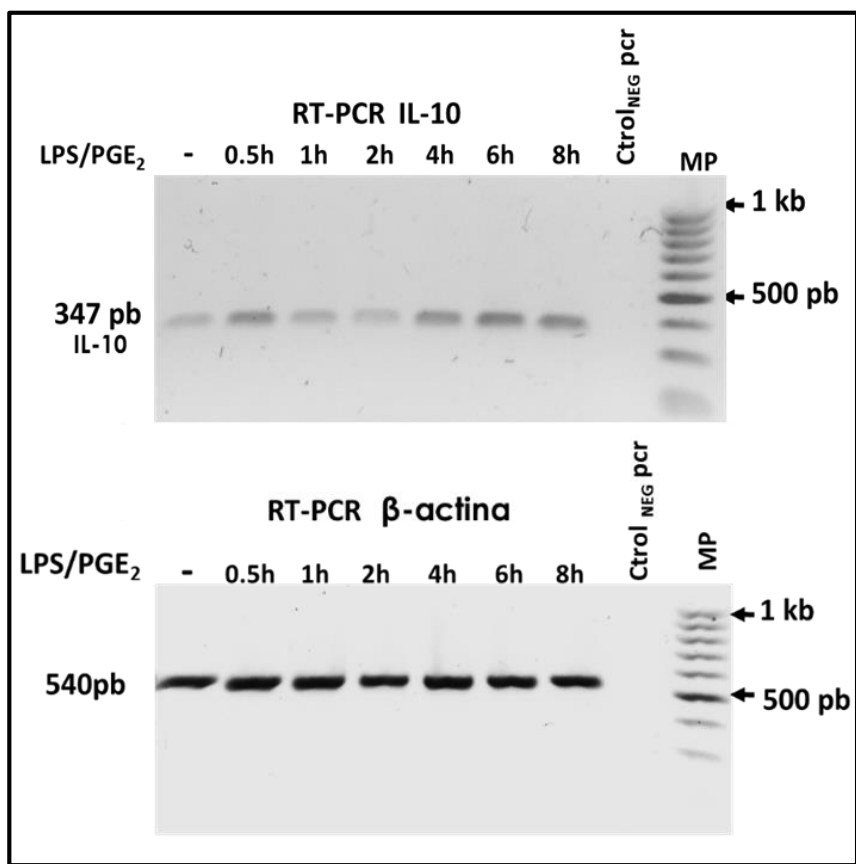


Figura 6. RT-PCR para IL-10 y β -actina. Productos de RT-PCR para IL-10 y β -actina de monocitos U937 control (C) y estimulados (E) con LPS/PGE₂. MP = marcador de peso molecular 1 Kb.

Para determinar el nivel de transcripción de IL-10 se realizó el análisis densitométrico de tres ensayos independientes, que permitió comparar la expresión de IL-10 de los tiempos de estimulación respecto a la expresión de células control sin estímulo, los datos fueron normalizados con el gen constitutivo β -actina y analizados con el software estadístico GraphPad Prisma 5.03, realizando una ANOVA de medidas repetidas y la prueba Post Test de Tukey (Tukey, 1949).

En la figura 7 se observan picos con diferencias estadísticamente significativas desde las 4 h ($p < 0.01$) hasta un pico de máxima expresión a las 8 h ($p < 0.0001$) de estimulación, en el comportamiento de la curva se puede notar un incremento progresivo a partir de las 2 h de estímulo hasta llegar al máximo registrado a 8 h de estimulación. La curva también muestra un aumento del doble de expresión del ARNm de IL-10 a 0.5 h con diferencia significativa de este punto con los grupos de monocitos control y estimulados 2 h. Como gen constitutivo para la normalización de los datos del nivel de transcripción se empleó la proteína β -actina.

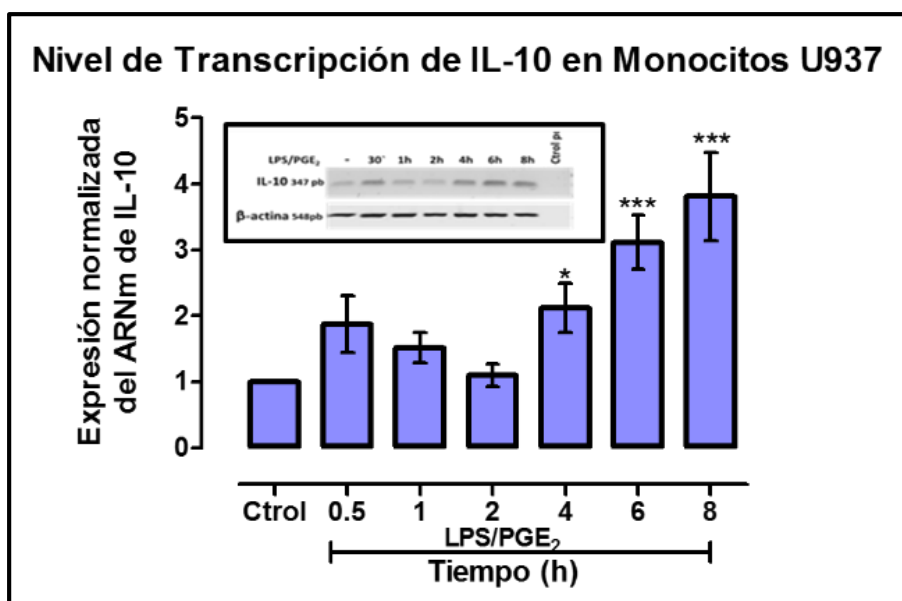


Figura 7. Nivel de transcripción de IL-10 en monocitos U937 control y estimulados con LPS/PGE₂ por RT-PCR. Los datos fueron normalizados con β -actina. ANOVA de medidas repetidas post-test Tukey, *** $p < 0.0001$ Ctrl vs 6 h y Ctrl vs 8 h, * $p < 0.01$ Ctrl vs 4 h.

Los datos obtenidos se transformaron aplicando el logaritmo base 10 (LOG_{10}), lo cual permite normalizar los datos en una distribución normal para hacerlos de una forma más simétrica y aplicar un análisis estadístico más preciso. En la figura 8 se observan dos picos de aumento de expresión del ARNm de IL-10 estadísticamente significativos ($p < 0.001$) a 0.5 h y ($p < 0.0001$) a 8 h de estimulación, se pudo evidenciar un retorno a niveles basales a las 2 h de estimulación y un incremento gradual de la expresión dependiente del tiempo de exposición al estímulo a partir de las 4 horas hasta alcanzar el pico máximo a 8 h, se determinó una diferencia estadística en un periodo temprano de estimulación de 0.5 h similar al de 4 h ($p < 0.001$) y

diferencias estadísticas a 6 h y 8 h ($p < 0.0001$) con respecto a las células control, en estos últimos tiempos la expresión de IL-10 incrementa por arriba del doble hasta un máximo de 7 veces mayor respecto a los monocitos control no estimulados (Figura 8).

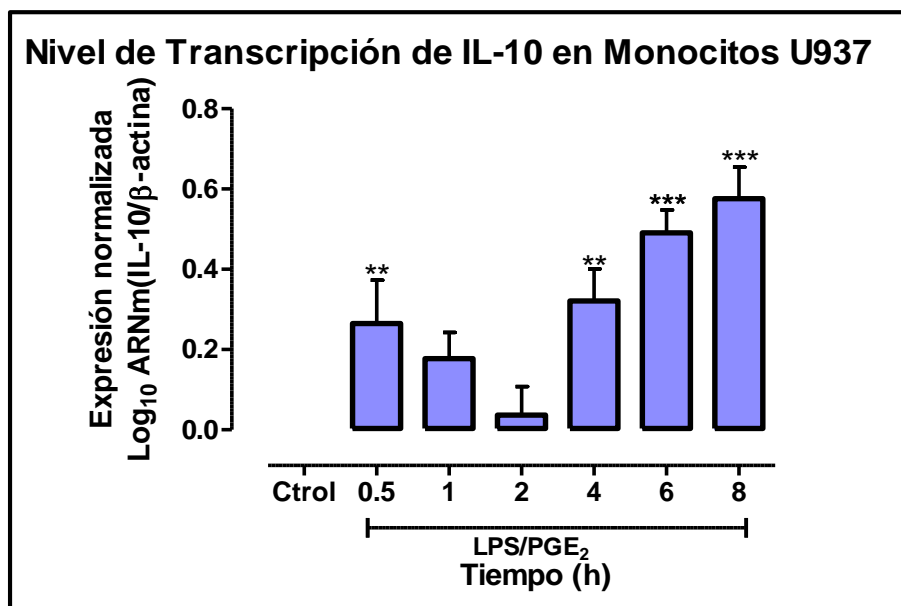


Figura 8. Expresión del ARNm de IL-10 en monocitos U937 control y estimulados con LPS/PGE₂ por RT-PCR. Los datos fueron normalizados con β-actina y transformados con LOG₁₀. ANOVA de medidas repetidas post-test Tukey, (n=3) *** $p < 0.0001$; Ctrl vs 6 h y Ctrl vs 8 h, ** $p < 0.001$; Ctrl vs 0.5 h, Ctrl vs 4 h.

Como se mencionó previamente también se realizó el análisis de la expresión de IL-10 a nivel de proteína mediante western blot en extractos proteicos totales de monocitos U937 control y estimulados con LPS/PGE₂, la expresión fue normalizada con el gen constitutivo β-actina, en el análisis densitométrico de IL-10 se observa un aumento de la expresión del doble respecto a monocitos control a las 0.5 h de estimulación, la cual disminuyó hasta el nivel basal a 1 h de estimulación, sin embargo, la expresión de IL-10 a partir de las 2 hasta 8 horas presenta un comportamiento de aumento exponencial respecto al tiempo, teniendo un pico máximo de expresión a las 8 h de estimulación, donde se presentó una expresión 4 veces superior respecto a las células no estimuladas(Figura 9).

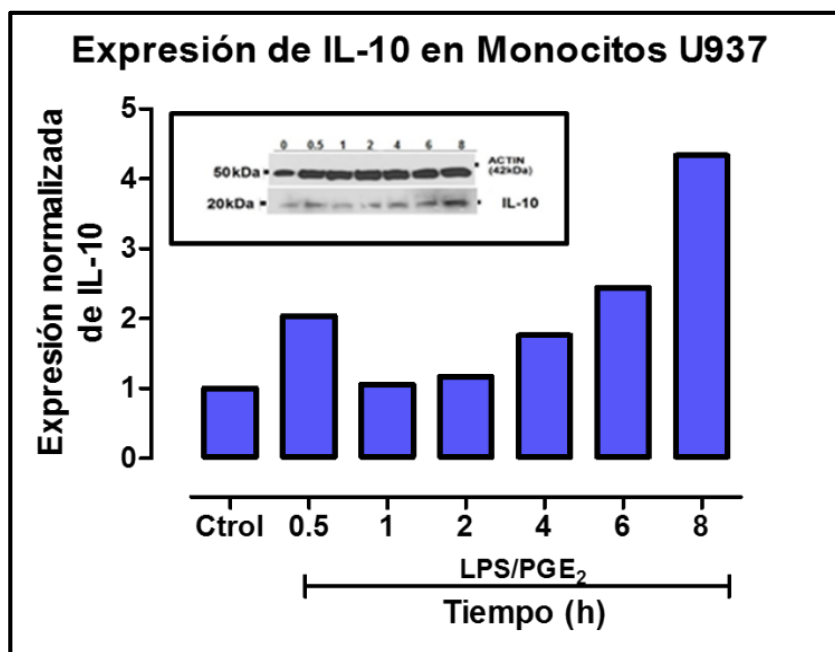


Figura 9. Expresión de IL-10 en monocitos U937 control y estimulados con LPS/PGE₂. Análisis densitométrico del western blot, la expresión de IL-10 fue normalizada con β -actina.

7.3 CINÉTICAS DE EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Se determinaron las cinéticas de expresión de los factores de transcripción de nuestro estudio y se relacionaron con los tiempos de la cinética de expresión de IL-10 para determinar los tiempos donde se deben realizar los ensayos ChIP e IP, por lo que se realizó el análisis de los factores de transcripción; p50, p65, Sp1, NFAT y c-Fos por Western blot en extractos totales de monocitos U937 control (C) y estimulados (E).

NF- κ B (p50 y p65).- El análisis de estos factores de transcripción de la familia NF- κ B se hizo con 30 μ g de proteína. En la figura 10 se muestra un incremento de expresión de p50 a 1 h de estimulación y una máxima expresión a las 8 h, comparando este comportamiento de expresión con la de IL-10 se puede observar que a tiempos tempranos las cinéticas son diferentes, donde existe un incremento rápido e intenso de p50 que presenta un pico máximo a 1 h y disminuye a niveles basales a 2 h, cuando en ese mismo periodo la expresión de IL-10

presenta un pico máximo a 0.5 h y comienza a disminuir hasta llegar a niveles basales a las 2 h de estimulación, este hecho podría sugerir un papel de regulación negativo de p50 sobre la expresión de IL-10; sin embargo, al revisar el nivel de expresión en etapas más tardías, encontramos un comportamiento de incremento gradual respecto al tiempo de IL-10 y p50 a partir de las 2 h hasta las 8 h, con un pico máximo de expresión a las 8 h de estimulación, lo cual sugiere un papel de regulación positiva de NF- κ B (p50) en la expresión de IL-10. En el análisis de la expresión de p65 no se logró su identificación bajo las mismas condiciones que p50 por el método de western blot (Figura 10), se sugiere que el análisis se debe hacer con una mayor cantidad de proteína.

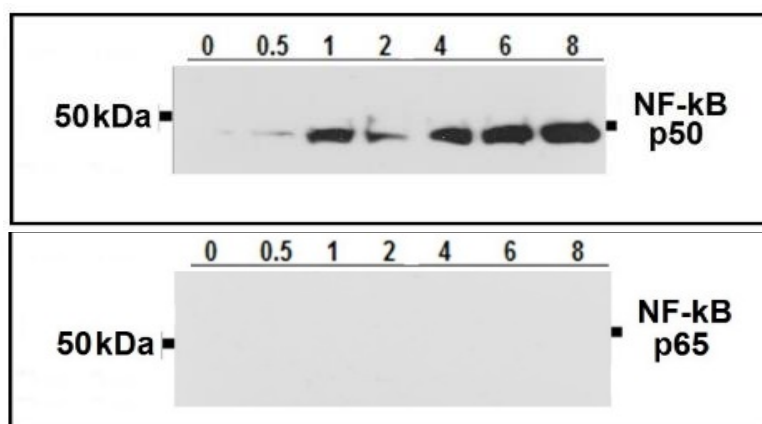


Figura 10. Cinéticas de expresión de NF- κ B en monocitos U937. Cinéticas de expresión para NF- κ B p50 (arriba) y NF- κ B p65 (abajo) en extractos proteicos de monocitos control y estimulados (0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h) con LPS y PGE₂.

AP-1 (c-Fos).- En el análisis del factor de transcripción c-Fos por western blot se evidenció su expresión en monocitos U937 a las 4 h de estímulo con LPS y PGE₂ (Figura 11) y no fue detectada su expresión a otros tiempos de estimulación. Es importante señalar que el aumento de c-Fos a las 4 h ocurre en un punto de tiempo donde la expresión de IL-10 se ve potencializada hasta llegar al pico máximo a 8 h de estimulación, donde además el factor de transcripción p50 mostró su abundante expresión desde las 4 h de estimulación.

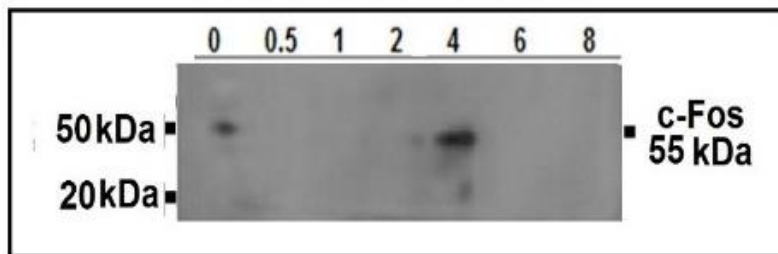


Figura 11. Cinética de expresión de AP-1 (c-Fos) en monocitos U937. Se emplearon 30 μ g de extractos proteicos de monocitos U937 control y estimulados (0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h).

NFATc1.- El análisis del factor de transcripción NFATc1 se realizó con 50 μ g de proteína de extractos proteicos totales de monocitos control y estimulados, en la figura 12 se observa la expresión de NFATc1 a nivel basal, la cual aumenta ligeramente en monocitos estimulados de 0.5 a 2 h, observándose un máximo de expresión a las 4 h de estimulación, tiempo en el cual la expresión de IL-10 es del doble respecto a las células control y que a partir de este punto la expresión de IL-10 presenta un incremento gradual respecto del tiempo de estimulación hasta alcanzar su máximo a las 8 h de estimulación, esto podría sugerir un papel regulador de NFATc1 sobre el gen de IL-10 u otros genes a las 4 h de estimulación, así como también en este punto se determinó la presencia de c-Fos.

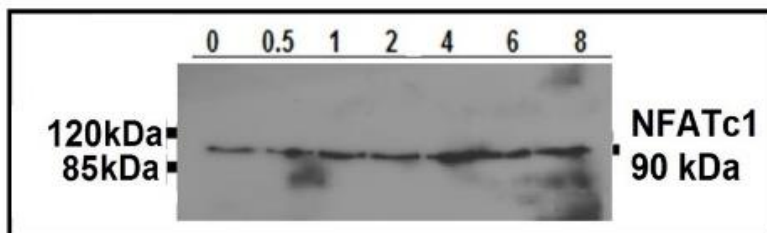


Figura 12. Cinéticas de expresión de NFATc1 en monocitos U937. Se emplearon 50 μ g de proteína de extractos proteicos totales de monocitos control y estimulados (0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h).

Sp1.- El análisis por western blot de la proteína Sp1 (Figura 13) muestra que no se expresa en monocitos U937 sin estímulo y que se expresa en monocitos estimulados en todos los intervalos de tiempo analizados, presentando diferencias de expresión entre los diferentes tiempos de estimulación, se encontraron dos picos de expresión a 1 y 8 h de estimulación, con una expresión abundante de Sp1 en un rango de 0.5 a 4 h con un pico máximo de expresión a 1 h y que disminuye fuertemente a las 6 h de estimulación, en el periodo de 0.5 h los niveles de

expresión de IL-10 presentan el pico de expresión del doble respecto a monocitos sin estímulo y su retorno a niveles basales a 2 h de estimulación y aunque IL-10 se expresa de forma basal en monocitos no estimulados (control) Sp1 no pudo ser determinada, esta correlación sugiere un papel regulador de Sp1 sobre la expresión de IL-10 en monocitos estimulados con LPS y PGE₂.

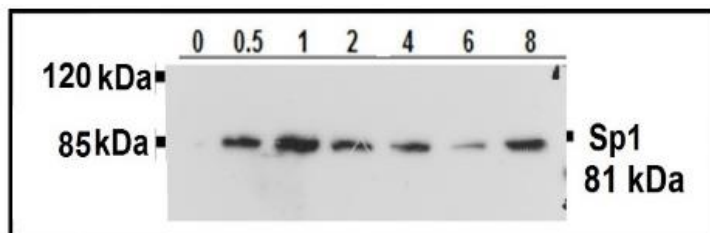


Figura 13. Cinéticas de expresión de Sp1 en monocitos U937. Se emplearon 50 µg de proteína de extractos proteicos totales de monocitos control y estimulados con LPS/PGE₂ (0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h).

Como control de carga para los ensayos de western blot se utilizó la proteína constitutiva β-actina (Figura 14) donde se mostró que no existe diferencia de carga de proteína en los extractos de proteína total para los diferentes grupos de monocitos. Los cambios de expresión de los factores de transcripción en monocitos control y estimulados a los tiempos de 0.5 a 8 h, muestran la complejidad de la regulación de su expresión, por lo tanto, determinar los tiempos de expresión, la naturaleza de la función que tiene cada factor de transcripción y su comportamiento con la expresión de IL-10, sirvieron como referencia para elegir los tiempos a los cuales se realizaron los ensayos ChIP e IP.

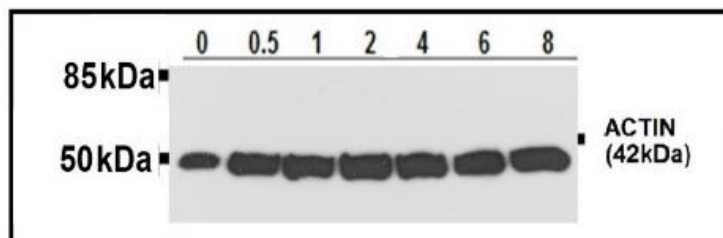


Figura 14. Western blot de β-actina. Análisis de 30 µg de proteína de extractos proteicos totales de monocitos U937 control y estimulados con LPS/PGE₂ (0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h).

7.4 INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)

El ChIP es un ensayo *in vivo*, que en este caso nos permite identificar interacciones funcionales de los factores de transcripción en estudio mediante la determinación de la interacción con sus sitios consenso dentro del promotor del gen de la IL-10. Estudios relacionados muestran que existen diferencias entre cada tipo celular y debido a que la técnica de ChIP es muy sensible existen etapas claves que requieren de estandarización, con los datos anteriores mostrados podemos postular que los factores de transcripción de interés pueden tener interacciones funcionales con la región del promotor de IL-10 en los múltiples tiempos de 0.5, 1, 4 y 6 h (picos de expresión) dependiendo del factor de transcripción analizado. Una vez determinada la expresión de la IL-10 y de los factores de transcripción de interés en nuestro modelo de monocitos U937 no estimulados y estimulados se procedió a estandarizar el tiempo de fijación de las proteínas al ADN, así como el tiempo de sonicación para fragmentar la cromatina como se describe a continuación.

7.4.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA FIJACIÓN DE PROTEÍNAS AL ADN Y FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA.

La fijación de las interacciones de las proteínas al ADN es crucial en el ensayo ChIP, puesto que a partir de aquí se hace la fragmentación, por un lado, el exceso de fijación puede ocasionar que la cromatina se proteja y no se fragmente, por el otro lado, si la fijación es inadecuada se pueden detectar interacciones no funcionales que llevan a interpretar los resultados como falsos positivos o se pueden perder interacciones funcionales entre las proteínas y el DNA. De acuerdo al modelo de estudio es necesario ajustar el tiempo de fijación, por ejemplo, el tiempo de fijación proteínas-ADN en un tejido o célula puede variar desde los 10 min como es el caso para células THP-1 o toda la noche para células de corazón del pez cebra adulto (Wang *et al.* 2012).

Para la técnica de CHIP en nuestro laboratorio, comenzamos por estandarizar la fijación y fragmentación de la cromatina en monocitos sin ningún tratamiento, seguido de su corroboración en monocitos no estimulados y estimulados con LPS/PGE₂.

Se formaron grupos experimentales de 2×10^7 monocitos U937 y se probaron tres condiciones de fijación con:

1. Formaldehído al 0.5 %,
2. Formaldehído al 1 % y
3. Formaldehído al 1 % con solución reguladora de pH (7.2 -7.4).

Posterior a la fijación, se hizo una curva de fragmentación de la cromatina por sonicación a 2, 4, 6 y 8 pulsos de 45" ON/60" OFF a 40 % de amplitud en un volumen de 1 mL de buffer RIPA. Los fragmentos de ADN fueron purificados y el tamaño se analizó en un gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5X teñido con bromuro de etidio. Los resultados mostraron que a la concentración de 1 % de formaldehído hay una resistencia a la fragmentación de la cromatina, debido al exceso de fijación de proteínas al ADN que lo protegen y lo hacen menos sensible a su ruptura (Figura 15), Se consideró que el pH es un factor que puede modificar la estructura terciaria de las proteínas, modificando así las interacciones, por tal razón un segundo grupo experimental fue tratado adicionando una solución reguladora de pH previa a la adición del formaldehído a la concentración final de 1 %, la figura 15 (parte central) muestra una resistencia a la fragmentación hasta los 2 pulsos, cuando la muestra fue sonicada a 4, 6 y 8 pulsos la resistencia a la fragmentación persistió, mostrando que el tamaño de los fragmentos fue semi-constante.

En el grupo experimental tratado con formaldehído al 0.5 % se obtuvo la escalera de cromatina fragmentada característica de una curva adecuada de sonicación, en donde, el tamaño de los fragmentos de ADN es menor cuando se aplica un número mayor de pulsos, mostrando un barrido uniforme que presenta una región enriquecida de fragmentos en un intervalo de tamaños (Figura 15, izquierda), el análisis de la curva de fragmentación del ADN fijado con FA al 0.5 % indico que a 4 pulsos se obtienen fragmentos abundantes < 1 Kb, ideales para la

región de análisis por PCR de punto final para la cual fueron diseñados los respectivos iniciadores.

El exceso de sonicación promueve la fragmentación de la cromatina generando fragmentos más cortos que no sirven para realizar la PCR amplicones de 827 y 962 pb, como el ADN está muy fragmentado se dificulta e imposibilita la amplificación y por lo tanto no se generan los productos de PCR del tamaño esperado, además se evita la reproducibilidad de los resultados en ensayos diferentes. Se debe señalar que en las tres condiciones de la fijación de proteínas al ADN, la cromatina se fragmentó en mayor o menor grado, ya que de lo contrario se observaría al ADN genómico en la parte superior del gel (Figura15).

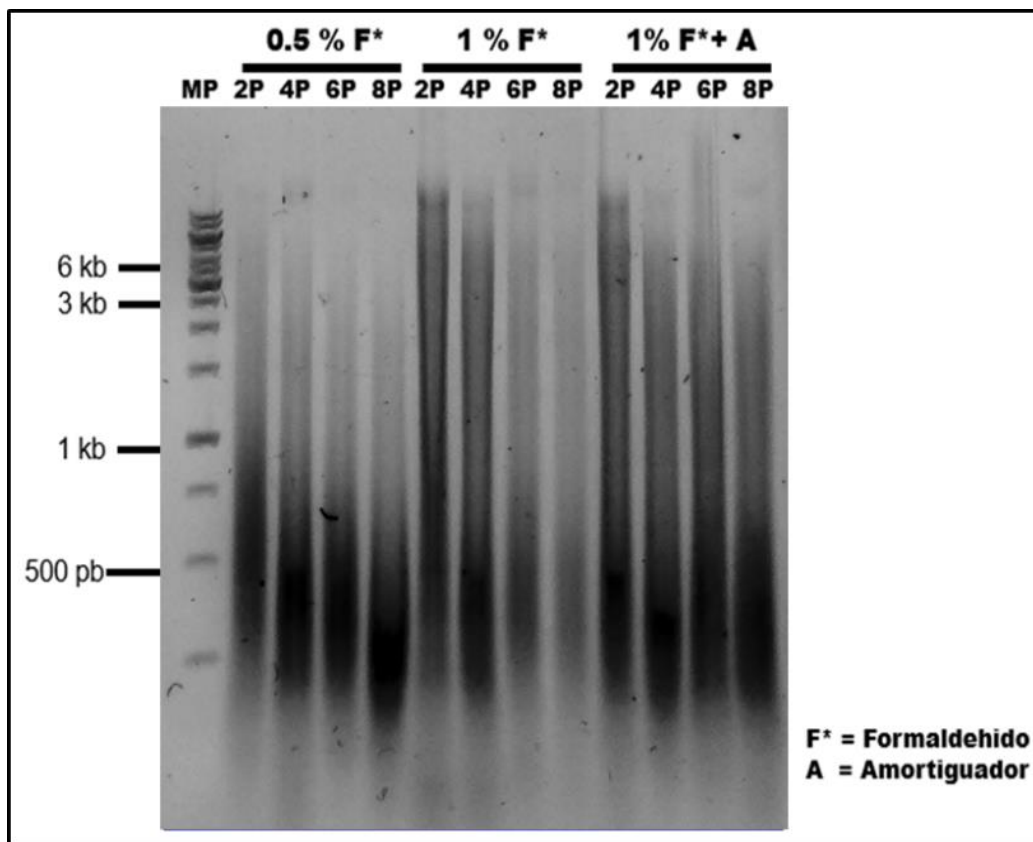


Figura 15. Fijación de proteínas y fragmentación de la cromatina de monocitos U937. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la curva de fragmentación de la cromatina por sonicación a 2, 4, 6 y 8 pulsos (45"ON/60"OFF a 40 % de amplitud) de monocitos U937 fijados con formaldehído al 0.5 %, 1 % y 1 % en solución amortiguadora.

La estandarización de la fijación y la sonicación, se confirmó por el análisis de 20 µl de las muestras de monocitos control y estimulados, que fueron tratadas en las condiciones seleccionadas de fijación con 0.5 % de formaldehído y sonicación de 45"ON/60"OFF a 40 % de amplitud, como se observa en la Figura 16, el patrón de fragmentación se mantiene, puesto que presentó el barrido de bandas esperado en el rango < 1 Kb en células control sin estimular (C) y estimuladas con LPS/PGE₂ durante 4 h y 6 h, lo cual indica que el estímulo no bloquea la fragmentación de la cromatina al aumentar la expresión de factores de transcripción y por ende el incremento de posibles interacciones ADN-proteína que impidan la fragmentación homogénea.

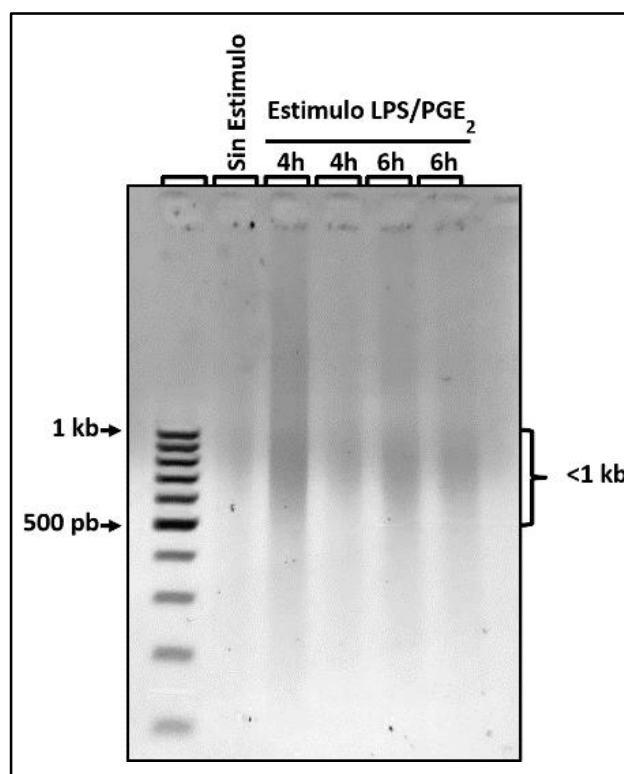


Figura 16. Fijación de proteínas con formaldehído al 0.5 % y fragmentación de la cromatina. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la fragmentación de la cromatina por sonicación (4 pulsos de 45"ON/60"OFF a 40 % de amplitud) de monocitos U937 control y estimulados 4 y 6 h fijados con formaldehído al 0.5 %.

Una vez confirmado el patrón de fragmentación, las muestras se sometieron a las siguientes etapas del ChIP, cabe señalar que estas condiciones fueron empleadas para la realización del protocolo de ChIP con el uso de perlas de agarosa acopladas a proteína G (PA)

en el volumen de 1 mL de buffer RIPA; sin embargo, también se utilizaron perlas magnéticas acopladas a proteína G (PM), por lo que se tuvo que estandarizar nuevamente la fragmentación, ya que, se requiere un volumen 5 veces menor (0.2 mL) para la precipitación de los complejos proteína-ADN-Ac. Se utilizaron las mismas condiciones de fijación y para la fragmentación se realizó lo siguiente:

Se formaron grupos de 10^6 monocitos U937, se fijaron con formaldehído a 0.5 % (concentración final) y se realizó una curva de fragmentación, sonicando a 0, 3, 6, 9, 12 y 15 pulsos de 10" ON/30" OFF a 30 % de amplitud en un volumen de final 0.2 mL (150 μ L de *buffer CHIP dilución* y 50 μ L *buffer CHIP lysis*), una fracción de 20 μ L de cada muestra fue sometido a purificación del ADN, fueron analizados los tamaños de los fragmentos de ADN en un gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5 X teñido con bromuro de etidio. En la figura 17 se muestra la escalera de fragmentación exitosa por sonicación y que la fragmentación requerida del ADN se obtiene entre los 3 y 6 pulsos de sonicación, diferente a lo observado para el protocolo con perlas de agarosa de 4 pulsos de sonicación, lo cual se debe a que el volumen de sonicación fue 5 veces menor, y por lo tanto cambió la relación células/volumen, la composición del buffer fue diferente, el tiempo del pulso se disminuyó 4.5 veces y la amplitud del pulso bajó a 30 %.

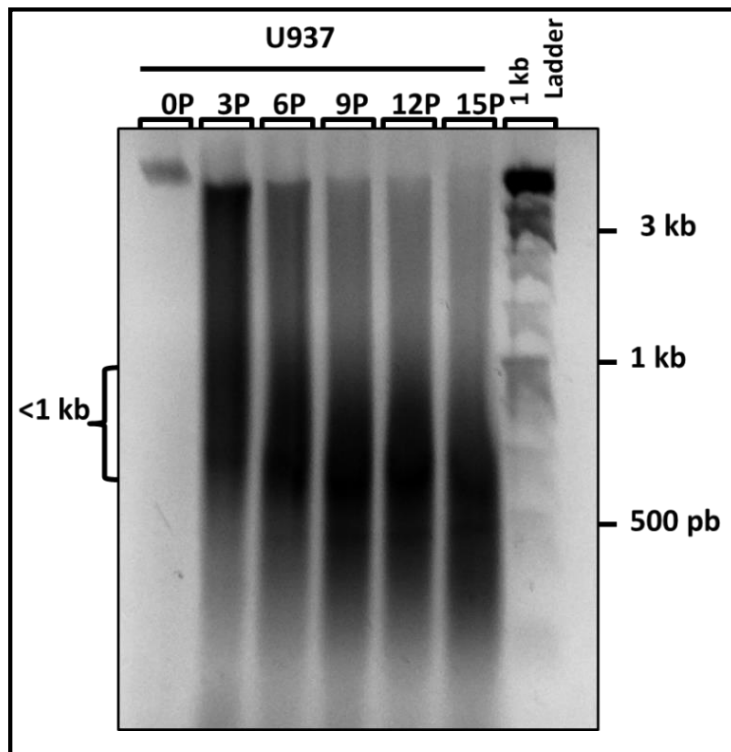


Figura 17. Fragmentación de la cromatina por sonicación. Gel de agarosa al 1 % de la curva de fragmentación de la cromatina por sonicación 10"ON/30"OFF a 30 % de amplitud a 3, 6, 9, 12 y 15 pulsos de sonicación de monocitos U937 fijados con formaldehído en una concentración final de 0.5 %.

El análisis de la región distal del promotor de IL-10 (-2519-1557 pb) de un tamaño de 962 pb requirió de muestras sonicadas con enriquecimiento en fragmentos de 1 Kb, por lo que se decidió encontrar la condición del número de pulsos ideal, por lo que grupos experimentales de 10^6 monocitos U937 fijados con formaldehído a la concentración final de 0.5 %, fueron sometidos a fragmentación de la cromatina por sonicación a 3, 4, 5 y 6 pulsos de 10" ON/30" OFF a 30 % de amplitud en un volumen de 0.2 mL de *buffer ChIP dilución* y *buffer ChIP lysis*, una fracción de 20 uL de cada muestra fue sometido a purificación del ADN y analizado sus tamaño en un gel de agarosa al 2 % con TBE 0.5 X teñido con bromuro de etidio (Figura 18), no se encontraron diferencias entre los pulsos bajo estas condiciones, por lo que se eligió la condición de 3 pulsos como la ideal por ser la condición con menor número de pulsos requeridos y que expone en menor grado de estrés a las muestras como: el calentamiento de las muestras, la degradación, la ruptura de interacciones, ruptura de enlaces peptídicos, etc. Sin embargo,

como las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 2 % se observa enriquecimiento de fragmentos menores a 800 pb.

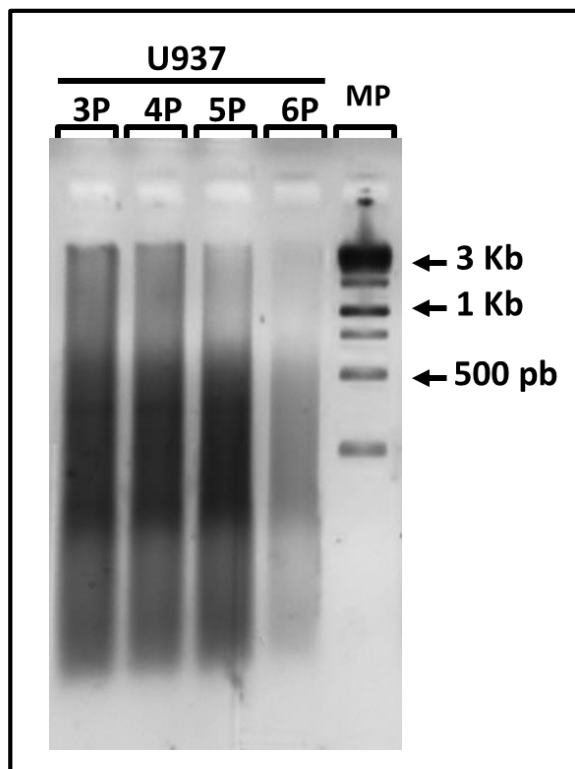


Figura 18. Fragmentación de la cromatina por sonicación. Gel de agarosa al 2 % de la curva de fragmentación de la cromatina por sonicación 10"ON/30"OFF a 30 % de amplitud a 3, 4, 5 y 6 pulsos de sonicación de monocitos U937 fijados con formaldehído a una concentración final de 0.5 %.

Al corroborar estas condiciones en las células control y estimuladas con LPS y PGE₂ durante 4 y 6 h, bajo las condiciones seleccionadas de fijación con 0.5 % de formaldehído y sonicación a 3 pulsos de 10"ON/30"OFF a 30 % de amplitud, el análisis de 20 µL de las muestras reveló que el barrido de fragmentación se mantiene en el tamaño esperado de ~1 Kb en monocitos sin estimular (C) y estimuladas (E) (Figura 19), y se comprobó nuevamente que el estímulo no bloquea la fragmentación de la cromatina por la posibilidad del incremento de interacciones ADN-proteína que impidan la fragmentación homogénea durante la expresión de IL-10.

También se debe considerar el hecho latente de que la fragmentación por sonicación tiene un patrón de corte al azar, donde ciertas regiones de ADN que interactúan más frecuentemente con proteínas quedan fijadas y causan resistencia a la fragmentación; sin embargo, regiones donde el nivel de interacciones es bajo se presentan sitios más susceptibles de fragmentación, la importancia radica en que si alguna de las regiones susceptibles de ruptura está incluida en la región de análisis por PCR, no se obtendrán los rendimientos o productos de amplificación esperados, por lo que se debe considerar amplificar regiones más cortas.

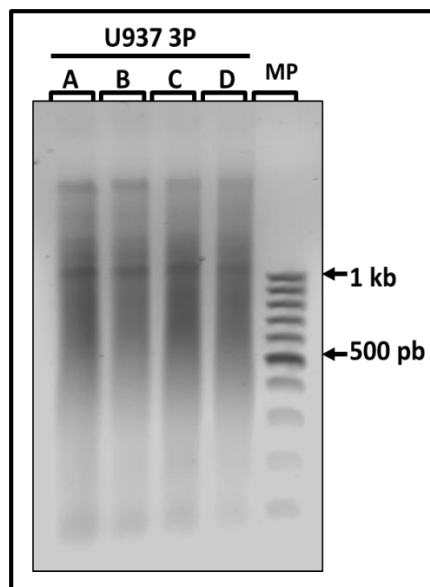


Figura 19. Sonicación de la cromatina de monocitos control y estimulados. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la fragmentación de la cromatina por sonicación (3 pulsos de 10"ON/30"OFF a 30 % de amplitud) de monocitos U937 fijados con formaldehído al 0.5 % no estimulados (A), estimulados 4 h (B) y estimulados 6 h (C y D).

7.4.2 ENSAYOS DE ChIP DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN: p50, NFAT Y Sp1

Una vez estandarizadas las etapas de fijación y fragmentación se procedió a realizar los ChIP de los factores de transcripción p50, NFATc1 y Sp1 en monocitos control y estimulados con LPS/PGE₂. Como se mencionó en la sección de material y métodos, antes de la etapa de inmunoprecipitación se resguardaron 20 µL de muestra sonicada de cada condición de monocitos control y estimulados así como para cada anticuerpo p50, NFAT y Sp1, que servirán

como control positivo para los ensayos de PCR, como esta muestra es una fracción de ADN total fragmentado tiene la peculiaridad de poder generar productos de amplificación para cualquier gen analizado por PCR, esta fracción será denominada *INPUT* y para su análisis le fue revertida la fijación de proteínas y el contenido de ADN fue purificado como se describió en la metodología.

La inmunoprecipitación de la cromatina se realizó con los anticuerpos correspondientes empleando perlas acopladas a proteína G, para determinar si los factores de transcripción NFATc1, NF- κ B (p50) y Sp1 se unen a sitios dentro del promotor de IL-10 bajo el estímulo de LPS/PGE₂. Posterior a la inmunoprecipitación, la extracción y purificación del ADN, este se analizó por PCR de punto final en la región proximal del pIL-10 de 865 pb (-827/+38 pb), que contiene sitios para NF- κ B (p50), NFAT y Sp1. Para el análisis de PCR de cada ensayo ChIP se debe tener un control de amplificación que corresponde a una muestra representativa de ADN sonificado sin inmunoprecipitación (*INPUT*). La PCR de punto final se realizó a partir 2 μ L del *INPUT* (ADN sin anticuerpo y sin inmunoprecipitar) diluido 1:100 y de las muestras directas obtenidas de los ChIP.

En la Figura 20 se muestra el ChIP para la proteína NF- κ B p50 (ChIP-p50), en el ChIP de las células control no se observa el amplicon de 865pb como se esperaba; sin embargo, no hubo amplicon en el *INPUT* (carriles 1 y 2); en el ChIP-p50 de células estimuladas 6 horas (E6h) se observó la presencia del amplicon de 865 pb, así como también en el *INPUT* (carriles 3 y 4). En el ChIP sin anticuerpo de células E6h y el control negativo de la PCR no se observó amplicon como se esperaba (carriles 6 y 7).

El análisis de los datos muestra que a 6 h de estimulación p50 tiene interacción con algún sitio de la región de -827 pb a +38 pb del promotor de IL-10, lo cual concuerda con el aumento de expresión de IL-10 y de p50 a 6 horas de estimulación. Al realizar el ChIP-p50 en monocitos control no se evidenció interacción funcional de p50 con su sitio, este resultado es posible puesto que en monocitos control no existe una expresión de p50. La PCR realizada en este ensayo para los productos de inmunoprecipitación de la cromatina fue con 5 μ L de los 15 μ L totales del

producto final de ChIP recuperado, factor que pudo haber determinado una menor cantidad de plantilla para la amplificación de los productos de la región analizada.

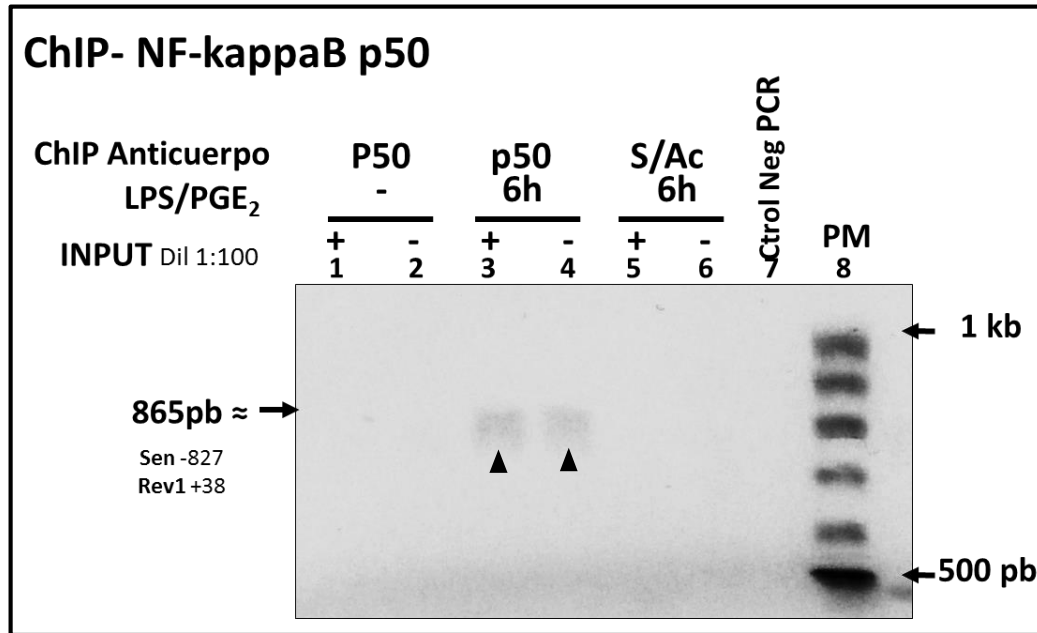


Figura 20. ChIP para NF- κ B (p50). INPUT=ADN DIL 1:100.

La bibliografía reporta que el heterodímero p50-p65 es la forma más frecuentemente detectada (Natoli *et al.* 2006). Otros estudios *in vitro* e *in vivo* mostraron que existe aumento de p50 de localización nuclear y la inhibición parcial de la translocación nuclear de p65 en monocitos tolerantes a LPS; se describió que p50 es un factor regulador esencial para la transcripción de genes en macrófagos tipo M2, por lo que el reclutamiento de p50 en el promotor de IL-10 sugiere que puede estar participando activamente, puesto que su expresión aumenta en diversos subgrupos de macrófagos tipo M2, donde puede haber interacciones p50-p50, p50-p65, p50-c-Rel y p50-RelB en tiempos específicos de estimulación inmediata o tardía, motivo por el cual se debe apostar fuertemente a realizar el ensayo de ChIP para p65 en nuestro modelo a fin de tener completo del rol de p50 con p65 o con el mismo p50.

La Figura 21 muestra el amplicon de 865 pb del ChIP-p50 de monocitos E6h y del INPUT de monocitos control (carriles 1 y 4). No se observó amplicon para los INPUT de células estimuladas 6 horas con y sin anticuerpo (carriles 3 y 5); tampoco se observó amplicon para el

ChIP de células control (carril 2). El control negativo de PCR y el control negativo de la inmunoprecipitación de células E6h sin anticuerpo no presentaron amplicon como era esperado (carril 6 y 8), estos resultados corroboraron la interacción funcional de p50 en la región de -827 pb a +38 pb del promotor de IL-10 que participa en la regulación de la expresión de IL-10 a 6 horas de estímulo con LPS/PGE₂; sin embargo, nuevamente se tuvieron problemas de amplificación con los *INPUT* lo que sugiere que debe realizarse una estandarización de la PCR antes del ChIP con cada muestra de *INPUT*.

También se realizaron paralelamente los ensayos de ChIP para Sp1 y NFATc1 para la misma región del promotor de IL-10, en células estimuladas 4 h, donde se observó el amplicon para el ChIP-Sp1 y para el *INPUT* y ChIP de NFATc1 (carriles 10, 11 y 12); sin embargo, no se observó amplicon para el *INPUT* de Sp1 (carril 9), esto nos permitió evidenciar la interacción funcional de NFATc1 y Sp1 con sus sitios de unión en la región del promotor de IL-10 de -827 a +38 pb a 4 h de estimulación. Esta estrategia permitió hacer un escaneo de tres factores de transcripción que interaccionan con sitios de unión en regiones amplias de ~ 1 Kb.

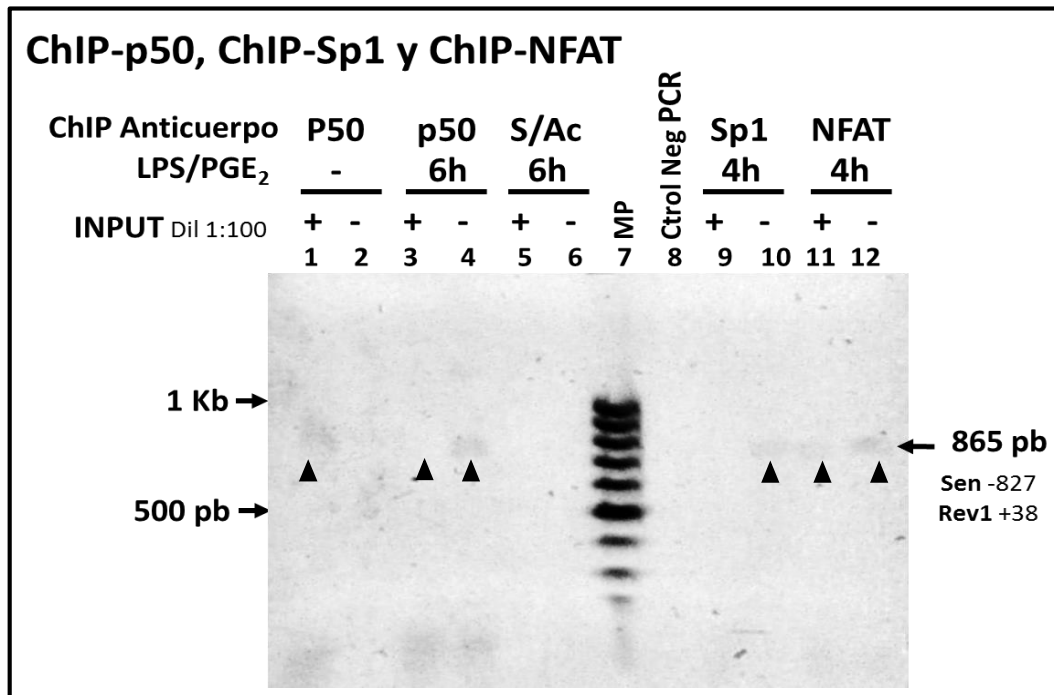


Figura 21. ChIP para NF- κ B (p50), ChIP para Sp1 y ChIP para NFATc1. ChIP para p50, NFATc1 y Sp1 en monocitos U937 control y estimulados con LPS/PGE₂ por 4 o 6 horas. *INPUT*=ADN DIL 1:100.

Los ensayos ChIP que se presentan a continuación, fueron realizados empleando perlas magnéticas acopladas a proteína G y alícuotas de 10^6 células, los tiempos de incubación de los extractos con el anticuerpo fueron de 1 h y en rotación con las perlas 3 h. En las Figuras 22A y 22B se muestran los resultados de los ChIP para p50 y ChIP para NFAT1 en donde se observa el amplicon esperado así como una amplificación comparable en todos los *INPUT* de monocitos C y estimulados 6 h; sin embargo, no pudimos observar amplificación en los ChIP-p50 y ChIP-NFAT1 de monocitos control y estimulados.

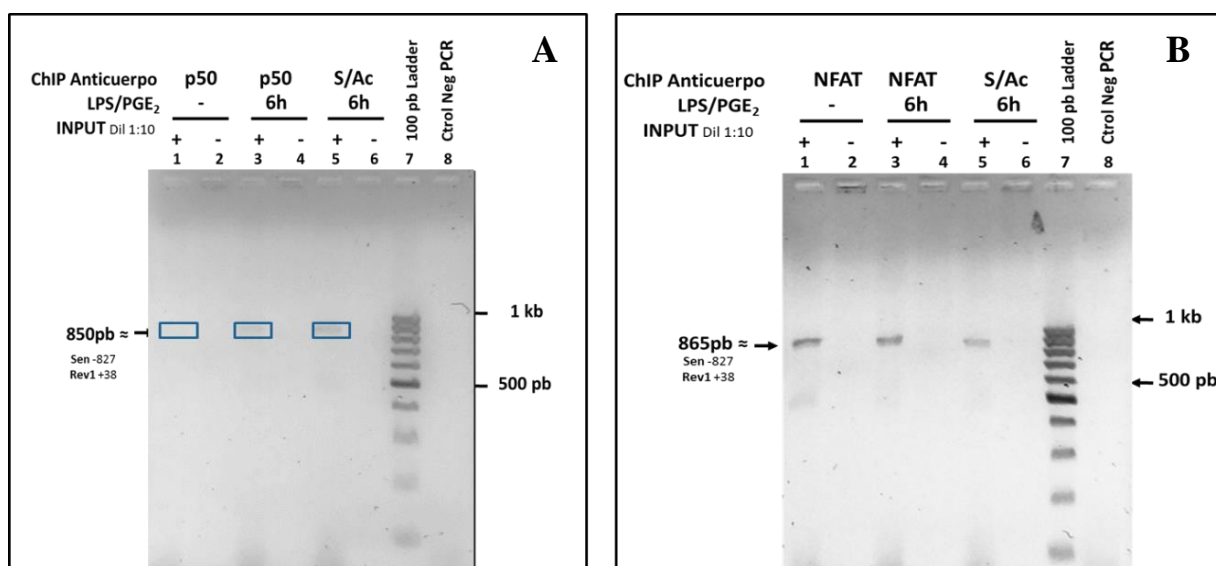


Figura 22. ChIP para p50 y NFAT1. (A) ChIP para NF- κ B (p50) y (B) ChIP para NFAT1 en monocitos U937 control y estimulados con LPS/PGE₂ por 6 h. INPUT=ADN DIL 1:100.

Para los siguientes ensayos de ChIP se aumentó la cantidad de monocitos y el tiempo de incubación con el anticuerpo, con el fin de tener una mayor saturación de proteínas que pudieran interactuar con el anticuerpo de la inmunoprecipitación y lograr determinar interacciones funcionales en la región del promotor de IL-10. Para discriminar interacciones entre sitios cercanos se analizaron regiones más cortas y excluyentes de sitios dentro de la región de -827 pb a +38 pb y lograr determinar interacciones funcionales en la región distal del pIL-10.

Debido a que estudios previos de nuestro laboratorio mediante ensayos de superretardamiento en gel determinaron complejos formados con las proteínas p50 y p65 en el

sitio distal de NF- κ B -1975/-1964 pb (Landeros *et al.*, 2005), y que el análisis *in silico* mostró que el pIL-10 contiene varios sitios de unión a NF- κ B, se realizó un ensayo donde se estudió una región de 962 pb (-2519/1557 pb) (Figura 23); donde no se observó interacción funcional, sin embargo, probablemente no se obtuvieron suficientes fragmentos de 1 Kb para obtener una buena amplificación, por lo que se decidió por un lado mandar a sintetizar iniciadores que abarcaran regiones de 300 a 400 pb, y así hacer el análisis en regiones más cortas y excluyentes.

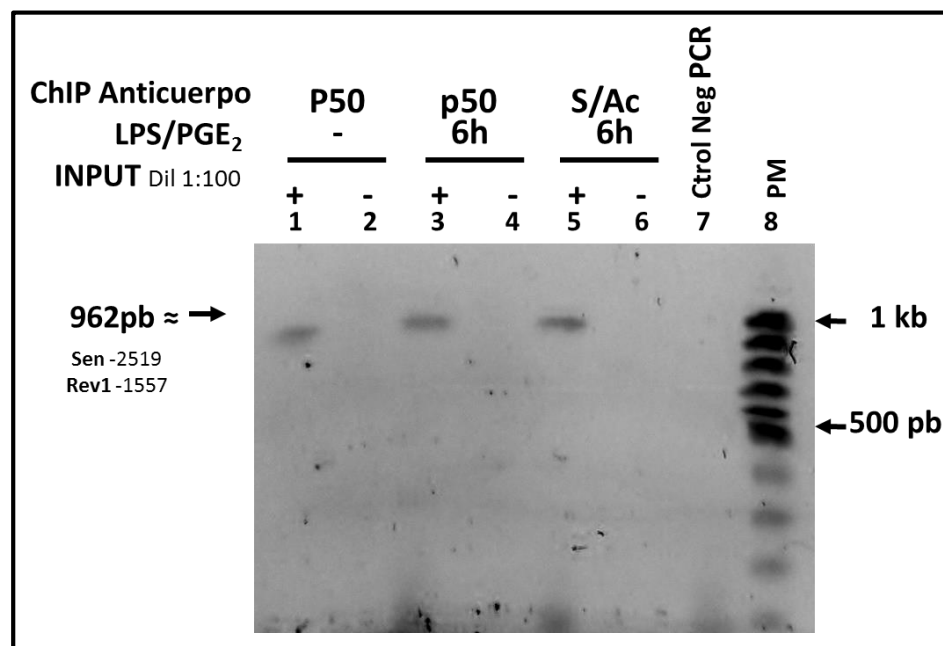


Figura 23. ChIP para NF- κ B (p50) de la región distal del pIL-10. INPUT=ADN DIL 1:100. PM= Marcador de peso

En la Figura 24 se muestran los resultados de otro ensayo de ChIP-p50, pero esta vez para una región proximal del pIL-10. En esta ocasión se duplicó el número de monocitos, por lo tanto, se formaron grupos de 2×10^6 células, los tiempos de incubación de los extractos proteicos totales con el anticuerpo fueron de 6 h en rotación con las perlas toda la noche. Se utilizaron dos pares de iniciadores específicos que generan fragmentos de 546 pb y 168 pb respectivamente. En la imagen se observa el amplicon esperado y amplificación comparable en todos los INPUT de monocitos control y estimulados con LPS a 0.5 h y 4 h. No se observó amplificación en el ChIP-p50 de células control y estimuladas para el sitio NF- κ B_{proximal} (-464/-455 pb) empleando los dos grupos de iniciadores específicos.

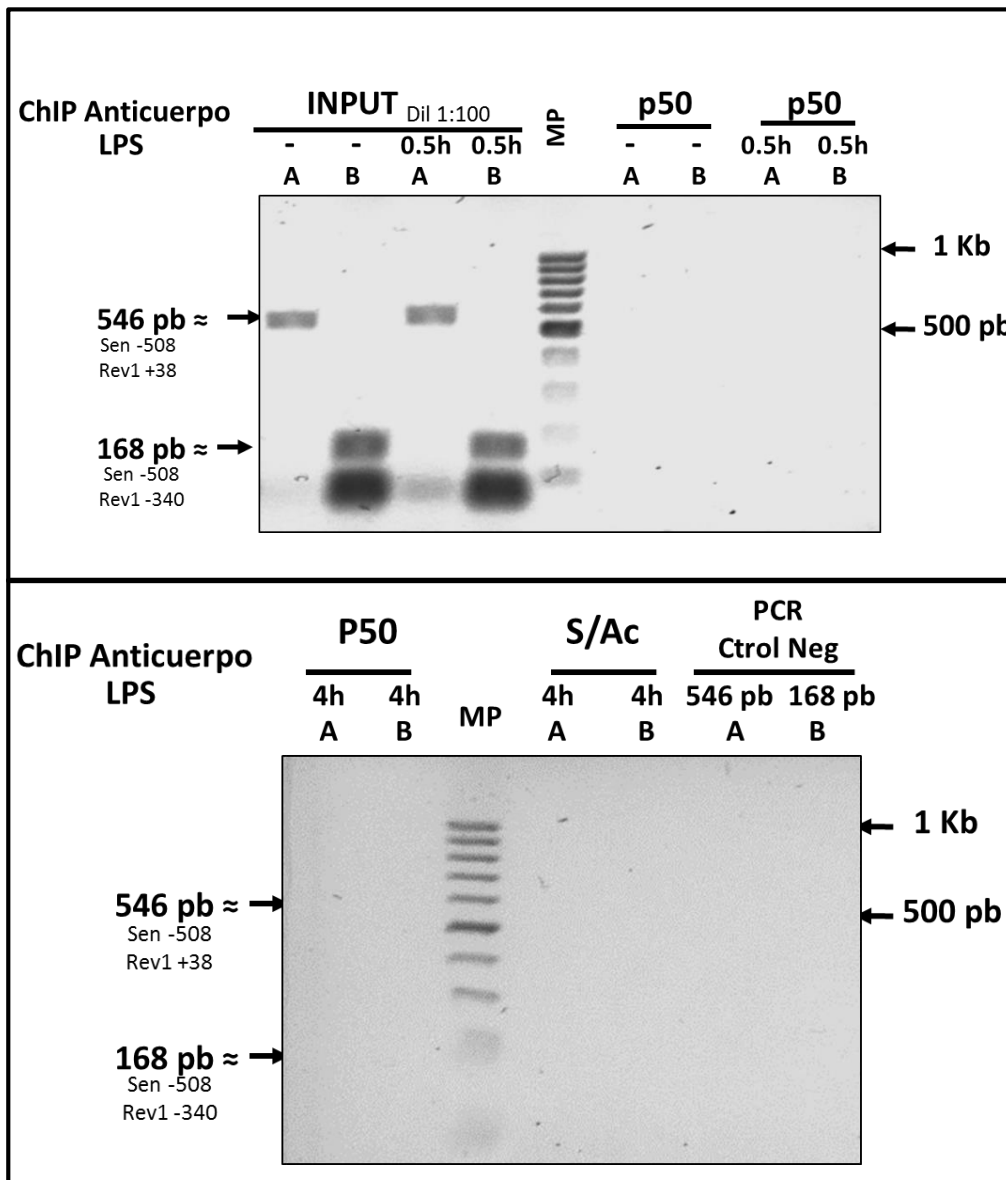


Figura 24. ChIP-p50 de monocitos U937 control y estimulados con LPS a 0.5 h y 4 h por 2 regiones de análisis incluyendo el sitio proximal NF- κ B (-464 pb). INPUT DIL 1:100.

El análisis del ChIP para NFAT1 se realizó en grupos de 2×10^6 de monocitos control y estimulados 6 h con LPS/PGE₂ de regiones cortas y excluyentes para sitios NFAT, que contienen el sitio compuesto de NFAT/AP-1 (-656 pb) o el sitio NFAT_{proximal} (-181 pb), se realizó modificando los tiempos de incubación con el anticuerpo a 6 h y con perlas magnéticas en rotación por 12 h, esperando tener una mayor recuperación de fragmentos de ADN. En la Figura 25 se puede observar que no hubo interacción funcional en los sitios probados del

promotor de IL-10; sin embargo, todos los *INPUT* presentaron productos de amplificación comparable en células control y estimuladas 6 h, los controles negativos de PCR para los dos conjuntos de iniciadores no presentaron producto de amplificación como era esperado.

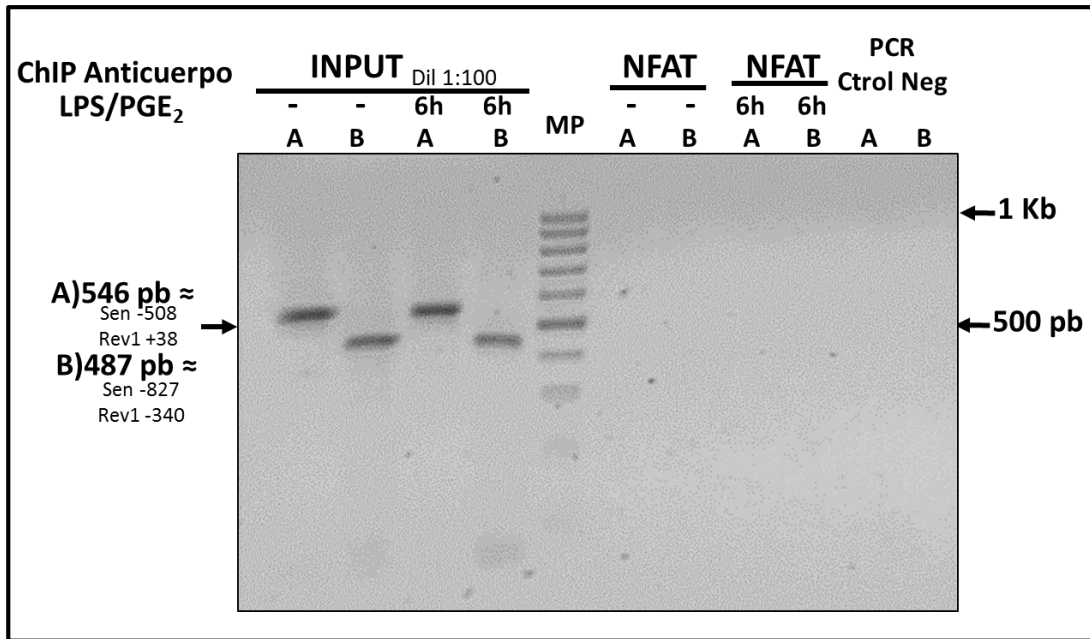


Figura 25. ChIP para NFAT1. ChIP-NFAT de grupos de 2×10^6 monocitos control y estimulados 6 h, con análisis de regiones excluyentes de los sitios NFAT/AP-1 (-656 pb) y NFAT (-181 pb). INPUT DIL 1:100.

El siguiente ensayo de ChIP para NFATc1 fue realizado duplicando los grupos de 2×10^6 de monocitos control y estimulados por 6 h con LPS/PGE₂ (Figura 26) analizando las mismas regiones cortas excluyentes para los sitios NFAT: sitio compuesto de NFAT/AP-1 (-656 pb) y sitio NFAT_{proximal} (-181 pb), el tiempo de incubación con el anticuerpo fue de 6 h y con las perlas magnéticas para la inmunoprecipitación de 12 h en rotación continua, los productos finales de los grupos duplicados fueron reunidos en la etapa de precipitación del ADN durante la purificación (relativo al ChIP de grupos de 4×10^6 células), en la Figura 26 se puede observar la interacción funcional en el sitio NFAT/AP-1_{proximal} (-656 pb) observándose el amplicon esperado de 487 pb; sin embargo, no fue posible determinar interacción en el sitio NFAT_{proximal} (-181 pb) en monocitos estimulados 6 h, todos los *INPUT* amplificaron como se esperaba.

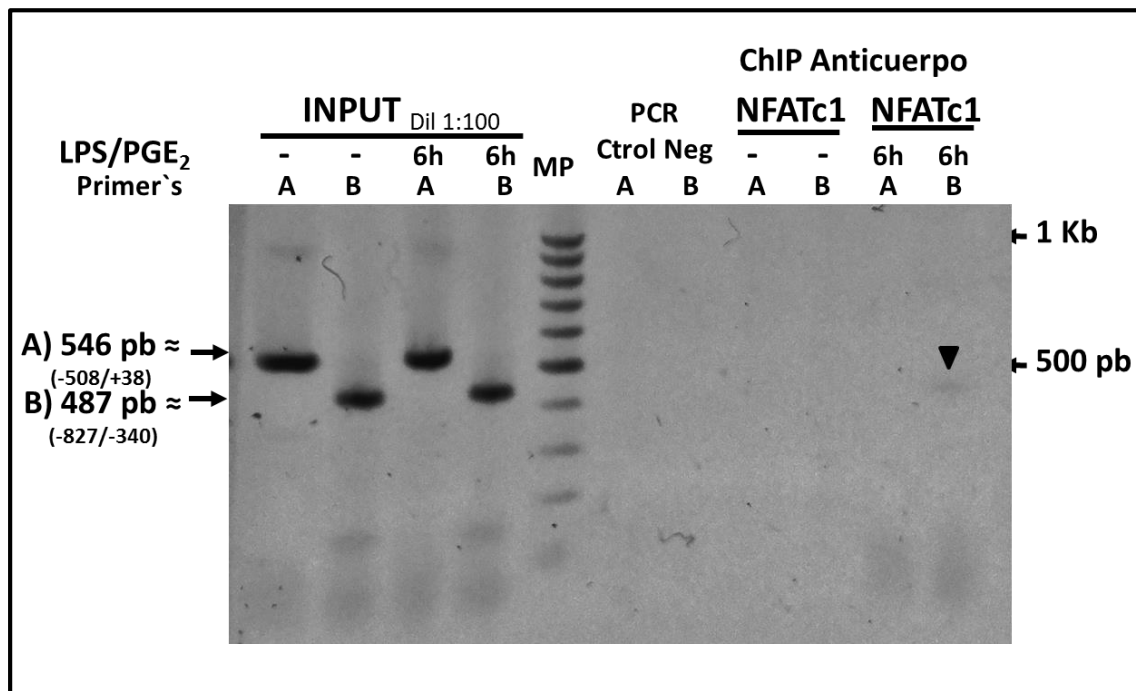


Figura 26. ChIP-NFATc1. ChIP para NFATc1 de 4×10^6 monocitos U937 control y estimulados 6 horas, con análisis de regiones excluyentes de los sitios NFAT/AP-1 (-656 pb) y NFAT (-181 pb). INPUT DIL 1:100.

7.5 INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS (IP)

El siguiente objetivo planteado en este trabajo, consistía en determinar las interacciones de los factores de transcripción NF- κ B (p50 y p65), NFAT, Sp1 y AP-1 (c-Jun) mediante el ensayo de Inmunoprecipitación de proteínas (IP) y el análisis por western blot (WB).

En la Figura 27 se muestra el ensayo de western blot para la inmunoprecipitación de p50 con perlas de agarosa, los carriles 1 y 2 corresponden a NF- κ B (p50) de células control y estimuladas 6 h respectivamente, se puede observar que después de la estimulación hay mayor cantidad de proteína p50 como se refiere en el aumento de expresión de p50 determinado en su cinética. El carril 4 es un control negativo de la inmunoprecipitación sin anticuerpo el cual indica que no existen pegados inespecíficos de proteínas a las perlas. Los carriles 5, 6, y 7 corresponden a las interacciones p50-Sp1, p50-NFATc1 y p50-p65 en condiciones de 6 h de

estimulación, puesto que se observa señal que corresponden a los pesos moleculares de las proteínas probadas: 70 KDa para Sp1, 90 KDa para NFATc1 y 65 KDa para p65, esto datos pueden ser correlacionados directamente con las interacciones determinadas en los ensayos de ChIP para p50, Sp1 y NFATc1 en la región de -827 pb a +38 pb del pIL-10 y con otros estudios que evidencian interacciones p50-p65 en el promotor de IL-10 e IL-12 de macrófagos estimulados con LPS (Cao *et al.* 2006), también heterodímeros p50- p65 en ensayos *in vitro* de monocitos U937 estimulados con LPS/PGE₂ interaccionan con el sitio NF-κB (-1973 pb) (Landeros, 2005). La presencia del factor de transcripción NFAT en sitios compuestos que interaccionan con AP-1 (c-Fos-c-Jun) (Macian *et al.* 2000), también ha sido descrito interacciones por inmunoprecipitación de NFAT-p65 en linfocitos B (Pham *et al.* 2005).

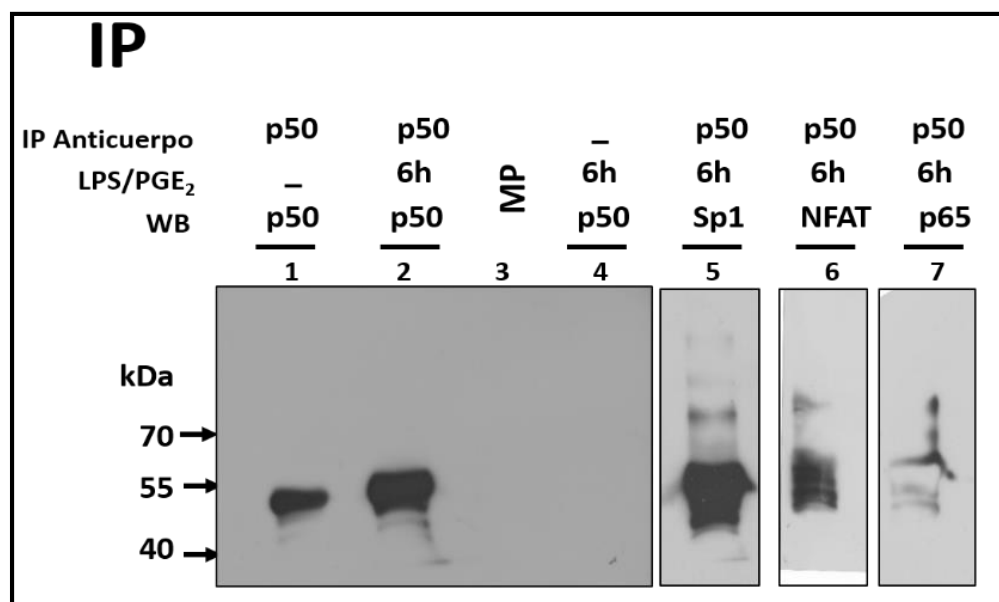


Figura 27. IP de NF-κB (p50) de monocitos U937 control y estimulados. Análisis de la IP de NF-κB (p50) mediante western blot revelando por quimioluminiscencia, mostró la presencia de NF-κB (p50, p65), Sp1 y NFATc1 en extractos de monocitos estimulados 6 h.

En la figura 28 muestra la membrana PDVF teñida con azul de Coomassie R-250 que se usó para la IP con p50, donde se puede observar la presencia de las bandas de proteína correspondientes a la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo empleado, cabe mencionar que la cadena pesada de la inmunoglobulina tiene un peso de 54 kda muy cercano al peso del factores de transcripción de la IP realizada (p50) de ≈49 KDa, lo que indica que la banda de la

cadena pesada enmascara a la señal de p50. Para evitar este efecto en los siguientes ensayos de IP se utilizó el mismo anticuerpo anti-p50; sin embargo, se utilizará el anticuerpo secundario anti-Rabbit easy blot, que es capaz de reconocer la fracción cristalina del anticuerpo primario solo en su estructura terciaria, evitando la reacción cruzada con el anticuerpo de la IP (anti-Rabbit) que se encuentra desnaturizado posterior al corrimiento de electroforesis en SDS-PAGE.

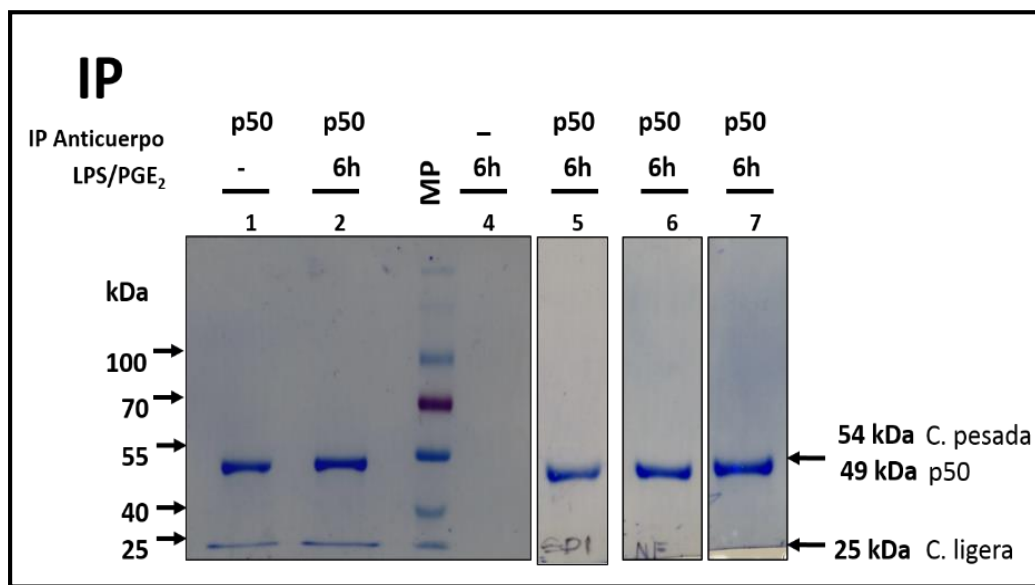


Figura 28. Membrana PVDF empleada en el western blot de la IP para p50. Tinción de la membrana con Azul de Coomassie R-250.

Con estos resultados se sugiere que la proteína p50 forma complejos proteicos donde participan Sp1, NFATc1 y p65 en monocitos U937 estimulados con LPS/PGE₂, sin embargo, se tienen que explorar la presencia de otras proteínas que pudieran estar formando estos complejos.

Se realizó nuevamente la IP para p50 con 600 µg de proteína por grupo experimental, empleando perlas magnéticas acopladas a proteína G. El revelado del western blot por quimioluminiscencia con anti-p50 corroboró el aumento de expresión de p50 en células estimuladas 6 h (Figura 30A); el western blot para p50 e IL-10 de 50 µg de proteína mostró un

aumento de la expresión en células estimuladas 6 h con respecto a monocitos control sin estímulo, como gen constitutivo y control de carga se empleó β -actina (Figura 29A Izq). Al realizar la IP para Sp1 y NFAT1 y revelar con anti-Sp1 y anti-NFAT1 respectivamente se mostró un aumento de ambas proteínas en células estimuladas respecto a las células control (Figuras 29B y 29C); en el western blot de la IP-Sp1 para p65 y de la IP-NFAT1 para STAT3, no se logró evidenciar la presencia de estas proteínas (dato no mostrado).

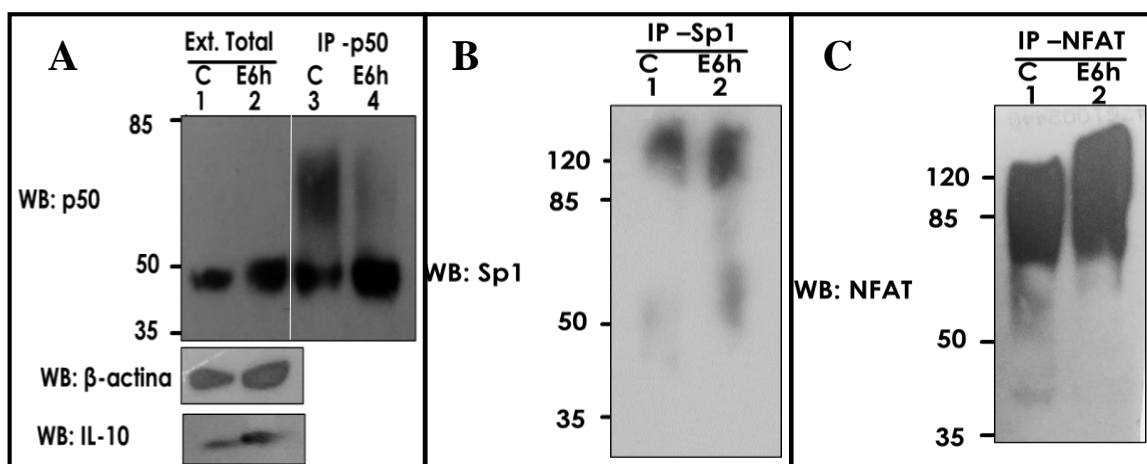


Figura 29. IP para los factores de transcripción p50, Sp1 y NFAT1. En todos los casos se usaron 600 μ g de proteína de monocitos U937 control y estimulado 6 h. (A) Carriles 1 y 2, Análisis de 50 μ g de proteína por western blot de p50, β -actina e IL-10. Carriles 3 y 4, IP-p50 de células control y estimuladas revelada con anti-p50. (B) IP-Sp1 revelada con anti-Sp1. (C) IP-NFAT1 revelada con anti-NFAT1.

Es importante considerar que la bibliografía reporta que los 5 miembros de la familia NF- κ B pueden formar diferentes combinaciones de dímeros, pero el heterodímero p50-p65 es la forma más frecuentemente detectada (Natoli *et al.* 2006), y teniendo presente que sólo una fracción de p65 es fosforilada (serina 536 o serina 468) y que el sitio de fosforilación impacta en la expresión de genes de forma específica (Moreno *et al.* 2010) podemos explicar porque los niveles de p65 fueron indetectables en el western blot de 30 μ g de proteína (Figura 11) muy inferiores a los mostrados por p50 en la coimmunoprecipitación (Figura 28); sin embargo, fue determinada la interacción de p50 y p65 en monocitos estimulados con LPS/PGE₂ por 6 h y que esta interacción pudiera ser suficiente para ejercer el aumento de la expresión de IL-10 en monocitos estimulados.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de la caracterización *in silico* del promotor de IL-10 de la región de -2500 pb a +38 con los programas: ConSite, LASAGNA 2.0, AliBaba 2.1, P-MATCH y PATCH, permitieron determinar 86 secuencias conservadas de posibles sitios de unión para los factores de transcripción NF- κ B, Sp1, STAT3, NFAT y AP1 (Figura 4), este resultado es debido al empleo de diferentes modelos matemáticos de cada programa, razón por la cual se tiene diferente sensibilidad y por ende diversidad en los resultados arrojados de un programa respecto a los otros, la importancia de los factores de transcripción radica en que son necesarios para reclutar la maquinaria general de transcripción y la presencia de los posibles sitios de unión sugiere fuertemente interacciones TF-ADN en el promotor para la regulación de la expresión de IL-10, también se debe mencionar que el análisis *in silico* no permite distinguir entre sitios que tienen una función *in vivo* y sitios que no tienen función, esto refleja un elevado número de sitios falsos positivos. Además, se han descrito numerosos ejemplos donde la presencia de un mismo sitio de unión para un factor de transcripción en el mismo gen, pero en diferente tipo de célula, produce diferencias en la expresión y en las interacciones funcionales TF-ADN, lo cual determina el efecto de un estímulo para cada tipo celular, por ejemplo; se identificó el papel de p50 en la transcripción de la citocina antiinflamatoria (IL-10) en el promotor proximal en el sitio -55/ -46 pb en macrófagos de ratón estimulados con LPS (Cao *et al.* 2006), estos resultados son consistentes con las observaciones experimentales donde se informó que la expresión de IL-10 solo se relaciona con una alta expresión de p50 en linfocitos T estimulados con LPS (Mori *et al.* 1997). Otros estudios demuestran que la producción de citocinas como IL-12p35 e IL-12p40, promovidas por la estimulación con LPS es inhibida por IL-4 e IL-13 (Hart *et al.* 1990; Cheung *et al.* 1990), sin embargo, el pretratamiento de macrófagos de sangre periférica con IL-13 e IL-4 incrementa la producción de IL-12p35, IL-p40 y TNF- α en respuesta al LPS (D'Andrea *et al.* 1995).

Se manifiesta que ningún programa tiene el 100% de cobertura para los sitios de unión a factores de transcripción, indicando la importancia del uso de diferentes programas para este tipo de análisis. las diferencias de porcentaje de cobertura de los programas, permiten describir

que un solo programa no es capaz de predecir todos los posibles sitios de unión a factores de transcripción; sin embargo, la información recabada no es del todo cierto, puesto que el comportamiento de cada programa muestra cierta tendencia a determinar algunos factores de transcripción respecto a otros, y que los criterios de búsqueda y el algoritmo empleado sea tan rígido que prácticamente no permite encontrar sitios de unión o lo contrario que tengan menor especificidad y reconozcan múltiples secuencias como sitios posibles de unión (Figura 5), el uso de múltiples programas permite determinar un número mayor de sitios de unión respecto a la caracterización realizada por Landeros 2005 (Figura 2), sin embargo esto requiere hacer un estudio más exhaustivo de las interacciones funcionales.

Los resultados de la expresión del gen de IL-10 determinada a nivel de transcripción por RT-PCR (Figura 8) y a nivel de proteína por western blot (Figura 9) en la línea celular de monocitos U937 sin estímulo y estimulados con LPS/PGE₂ durante 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 horas, reveló que los niveles de expresión de ARNm de IL-10 fueron variables dependiendo del tiempo de incubación con el estímulo, también se observaron dos comportamientos; a tiempos cortos de 0.5 h de estimulación un pico máximo de expresión con un aumento del doble del ARNm de IL-10 respecto a monocitos control, el cual disminuyó a niveles basales a las 2 horas de estimulación, posteriormente se pudo apreciar un segundo incremento gradual dependiente del tiempo a partir de las 2 h de estímulo, alcanzando el máximo a las 8 h de estimulación con un aumento de 6 veces respecto a monocitos control. Estos resultados concuerdan con la expresión de IL-10 a nivel de proteína, observando un pico a las 0.5 h de estimulación con un incremento del doble con respecto a las células control, sin embargo, la expresión de la proteína disminuyó a los niveles basales a la hora de estimulación, y volvió a aumentar a partir de las 2 horas hasta las 8 horas de estimuló donde se presentó el pico máximo con un aumento de 4 veces respecto a las células control.

Estudios de laboratorio reportan diferencias de expresión de ARNm de IL-10 entre diferentes tipos de células como macrófagos, linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas, control y estimuladas con LPS o PMA (Tone *et al.* 2000) también se reconoce que las cinéticas de expresión del ARNm de IL-10 varían de acuerdo al estímulo, por ejemplo, monocitos de

ratón diferenciados en células de kupffer y estimulados con LPS presentaron niveles bajos de ARNm en un intervalo de 0 a 72 h, con un pico máximo de expresión a las 6 h y un incremento máximo de 2 a 3 veces superior respecto a células no estimuladas (Thompson *et al.* 1998), un trabajo previo en nuestro laboratorio en macrófagos estimulados con LPS/PGE₂ mostró un nivel de expresión máximo de IL-10 a las 8 h de estimulación con un incremento 6 veces superior respecto a células control (Morales, 2005); por otra parte en macrófagos diferenciados de monocitos de cultivos primarios de medula ósea estimulados con LPS y complejos inmunes se determinó el aumento de expresión del ARNm de IL-10 con un pico máximo a los 60 min de estimulación retornando a niveles basales a las 2 h, el aumento reportado en células estimuladas fue tres veces superior respecto a células control no estimuladas (Xia *et al.* 2006). Con estas y otras evidencias se demuestra la dinámica remodelación que sufre el promotor de IL-10 durante la transcripción para su expresión y que estímulos específicos determinan un aumento específico de los niveles de expresión de IL-10 en macrófagos (Bartosh *et al.* 2013; Ylostalo *et al.* 2012).

El análisis de la expresión de IL-10 en extractos proteicos totales de monocitos U937 control y estimulados con LPS y PGE₂, mostró un aumento del doble de expresión a las 0.5 h de estimulación respecto a monocitos control y que ésta disminuyó hasta prácticamente niveles basales a 1 h de estimulación, sin embargo, la expresión de IL-10 a partir de las 2 hasta las 8 horas presenta un comportamiento de incremento respecto del tiempo, teniendo un pico máximo de expresión a las 8 h de estimulación, donde se presentó una expresión superior a 4 veces respecto a células no estimuladas, correlacionando un comportamiento similar a la cinética presentada para el análisis del ARNm. Otros estudios del análisis de la expresión de IL-10 a nivel de proteína al igual que para el ARNm, se determinaron diferencias entre varios tipos de células e inclusive entre células provenientes del mismo donador pero de diferente localización, también, se ha reportado que la diferenciación celular y la polarización de los macrófagos generan diferencias amplias en los niveles de expresión de las citocinas (Mantovani *et al.* 2002) y que la diferenciación de monocitos a células dendríticas *in vitro* inicia a las 4 h de la estimulación clásica con IL-4 y GM-CSF, también se describe que el estímulo de LPS/PGE₂

incrementa la expresión de IL-10 en macrófagos estimulados durante 12 h hasta 100 veces mayor respecto a células control (Bartosh *et al.* 2013; Ylostalo *et al.* 2012).

En nuestro laboratorio se determinó un aumento de la expresión de IL-10 dos veces mayor con PGE₂ o LPS (estimulos separados), en macrófagos estimulados con LPS/PGE₂ diferenciados de monocitos U937 (Morales 2003); los resultados obtenidos demuestran que el estímulo de LPS y PGE₂ en monocitos U937 induce la expresión de IL-10, presentando dos picos de expresión de proteína que se correlacionan con los cambios de nivel de expresión del ARNm en el interior de las células, este resultado es consistente con resultados previamente reportados de expresión de IL-10 en macrófagos estimulados con LPS, PGE₂ y LPS/PGE₂ (Morales 2003; Mackenzie *et al.* 2013).

Los resultados obtenidos demuestran que hay una correlación de la expresión de IL-10 a nivel de ARNm y de la proteína, puesto que los monocitos U937 estimulados con LPS/PGE₂ presentan los picos de expresión a las 0.5 y 8 h.

El análisis de las cinéticas de expresión para NF- κ B (p50 y p65), mostró para p50 un aumento de expresión a la hora de estimulación disminuyendo fuertemente a las 2 h y aumentando nuevamente a partir de las 4 h hasta alcanzar una máxima expresión a las 8 h, por otra parte, a partir de las 2 h hasta las 8 h de estimulación encontramos un comportamiento de incremento gradual de IL-10 y p50 respecto al tiempo con un pico máximo a las 8 h de estimulación, esto evidencia que p50 actúa regulando positivamente la expresión de IL-10 en monocitos estimulados, sin embargo, en monocitos control y estimulados con LPS y PGE₂ no pudo ser detectado p65 (Figura 10). Está reportado que los miembros de la familia NF- κ B se degradan muy rápido una vez que están activados, de manera que suelen presentar un pico alto de actividad en un tiempo muy corto y que la presencia de un segundo pico tiene que ver con la degradación de isoformas, por lo que presentan un efecto regulador sobre sí mismos bloqueando la actividad de unos miembros mientras inducen otros, lo que hace que tengan un efecto transitorio y que esta señal tenga efectos locales en tiempos sumamente cortos (Ghosh *et al.* 1998). Esto puede relacionarse con los dos picos de expresión encontrados para p50 que

podría estar regulando la expresión de p65 en monocitos control y estimulados no logrando su identificación por western blot en las condiciones descritas, razón por la que se sugiere el análisis con una mayor cantidad de proteína o su análisis en tiempos más cortos, puesto que en el ensayo de IP fue detectada la presencia de p65, es probable que aún la concentración baja de p65 en monocitos tenga un papel activo en la regulación de la expresión de IL-10.

Otros trabajos describen que p50 puede tener interacciones con otros factores de transcripción, que le confieren mayor afinidad en ciertas secuencias consenso respecto a otras secuencias similares, también ha sido determinada la unión de homodímeros de p50 a 0.5 h en el promotor de IL-10 y heterodímeros p50-p65 en el promotor de IL-12 en macrófagos de ratón estimulados con LPS durante 3 h, el mismo estímulo promovió la asociación de p65 y c-Rel en el promotor de IL-12 a 16 h (Cao *et al.* 2006); también se evidenció que p65 inhibe, mientras que p50 activa promotores con secuencias GAS como el promotor de IL-6; se mostró que el homodímero p50 presenta efecto cooperativo con STAT3 no fosforilado para ejercer acción sobre secuencias GAS (Yoshida *et al.* 2003); estos y otros estudios sugieren la participación de p50 en la regulación de sistemas pro- y anti-inflamatorios en diferentes sitios de unión. Un antecedente directo de nuestro laboratorio determinó mediante ensayos de superretardamiento en gel, heterodímeros p50-p65 en un sitio distal NF- κ B del promotor de IL-10 en macrófagos U937 estimulados con LPS/PGE₂ (Landeros, 2005). Recientemente, hemos realizado cinéticas de expresión de diferentes factores de transcripción en macrófagos diferenciados de monocitos U937 con PMA y estimulados con LPS y PGE₂, donde observamos que p65 se expresa en mayor o menor grado en los tiempos estudiados de 0.5 a 8 h de estimulación (datos no mostrados), lo que apoya los trabajos mencionados, que dependiendo de las condiciones y estímulos, un mismo gen se expresa de forma diferente de acuerdo al tipo celular, como es el caso de monocitos sin diferenciar o diferenciados a macrófagos.

La expresión de c-Fos se observó únicamente a las 4 h de estimulación (Figura 12), sí bien la expresión de IL-10 incrementa a partir de este tiempo hasta llegar a su máxima expresión a las 8 h, no se puede afirmar que c-Fos tenga una participación en la regulación de su expresión, aunque se ha descrito que c-Fos se induce rápidamente durante la diferenciación celular

(Greenberg *et al.* 1985; Kruuer *et al.* 1985), incluyendo la inducción en células mieloides de macrófagos (Mitchell *et al.* 1985; Sariban *et al.* 1985), estudios en monocitos estimulados con PMA asociaron un rápido y transitorio aumento de c-Fos. Por otra parte, se reconoce que el nivel de transcritos de c-Fos en monocitos sin estímulos se controlan a nivel pos-transcripcional, e inclusive que los niveles detectados de ARNm son bajos o indetectables (Sariban *et al.* 1988). Se debe considerar realizar un análisis con una cantidad mayor de extractos proteicos para comprobar si es que c-Fos se expresa sólo a las 4 h de estimulación o presenta una cinética diferente de expresión, por otro lado considerar que otros autores han descrito que p50 y p65 inducen la transcripción de c-Jun y que c-Jun interacciona con c-Fos uniéndose a sitios AP-1 (c-Fos-c-Jun), por lo tanto, se debe explorar también la presencia de c-Jun o de otras proteínas de la familia AP-1 (Yang *et al.* 2005), como resultado los niveles requeridos de c-Fos suelen ser bajos, sin embargo, en otro estudio se determinó que la activación de NF- κ B no es suficiente para la activación del VIH tipo 1 en células infectadas y que el heterodímero p50-p65 tiene interacción física con c-Fos ofreciendo estabilidad en su vida media que resulta en un complejo que transactiva sinérgicamente el VIH-1 en monocitos humanos U1 infectados de forma latente (Yang *et al.* 1999).

El análisis de los extractos proteicos de monocitos control y estimulados reveló la presencia de NFATc1, con un ligero aumento de expresión en monocitos estimulados a las 4 h (Figura 13), en este mismo intervalo de tiempo la expresión de IL-10 es el doble respecto a las células control y es el punto a partir del cual la expresión de IL-10 presenta un incremento gradual respecto del tiempo de estimulación, también en este punto se determinó la presencia de c-Fos, ya se mencionó algunas evidencias de la participación de c-Fos en procesos de diferenciación celular; otro ejemplo es la diferenciación de monocitos a osteoclastos donde se ha descrito que c-Fos regula la expresión de NFAT, sobre todo NFATc1 (Matsuo *et al.* 2004) y ampliamente se ha descrito que NFAT interacciona cooperativamente con otros factores de transcripción como AP-1 y C/EBP formando complejos como NFAT- C/EBP o NFAT-AP-1 y a su vez estos factores de transcripción interactúan con el ADN directamente: C/EBP-ADN, AP-1-ADN y NFAT-ADN (Teddy *et al.* 2003; Macián *et al.* 2000). Sin embargo, existen pocos reportes de interacciones directas de NFAT con NF- κ B, puesto que también se han encontrado

sitios compuestos NF- κ B/NFAT como en los promotores de CD40LG o CD154 que son marcadores de linfocitos B, y otros numerosos genes en los que la transcripción depende de NFAT y NF- κ B (Pham *et al.* 2005; Liu *et al.* 2012); sin embargo, se determinó que la nula expresión de NF- κ B en este modelo conlleva a la pérdida de la inducción de NFATc1/ α A hacia una isoforma corta de NFATc1 que no participa en procesos de proliferación y supervivencia en linfocitos (Erfling *et al.* 2012; Khalid *et al.* 2014), por tanto p50 tiene un efecto supresor sobre NFATc1, es decir lo modula negativamente; sin embargo, se reporta que los sitios compuestos NF- κ B/NFAT son predominantemente dominados por NFAT.

El análisis de los extractos proteicos totales determinó la presencia del factor de transcripción NFATc1 en todos los intervalos de tiempo de células control y estimuladas, lo que sugiere una permanente participación en la regulación de la expresión de IL-10 en monocitos U937 bajo este estímulo y quizás la versatilidad que tiene este factor de transcripción de participar solo o acompañado, se origina porque el gen de NFATc1 produce 6 isoformas, 3 constitutivas β a-c y 3 inducibles α a-c, se ha propuesto que los diferentes miembros de NFAT podrían ejercer funciones específicas en la regulación de los diferentes procesos celulares y para intentar estudiar qué papel ejerce cada miembro, se han generado ratones deficientes para cada uno de los miembros de la familia NFAT; NFATc1, NFATc2, NFATc3 y NFATc4 donde se ha resaltado la importancia de algunos en la regulación de la expresión de diversos genes (Ranger *et al.* 1998b; Yoshida *et al.* 1998; Xanthoudakis *et al.* 1996; Oukka *et al.* 1998), sin embargo, ha resultado interesante que excepto en el caso de NFATc1, la ausencia de un solo miembro de la familia NFAT no tenga un efecto severo; estos resultados hacen pensar que existe redundancia en el papel que ejerce cada miembro NFAT excepto para NFATc1 y que explicaría por qué otros factores de transcripción cuando interaccionan con su sitio de unión al ADN funcionalizan a NFATc1 para que ejerzan su función en la regulación de la expresión de genes y que los sitios NFAT simples no puedan ejercer un efecto sobre la regulación de la expresión génica.

El análisis de la proteína Sp1 muestra su presencia únicamente en extractos proteicos de monocitos estimulados y no así en monocitos control a diferencia de IL-10 que se expresa tanto

en monocitos control y estimulados. Para Sp1 se encontraron dos picos de expresión a 1 h y 8 h de estimulación pero Sp1 se expresa abundantemente en el intervalo prolongado de 0.5 a 4 h con un pico máximo a 1 h (Figura 13), lo cual sugiere un papel regulador durante este periodo temprano de estimulación cuando los niveles de expresión de IL-10 se incrementan solo 0.8 veces con respecto a monocitos sin estímulo (Figura 8); otros estudios determinaron que los factores de transcripción; p50, p65 (RelA), c-Rel, AP-1 (c-Jun, c-Fos) y Egr-1 por sí solos no pueden mediar la transcripción del gen del factor tisular en células THP-1 en respuesta a la inducción con LPS (Oeth *et al.* 1997), lo que hace vital la participación de Sp1 en la regulación de múltiples genes.

La bibliografía reporta al heterodímero p50-p65 como la forma más comúnmente detectada (Natoli *et al.* 2006); en otro modelo se determinó la localización celular de este heterodímero y se estableció que existe una acumulación de p65 fosforilada en Ser468 (p65^{Ser468}) en microgrupos en el núcleo, en contraste, la mayoría de p65 fosforilada en Ser536 (p65^{Ser536}) se encuentra en el citosol acumulada alrededor del núcleo y una gran cantidad de p65 no fosforilada en el citoplasma, estos datos sugieren que solo una fracción de p65 es fosforilada tanto en Ser536 o Ser468 al mismo tiempo y que el sitio de fosforilación impacta en la expresión de genes de forma altamente específica (Moreno *et al.* 2010).

También se reconoce *in vitro* e *in vivo* que existen grandes aumentos de p50 de localización nuclear y ocasionan una inhibición parcial de la translocación nuclear del heterodímero p50-p65 en monocitos tolerantes a LPS, también se describió que p50 es un factor regulador esencial para la transcripción de genes en macrófagos tipo M2, por lo que el reclutamiento de p50 en el promotor de IL-10 de macrófagos M2 incrementa la tolerancia al LPS y sugiere que p50 actúa suprimiendo la polarización a macrófagos tipo M1 (Mantovanich *et al.* 2009), refiriendo estos antecedentes y considerando la determinación de dos picos de expresión de p50, así como el comportamiento de la expresión de IL-10 en nuestro modelo de trabajo de monocitos estimulados con LPS y PGE₂, sugerimos que p50 puede estar participando en la regulación de la expresión del gen de IL-10, una citocina que característicamente se expresa de forma incrementada en macrófagos tipo M2.

Estudios realizados en macrófagos de ratón RAW264.7 tolerantes a LPS evaluaron su respuesta al estímulo de alcohol, donde se reportó una rápida inducción de heterodímeros de NF- κ B (p50-p65) de 0.5 a 2 h, posteriormente un aumento de homodímeros p50 hasta las 16 h con pico máximo a 7 h, sugiriendo que el aumento de homodímeros p50 se muestra como un marcador de macrófagos tolerantes a LPS (Shashi *et al.* 2012). Ensayos de ChIP revelaron la participación de estos homo o heterodímeros en 4 sitios NF- κ B en la expresión del gen de TNF- α LPS (Shashi *et al.* 2012). En nuestro modelo de trabajo con monocitos U937 estimulados con LPS/PGE₂ evidenciamos la interacción p50-p65 mediante el ensayo de IP, no logramos determinar la participación de heterodímeros p50-p65 en la región de análisis del promotor por el ensayo de ChIP, y puesto que p50 se detectó abundantemente, es probable que al menos una fracción corresponda a homodímeros p50, puesto que observamos que p50 interacciona funcionalmente con el promotor de IL-10, sin embargo, existe un comportamiento comparable con los tiempos donde se presentan los picos de expresión de p50 que determinan posiblemente un modelo de macrófagos tolerantes a LPS bajo el estímulo de LPS y PGE₂, por tanto los resultados sugieren fuertemente que el patrón visto en el estudio se presenta para macrófagos diferenciados tipo M2, y que los picos de expresión de p50 pudieran estar relacionados con el papel dual de p50, donde podríamos encontrar interacciones p50-p50 y p50-p65 en tiempos específicos de estimulación inmediata o tardía, motivo por el cual debemos considerar estos resultados y creemos que se deben explorar más las interacciones p50-p50 y p65-p50 para comprender mejor su papel funcional en la expresión de IL-10 en el modelo de monocitos, así como en macrófagos estimulados con LPS/PGE₂ mediante otros ensayos de IP y ChIP.

Trabajos previos *in vitro* por ensayos de retardamiento en gel determinaron la unión de homodímeros p50 a 0.5 h en el promotor de IL-10 y heterodímeros p50-p65 en el pIL-12 en macrófagos de ratón estimulados con LPS por 3 h, el mismo estímulo promovió la asociación de p65 y c-Rel en el promotor de IL-12 a 16 h (Cao *et al.* 2006), este antecedente bibliográfico nos sugirió realizar el ChIP a 0.5 h y 4 h con el estímulo de LPS, esperando determinar interacciones funcionales, sin embargo, no detectamos interacciones de los ChIP-p50 a estos intervalos de tiempo, los resultados obtenidos apuntaron a las diferencias del modelo de estudio

lo cual se debe a que el ensayo se realizó en monocitos y no en macrófagos pese al uso del mismo estímulo de LPS, otra causa probable del resultado obtenido pondría sobre la mesa el uso de la región de análisis que no incluye el sitio de interacción de los sitios NF- κ B en la región distal del promotor de IL-10 que permitan discriminar este resultado, si observamos la interacción de p50 con este sitio en monocitos estimulados con LPS/PGE₂, se indicaría que los monocitos U937 requieren obligatoriamente de los dos estímulos para que se active p50, forme homodímeros, internalice al núcleo y participe en la regulación de IL-10.

Nuestros resultados sugieren una interacción funcional de Sp1 en la región de -827 pb a +38 pb del promotor de IL-10 que participa en la regulación de la expresión de IL-10 en monocitos estimulados con LPS/PGE₂ durante 4 h de la estimulación con LPS y PGE₂. La literatura reporta la asociación funcional de Sp1 por ensayos de ChIP en el pIL-10 en macrófagos derivados de cultivos de medula ósea estimulados con complejos inmunes (CI) y LPS, reclutando Sp1 en el promotor en la región de -196 a -76 pb desde los 30 a los 120 min con dos picos de interacción, siendo el máximo a 45 min de estimulación y disminuyendo gradualmente, y el segundo pico de menor intensidad a 90 min y dentro de la región de -594 pb a -417 pb (Xia *et al.* 2006), que corresponde con los resultados obtenidos del análisis *in silico* realizado donde encontramos 3 posibles sitios de unión para Sp1, sugerimos realizar el ensayo ChIP en regiones más cortas de 200 a 300 pb a fin de determinar los sitios precisos de interacción de Sp1 que podrían participar en la regulación de la expresión de IL-10 en monocitos U937 estimulados con LPS/PGE₂. Mediante ensayos *in vitro* se ha determinado la participación de Sp1 y Sp3 en la regulación de la expresión de IL-10, donde IL-10 induce su propia expresión por interacción de Sp1 en la región de -95 a -71 pb del pIL-10 en linfocitos de la línea celular EL-4 estimulados con PMA y macrófagos de ratón RAW264 estimulados con LPS (Tone *et al.* 2000); también han sido reportadas interacciones físicas entre el sitio de unión al ADN y dominios de Sp1 y NF- κ B (p65), así como interacciones p65 y Sp1 durante la activación del virus VIH tipo I (Perkins *et al.* 1993).

Cuando se determinaron las interacciones funcionales de NFATc1 en la región de -827 a +38 pb del promotor de IL-10 de monocitos estimulados con LPS/PGE₂ (Figura 21) se tenían

incluidos dos sitios NFAT; NFAT/AP-1_{proximal} (-656 pb) y NFAT_{proximal} (-181 pb). Fue necesario realizar otros ensayos de ChIP de regiones más cortas que permitieron determinar interacción funcional con el sitio NFAT/AP-1_{proximal} (-656 pb), y no fue posible determinar interacción en el sitio NFAT_{proximal} (-181 pb) en monocitos estimulados 6 h (Figura 26). Este resultado se correlaciona con lo que se ha propuesto anteriormente acerca de que los miembros de la familia NFAT podrían ejercer funciones específicas en la regulación de los diferentes procesos en linfocitos y macrófagos (Ranger *et al.* 1998b; Yoshida *et al.* 1998).

Se ha descrito ampliamente que NFAT tiene efectos cooperativos con otros factores de transcripción como AP-1 y CEBP, mediante interacciones ADN-proteína y proteína-proteína (Yang *et al.* 2003; Macián *et al.* 2000); sin embargo, no en todos los genes resulta predominante la participación del sitio compuesto en la regulación de la expresión; por ejemplo para el gen de IL-6 se ha demostrado que el papel primordial se debe sólo al sitio NFAT; algunos ensayos de co-inmunoprecipitación determinaron la interacción de NFATc1 y de p65/RelA en cardiomiocitos, así como NFATc1 y c-Rel en linfocitos B. (Pham *et al.* 2005; Liu *et al.* 2012), sin embargo, en ensayos de EMSA solo se determinaron complejos NFAT-ADN y NF- κ B-ADN y no NF- κ B-NFAT, a pesar de su homología en el dominio RHD que les permitiera interactuar (Liu *et al.* 2012); el antecedente directo de nuestro laboratorio sugería la interacción funcional de NFAT en el promotor de IL-10, puesto que mediante ensayos de EMSA se determinó la interacción de NFAT con el sitio compuesto NFAT/AP-1_{proximal} (-181 pb) en macrófagos U937 estimulados con LPS/PGE₂ (Quiroga, 2005), se debe aclarar que nuestro estudio se realizó en monocitos, lo cual puede cambiar la participación de este sitio en la regulación de la expresión de IL-10.

Durante la realización de los ensayos de ChIP cabe destacar que en la purificación del ADN en la etapa de precipitación con etanol, siempre se observó la obtención de un botón, indicando que durante la inmunoprecipitación se recuperan fragmentos de ADN de genes que tienen interacciones con el factor de transcripción de interés; sin embargo, aumentar la cantidad del lisado celular tiene el inconveniente de modificar la relación proteína-anticuerpo, pero no la relación proteína-ADN (interacciones funcionales) y es posible que se recuperen un número

menor de fragmentos de ADN al saturar el anticuerpo, lo cual podría disminuir el rendimiento de la PCR, por esta razón debemos considerar el uso de lisados nucleares que podrían tener ventajas significativas en el ensayo de ChIP ofreciendo mayor sensibilidad por los siguientes aspectos:

- El aumento de la expresión del factor de transcripción y su localización citoplasmática usualmente “no activo” podría saturar el sistema, es decir, el factor de transcripción libre o recién sintetizado competiría por el anticuerpo durante la inmunoprecipitación con el factor de transcripción que tiene interacción funcional con su sitio de unión en el ADN, esto pudiera disminuir el rendimiento final de los fragmentos de interés obtenidos
- El empleo de extractos nucleares aseguraría el reconocimiento de factores de transcripción que por su localización celular, es muy probable que sean proteínas que ejerzan una acción reguladora en los múltiples genes activados por el estímulo
- Se debe entender que cuanto mayor sea el tiempo de proceso del ensayo, mayor es el riesgo de un rendimiento menor causado por la actividad de proteasas y la hidrólisis sobre el anticuerpo y los factores de transcripción contenidos en el sistema del ensayo

Por último quisiera señalar que el aumento del lisado celular en el ensayo, tiene la limitante del volumen debido a que se debe mantener la relación de proteína con el buffer para no modificar la densidad o viscosidad del lisado, ni aumentar la cantidad de detergentes o sales en el sistema que pudieran afectar el rendimiento de la PCR.

Cuando se realizó la IP de p50 aunque se evidenció una señal débil de p65, esto indicó una interacción con p50, es importante señalar que la bibliografía reporta que los 5 miembros de la familia NF- κ B pueden formar diferentes combinaciones de dímeros, y que el más abundante y frecuentemente detectado es el heterodímero p50-p65 (Natoli *et al.* 2006), si bien no fue lo encontrado en este modelo y como se mencionó anteriormente, que solo una fracción de p65 es fosforilada (serina 536 o serina 468) y que el sitio de fosforilación impacta en la

expresión de genes de forma específica (Moreno *et al.* 2010), y además no se detectó p65 mediante western blot, es lo que podría explicar porque los niveles detectados de p65 fueron muy inferiores a los mostrados en otros modelos y también mucho menores a los de p50 en la misma co-inmunoprecipitación; sin embargo, esta interacción podría ser suficiente para ejercer acción sobre el aumento o regulación de la expresión de IL-10 en monocitos estimulados con LPS/PGE₂.

En resumen, nuestros resultados sugieren fuertemente que la proteína p50 forma complejos con las proteínas Sp1, NFAT y p65 en monocitos U937 estimulados con LPS/PGE₂, y por los ensayos de CHIP para p50, Sp1 y NFATc1 se determinó que interaccionan funcionalmente en el promotor de IL-10 en la región -872 pb a +38 pb. Por lo tanto, se resalta la función de estas proteínas en la corregulación de la expresión de IL-10, así como en la formación de complejos proteicos (cointeracción); sin embargo, se tienen que explorar la presencia de otras proteínas que pudieran estar formando parte de estos complejos multiproteicos, así como la unión de otros factores de transcripción al promotor de IL-10.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

- En las regiones del promotor de IL-10 de -2519 a -1557 pb y de -827 a +38 pb, se caracterizaron 40 probables sitios de unión para los factores de transcripción p50, NFAT, AP-1, STAT3 y Sp1 mediante un análisis bioinformático.
- La cinética de expresión de IL-10 en monocitos U937 estimulados con LPS/PGE₂ mostró una relación directa a nivel del ARNm y de la proteína, presentando un pico de expresión a las 0.5 h y el pico máximo a las 8 h.
- La estimulación con LPS/PGE₂ en monocitos U937 causó la expresión de factores de transcripción con picos máximos de Sp1 a 1 h, de c-Fos y NFAT a 4 h y p50 a 8 h que se correlacionan con la expresión de IL-10.
- Las condiciones óptimas en el ensayo CHIP para la fijación de proteínas al ADN fue a la concentración final de 0.5 % de formaldehído y fragmentación de la cromatina por sonicación a 3 pulsos de 30 % de amplitud de 10"ON/30"OFF.
- El factor de transcripción p50 mostró interacción funcional de con el sitio NF-κB proximal (-466 pb) del promotor de IL-10 en monocitos U937 estimulados con LPS/PGE₂ durante 6 h, y no se observó interacción funcional con los sitios NF-κB distales (-1973 pb y -2049 pb).
- El factor de transcripción NFATc1 mostró interacción funcional en el promotor de IL-10 en el sitio localizado a -664/-656 pb en monocitos U937 estimulados 6 h con LPS/PGE₂, y no se observó interacción funcional con el sitio NFAT proximal (-181 pb).
- El factor de transcripción Sp1 mostró interacción funcional con el promotor de IL-10 en la región de -827 pb a +38 pb.
- El ensayo de IP para p50 reveló interacciones de p50 con NFATc1, Sp1 y p65 en monocitos estimulados con LPS/PGE₂.
- La estimulación con LPS/PGE₂ causó la expresión máxima temprana de los factores de transcripción Sp1 y en una segunda fase a c-Fos, NFAT y p50, además mediante los ensayos de CHIP se determinó la interacción de estos factores de transcripción en el promotor de IL-10 en la región de -827 a +38 pb y que estos factores cointeraccionan en la expresión del gen de IL-10.

10. PERSPECTIVAS

Se propone realizar ensayos de actividad promotora en monocitos U937 empleando plásmidos que contengan los sitios NFAT, AP-1, NF- κ B en la región de -827 a +38 pb acoplado a genes reporteros.

Realizar el análisis de la región distal del promotor de IL-10 por ensayos de CHIP con grupos experimentales de 4×10^6 células.

Estudiar mediante ChIP la asociación de los factores de transcripción NF- κ B, Sp1 y NFAT con el promotor de IL-10 y correlacionarlo con los estados de acetilación y desacetilación de histonas.

Realizar ensayos de precipitación de ADN, utilizando oligonucleótidos de doble cadena con la secuencias de análisis y extractos de monocitos control y estimulados, este ensayo acoplado a western blot permitirá determinar la interacción de proteínas con el ADN.

Valorar las interacciones funcionales determinadas en la línea celular de monocitos U937 en un modelo de monocitos de cultivos primarios de médula ósea, que permita identificar diferencias o similitudes de la regulación de expresión de IL-10 entre estos modelos bajo el mismo estímulo.

Emplear extractos proteicos nucleares para los ensayos de ChIP con el fin de determinar las interacciones TF-ADN de forma más específica.

Con el fin obtener resultados más sensibles se considera realizar el análisis de los productos de ChIP mediante PCR de tiempo real.

Realizar los ensayos de IP restantes para p65, c-Fos, c-Jun, STAT3 y Sp1 y revelar mediante western blot otras proteínas.

Realizar los ensayos de ChIP en el o los picos de máxima expresión de los factores de transcripción para determinar cambios de rol (represor-activador) de los factores de transcripción.

Identificar por inmunofluorescencia marcadores de superficie que permitan fenotipificar los monocitos y el tipo de macrófago diferenciado durante la estimulación con el fin de caracterizar el modelo de estudio.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Akagawa K. S. (2002). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocytoid derived macrophages. *Int J Hematol*, 76(1): pp. 27-34.
2. Akira S., Nishio Y, Inoue M, Wang X. J., Wei S, Matsusaka T., Yoshida K., Sudo T., Naruto M. & Kishimoto T. (1994). Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, 77 (1): pp. 63–71.
3. Balkwill F. & Mantovani A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357: pp. 539-545.
4. Banks E. B., Crish J. F., Welter J. F. & Eckert R. L. (1998). Characterization of human involucrin promoter distal regulatory region transcriptional activator elements-a role for Sp1 and AP1 binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 331(Part 1): pp. 61-80.
5. Bartosh T. J., Ylostalo J. H., Bazhanov N., Kuhlman J. & Prockop D. J. (2013). Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres selfactivates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells*, 31(11): pp. 2443-2456.
6. Bengoechea J. A., Najdenski H. & Skurnik M. (2004). Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. *Molecular Microbiology*, 52: pp. 451-469.
7. Benkhart E. M., Siedlar M., Wedel A., Werner T. & Ziegler-Heitbrock H. W. (2000). Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J. Immunology*, 165: pp. 1612-1617.
8. Brenner S., Prosch S., Schenke-Layland K., Riese U., Gausmann U. & Platzer C. (2003). cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 278: pp. 5597-5604.
9. Breyer R. M., Bagdassarian C. K., Myers S. A. & Breyer M. D. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology*, 41: pp. 661-90.
10. Brightbill H., Plevy S. E., Modlin R. L. & Smale S. T. (2000). A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J. Immunology*, 164: pp. 1940-1951.
11. Burke B. & Lewis C. E., Butow R. A. & Avadhani N.G. (2004). The Macrophage. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular Cell*, 14: pp. 1-15.
12. Cao S., Lui J. & Ma X. (2005). The proto-oncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J. Immunology*, 174: pp. 3484-3492.
13. Cao S., Xia Z., Edwards J. P. & Mosser D. M. (2006). NF- κ B1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 281: pp. 26041-26050.

14. Cella M., Salio M., Sakakibara Y., Langen H., Julkunen I. & Lanzavecchia A. (1999). Maturation, activation, and protection of the dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189: pp. 821-829.
15. Chang L. & Karin M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824): pp. 37-40.
16. Chanmee T., Ontong P., Konno K. & Itano N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment, *Cancers*, 6(3): pp. 1670-1690.
17. Cheung D. L., Hart P. H., Vitti G. F., Whitty G. A. & Hamilton J. A. (1990). Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes. *Immunology*, 71: pp. 70-75.
18. Chung E. Y., Liu J., Homma Y., Zhang Y., Brendolan A., Saggese M., Han J., Silverstein R., Selleri L. & Ma X. (2007). Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity*, 27: pp. 952-964.
19. Cohn Z. A. (1978). Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J Immunology*, 121: pp. 813-816.
20. Cotran R. S., Kumar V. & Collins T. (1999). Patología estructural y funcional. 6 ed. Madrid: *Mc Graw Hill, Interamericana*, pp. 1-95.
21. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunology*, 180: pp. 5771-5777.
22. Darnell J, Lodish H. & Baltimore D. Biología celular y molecular. 2da. ed. Barcelona: Omega, 1993:763.
23. Davis B., Dulbecco R., Eisen H. & Ginsberg H. (Eds.). Bacterial Architecture Microbiology, 4th Edition. J. B. Lippincott Co. Philadelphia: 1990, pp. 21-50.
24. De Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C. G. & De Vries J. E. (1991a) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an auto-regulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 174: pp. 1209-1220.
25. De Waal Malefyt R., Haanen J., Spits H., Roncarolo M. G., Velde A., Figdor C., Johnson K., Kastelein R., Yssel H. & de Vries, J. E. (1991b). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 174, 915-24.
26. Duluc D., Corvaisier M., Blanchard S., Catala L., Descamps P., Gamelin E., Ponsoda S., Delneste Y., Hebbar M. & Jeannin P. (2009). Interferon- γ reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *International Journal of Cancer*, 125(2): pp. 367-373.
27. Duque-correa M. A. & Rojas-López. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, 26(2): pp. 73-86.
28. D'Andrea A., Ma X., Aste-Amezaga M., Paganin C. & Trinchieri G. (1995). Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med.*, 181: pp. 537-546.

29. Erfling E., Avots A., Klein-Hessling S., Rudolf R., Vaeth M. & Berberich-Siebelt F. (2012). NFATc1/alphaA: the other face of NFAT factors in lymphocytes. *Cell Communication and Signaling* 10: pp. 16–25.
30. Fink M. A. (1977). *The Macrophage in Neoplasia*. New York: Academic Press,
31. Foey A. D., Parry S. L., Williams L. M., Feldmann M., Foxwell B. M. J. & Brennan F. M. (1998). Regulation of Monocyte IL-10 Synthesis by Endogenous IL-1 and TNF- α : Role of the p38 and p42/44 Mitogen-Activated Protein Kinases. *The Journal of Immunology*, 160: pp. 920-928.
32. Gesser B., Leffers H., Jinquan T., Vestergaard C., Kirstein N., Sindet-Pedersen S., Jensen S. L., Thestrup-Pedersen K. & Larsen C. G. (1997). Identification of functional domains on human interleukin 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: pp. 14620-14625.
33. Ghosh S., May M. J. & Kopp E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Rev Immunology*, 16: 225-60.
34. Gringhuis S. I., den Dunnen J., Litjens M., van der Vlist M., Wevers B., Bruijns S. & Geijtenbeek T. B. (2009). The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity., *Nat. Immunol.* 10: pp. 203-213.
35. Goerdt S. & Orfanos C. E. (1999). Other functions, other genes: alternative activation of antigenpresenting cells. *Immunity*, 10: pp. 137-142.
36. Goodridge H. S., Simmons R. M. & Underhill D. M. (2007). Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J. Immunology*, 178: pp. 3107–3115
37. Gordon S. & Taylor P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5: pp. 953-64.
38. Greenberg M. E., Greene L. A. & Ziff E. R. (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC-12 cells. *J. Biol. Chem.* 26: pp. 14101-14110.
39. Hagemann T., Lawrence T., McNeish I., Charles K. A., Kulbe H., Thompson R. G. Robinson S. C. & Balkwill F. R. (2008). Re-educating tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B, *The Journal of Experimental Medicine*, 205(6): pp. 1261-1268.
40. Hailman E., Lichenstein H. S., Wurfel M. M., Miller D. S., Johnson D. A., Kelley M., Busse L. A., Zukowski M. M. & Wright S. D. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *The Journal of Experimental Medicine*, 179: pp. 269-77.
41. Harlow E. & Lane D. (1988). *Antibodies, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., pp. 617-618.
42. Hart P. H., Whitty G. A., Burgess D. R., Croatto M. & Halminton J. A. (1990). Argumentation of glucocorticoid action on human monocytes by interleukin-4. *Lymphokine Res*, 9: pp. 147-153.
43. Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 18: pp. 2195-224.
44. Hu X., Palk P. K., Chen J., Yarilina A., Kockeritz L., Lu T. T., Woodgett J. R. & Ivashkiv L. B. (2006). IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity*, 24: pp. 563-574.
45. Huysentruyt L. C. & Seyfried T. N. (2010). Perspectives on the mesenchymal origin of metastatic cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 29: pp. 695-707.

46. Huysentruyt L.C., Mukherjee P., Banerjee D., Shelton L. M. & Seyfried T. N. (2008). Metastatic cancer cells with macrophage properties: evidence from a new murine tumor model. *Int J Cancer*, 123: pp. 73-84
47. Jackson S. P., MacDonald J. J., Lees-Miller S. & Tjian R. (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell*, 63: pp. 155-165.
48. Jain J., Burgeon E., Badalin M., Hogan P. G., Rao A. (1995). A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J. Biol. Chem.*, 270: pp. 4138-4145.
49. Jenkins J. K., Malyak M. & Arend W. P. (1994). The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res.* 13: pp. 47-54.
50. Jeong E. & Lee J. Y. (2011). Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J.*, 52: pp. 379-392.
51. Jung M., Sabat R., Kratzschmar J., Seidel H., Wolk K., Schonbein C., Schutt S., Friedrich M., Docke W. D., Asadullah K., Volk H. D. & Grutz G. (2004). Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. *Eur J. Immunol*, 34(2): pp. 481-93.
52. Muhammad K., Alrefai K. H., Marienfeld R., Thuy-Pham D. A., Murti K., Patra A. K., Avots A, Bukur V., Shahin U, Kondo E., Klein-Hessling E. & Serfling E. (2014). NF- κ B factors control the induction of NFATc1 in B lymphocytes. *Eur. J. Immunology*, 44: pp. 3392-3402.
53. Kim J. M., Brannan C. I., Copeland N. G., Jenkins N. A., Khan T. A. & Moore K. W. (1992). Structure of the mouse interleukin-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J. Immunology*, 148: pp. 3618-3623.
54. Kondo E. & Kanai K. (1977). Phospholipid distribution pattern in uninduced (resident) and casein-induced mouse peritoneal cells. *J. Med. Sci. Biol.*, 30: pp. 269-273.
55. Kruger W., Schubert D. & Verma I. M. (1985). Induction of the proto-oncogene fos by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: pp. 7330-7334.
56. Kube D., Riet H., Eskdale J., Kremser P. G. & Gallagher G. (2001). Structural characterization of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. *Genes and Immunity*, 2: pp. 181-190.
57. Kyriakis J. M. & Avruch J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81(2): pp. 807-69.
58. Landeros G. J. (2005). Identificación de los factores de transcripción de la familia NF- κ B en el promotor del gen de interleucina 10. "Tesis de grado Maestro en Ciencias, no publicada", Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mex., pp. 65.
59. Leanne C., Akgoc H. Z. & Seyfried T. N. (2001). Hypothesis: are neoplastic macrophages / microglia present in glioblastoma multiforme?. *ASNNEURO*, 3(4): pp. 183-193.
60. Lee W., Haslinger A., Karin M. & Tjian R. (1987). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human methallothionein gene and SV40. *Nature* 325: pp. 368-372.
61. Leghmari K., Bennasser Y. & Bahraoui E. (2008). HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF- κ B pathways. *Eur J Cell Biol.*, 87: pp. 947-962.

62. Legler D. F., Bruckner M., Uetz-von Allmen E. & Krause P. (2010). Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int. Journal Biochem. Cell Biol.*, 42: pp. 198-201.
63. Lin S. C. (2006). Identification of an NF-Y/HMG-I(Y)-binding site in the human IL-10 promoter. *Mol. Immunol.*, (43):1325-1331.
64. Liu Q., Chen Y., Auger-Messier M. & Molkenin J. D. (2012). Interaction between NFkappaB and NFAT coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling. *Circ. Res.*, 110: pp. 1077-1086.
65. Luo C., Shaw K., Raghavan A., Aramburu J., Hogan P. G. & Rao A. (1996). Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: pp. 8907-8912.
66. Ma W., Lim W., Gee K., Aucoin S., Nandan D., Kozlowski M., Diaz F. & Kumar A. (2001). The p38 mitogen-activated Kinase Pathway Regulates the Human Interleukin-10 promoter via the Activation of Sp1 Transcription Factor in LPS-stimulated Human Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: pp. 13664-13674.
67. Macián F., Garcia-Rodriguez C. & Rao A. (2000). Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *The European molecular biology organization*, 19(17): pp. 4783-4795.
68. Mackaness G. B. (1962). Cellular resistance to infection. *J Exp Med*, 116: pp. 381-406.
69. Mackenzie K. F., Clark K., Naqvi S., McGuire V. A., Noehren G. Kristariyanto Y., van de Bosch M., Mudaliar M., McCarthy P., Pattison M. J., Pedrioli P. G., Barton G. J., Toth R., Prescott A. & Arthur J. S. C. (2013). PGE₂ Induces Macrophage IL-10 Production and a Regulatory-like Phenotype via a Protein Kinase A-SIK-CRTC3 Pathway. *Journal of immunology* 190: pp. 565-577.
70. Maloy K. J. & Powrie F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunology*, 2001; 2: pp. 816-22.
71. Malyshev I. & Maleyshev Y. (2015). Current Concept and Update of the Macrophage plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage (Switch) Phenotype. *Bio. Med Research International*, 2015: pp. 1-22.
72. Mantovani A., Bottazzi B., Colotta F., Sozzani S. & Ruco L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today*, 13: pp. 265-270.
73. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A. & Locati M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *TRENDS in Immunology*, 25(12): pp. 677- 686.
74. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P. & Sica A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *TRENDS in Immunology*, 23(11): pp. 549-555.
75. Martinez, F. O., Sica A., Mantovani A. & Locati M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.*, 13: pp. 453-461.
76. Matsuo K., Galson D. L., Zhao C., Peng L., Laplace C., Wang K. Z. Q., Bachler M. A., Amano H., Aburatani H., Ishikawa H. & Wagner E. F. (2004). Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) Rescues Osteoclastogenesis in Precursors Lacking c-Fos. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25): pp. 26475-26480.
77. Matthews S. & Ghosh S. (2004). Signaling to NF-κB. *Genes and Development*, 18: pp. 2195-2224.

78. May M. & S. Ghosh. (1998). Signal transduction through NF- κ B. *Review Immunology Today*, 19 (2): pp. 80-88.
79. Mayer H., Bhat U. R., Masoud H., Radziejewska-Lebrecht J., Widemann C. & Krauss J. H. (1989). Bacterial lipopolysaccharides. *Pure & Appl. Chem.*, 61: pp. 1271-1282.
80. Mitchell R. L., Zokas L., Schreiber R. D. & Verma I. M. (1985). Rapid induction of the expression of proto-oncogene c-fos during human monocytic differentiation. *Cell*, 40: pp. 209-217.
81. Moore K. W., de Waal Malefyt R, Coffman R. L. & O'Garra A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Reviews Immunology*, 19: pp. 683-765.
82. Morales L. (2003). Regulaci3n de la expresi3n de IL-10 en macr3fagos U937. "Tesis de grado Maestro en Ciencias, no publicada", Benem3rita Universidad Aut3noma de Puebla, Puebla, Mex., pp. 102.
83. Moreno R., Sobotzik J. M., Schultz C. & Schmitz M. L. (2010). Specification of the NF- κ B transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKKe. *Nucleic Acids Research*, 38(18): pp. 6029-6044.
84. Mori M. & Prager D. (1997). Activation of the Interleukin-10 gen in the human T lymphoma line HuT 78: Identification and characterization of NF- κ B binding site in the regulatory regi3n of the interleukin-10 gene. *Eur. Journal Hematology*, 59: pp. 162-170.
85. Mosser D. M. & Edwards J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8: pp. 958-969.
86. Murata Y. H. G. K., Rogers K. T., Udvardia A. J. & Horowitz J. M. (1994). Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular proteins to the amino terminus of the Sp1 trans-activation domain. *J. Biol. Chem.* 269(20): pp. 674-681.
87. Natoli G. & De Santa F. (2006). Shaping alternative NF- κ B-dependent gene expression programs: new clues to specificity. *Cell Death Differ.* , 13: pp. 693-696.
88. Niemand C., Nimmesgern A., Haan S., Fischer P., Schaper F., Rossaint R., Heinrich P. C. & Muller-Newen G. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in Primary Human Macrophages Is Differentially Modulated by Suppressor of Cytokine Signaling. *The Journal of Immunology*, 170(6): pp. 3263-3272.
89. Niiro H., Otsuka T., Izuhara K., Yamaoka K., Ohshima K., Tanabe T., Hara S., Nemoto Y., Tanaka Y., Nakashima H. & Niho Y. (1997). Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood*, 89: pp. 1621-1628.
90. Noti J. D., Reinemann B. C. & Petrus M. N. (1996). Sp1 binds two sites in the CD11c promoter in vivo specifically in myeloid cells and cooperates with AP1 to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 16: pp. 2940-2950.
91. O'Garra A., Barrat F. J., Castro A. G., Vicari A. & Hawrylowicz C. (2008). Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunology Reviews*, 223: pp. 114-31.
92. Oeth P., Parry G. C. N. & Mackman N. (1997). Regulation of the Tissue Factor Gene in Human Monocytic Cells Role of AP-1, NF- κ B/Rel, and Sp1 Proteins in Uninduced and Lipopolysaccharide-Induced Expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17: pp. 365-374.

93. Oukka M., Ho I. C., de la Brousse F. C., Hoey T., Grusby M. J. & Glimcher L. H. (1998). The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity*, 9: pp. 295-304.
94. Ouyang W., Rutz S., Crellin N. K., Valdez P.A. & Hymowitz S. G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Rev. Immunology*, 23(29):71-109.
95. Pahl H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18: pp. 6853-6866.
96. Perkins N. D., Edwards N. L., Duckett C. S., Agranoff A. B., Schmid R. M. & Nabel G. J. (1993). A cooperative interaction between NF- κ B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.*, 12: pp. 3551-3558.
97. Pham L. V., Tamayo A. T., Yoshimura L. C., Lin-Lee Y. C. & Ford R. J. (2005). Constitutive NF- κ B and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood*, 106: pp. 3940-3947.
98. Platzer C., Fritsch E., Elsner T., Lehmann M. H., Volk H. D. & Prosch S. (1999). Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur. J. Immunology*, 29: pp. 3098-3104.
99. Porcheray F., Viaud S., Rimaniol A. C., Leone C., Samah B., Dereuddre-Bosquet N., Dormont D. & Gras G. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 142: pp. 481-489.
100. Porta C., Rimoldi M., Raes G., Brys L., Ghezzi P., Di Liberto D., Dieli F., Ghisletti S., Natoli G., De Baetselier P., Mantovanic A. & Sica A. (2009). Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, PNAS*, 106 (35): pp. 14978-14983.
101. Ptashne & Gann. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, (386): pp. 569-577.
102. Powell M. J., Thompson S. A., Tone Y., Waldmann H. & Tone M. (2000). Post-transcriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *Journal Immunology*, 165: pp. 292-299.
103. Puig-Kröger A., Sierra-Filardi E., Domínguez-Soto A., Samaniego R., Corcuera M. T., Gómez-Aguado F., Ratnam M., Sánchez-Mateos P. & Corbí A. L. (2009). Folate Receptor β is Expressed by Tumor-Associated Macrophages and Constitutes a Marker for M2 Anti-inflammatory/ Regulatory Macrophages. *Cancer Res.*, 69(24): pp. 9395-9403.
104. Quiroga R. (2005). Estudio de las proteínas NFAT y AP-1 localizadas en la región promotora del gen de la interleucina-10 (IL-10). "Tesis de grado Maestro en Ciencias, no publicada", Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mex.
105. Raetz C. R. (1990). Biochemistry of endotoxins. *Annual Reviews Biochem.* , 59: pp. 129-170.
106. Ranger A. M., Oukka M., Rengarajan J. & Glimcher L. H. (1998b). Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity*, 9: pp. 627-635.

107. Ricciotti E. & FitzGerald G. A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 31(5): pp. 986-1000.
108. Rivas J. & A. Luis. (2004). Interactome data and databases: different types of protein interaction, *Comp. Funct. Genom.*, (5): pp. 173-178.
109. Rutherford M. S., Witsell A. & Schook L. B. (1993). Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages. *Journal Leukoc Biol.*, 53: pp. 602-618.
110. Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K. & Geginat J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21: pp. 331-44.
111. Sariban E., Luebbers R. & Kufe D. (1988). Transcriptional and Post-transcriptional Control of c-fos Gene Expression in Human Monocytes. *Molecular and Cellular Biology*, pp. 340-346.
112. Sariban E., Mitchell T. & Kufe D. W. (1985). Expression of the c-fos proto-oncogene during human monocytic differentiation. *Nature (London)* 316: pp. 64-66.
113. Sedmak J. J. & Grossberg S. E. (1997). A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal. Biochem.*, 79: pp. 544-552.
114. Seger R. & Krebs E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J.*, 9(9): pp. 726-35.
115. Sharma A., Kumar M., Aich J., Hariharan M., Brahmachari S. K., Agrawal A. & Ghosh B. (2009). Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106: pp. 5761-5766.
116. Shashi B., Tang A., Catalano D., Petrasek J., Taha O., Kodys K. & Szabo G. (2012). Induction of Bcl-3 by acute binge alcohol results in Toll-like receptor 4/LPS tolerance. *Journal of Leukocyte Biology*, 92: pp. 611-620.
117. Slobedman B., Barry P. A., Spencer J. V., Avdic S. & Abendroth A. (2009). Virus-Encode homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *Journal of virology*, 83(19): pp. 9618-9629.
118. Stein M., Keshav S., Harris N. & Gordon S. (1992) Interleukin-4 potently enhances murine mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176: 287-292.
119. Stordeur P. & Goldman M. (1998). Interleukin-10 as a regulatory cytokine induced by cellular stress: Molecular Aspects. *Inter. Rev. Immunology*, 16: 501-522.
120. Teddy T. C. Yang & Chow C. (2003). Transcription cooperation by NFAT.C/EBP composite enhancer complex. *The Journal of biological Chemistry*, 278: pp. 15874-15885.
121. Thompson K, Maltey J., Fallowfield J., McAulay M., Millward-sadler & Sheron N. (1998). Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology*, 28: pp. 1597-1606.
122. Tone M, Powell M. J., Tone Y., Thompson S. A. & Waldmann H. (2000). IL-10 Gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *Journal Immunology*, 165: pp. 286 -291.
123. Tukey J. W. (1949). One degree of freedom for non-additivity. *Biometrics*, 5: 323-242.
124. Turpin J. A. & López-Berestein G. (1993). Differentiation, maturation, and activation of monocytes and macrophages: functional activity is controlled by a continuum of maturation., pp. 71-99.
125. Varin A. & Gordon S. (2009). Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*, 214: pp. 630-641.
126. Verreck F. A., de Boer T., angenberg D. M., van der Zander L. & Ottenhoff T. H. (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-

- inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc Biol.*, 79(2): pp. 285-93.
127. Wang Y., Curry H. M., Zwilling B. S., Lafuse W. P., Chablais F. & Jazwinska A. (2012). Mycobacteria inhibition of IFN-gamma induced HLA-DR gene expression by up-regulating histone deacetylation at the promoter region in human THP-1 monocytic cells. *Journal Immunology*, 174: pp. 5687-5694.
 128. Wurfel M. M., Hailman E. & Wright S. D. (1995). Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J. Exp. Med.*, 181: pp. 1743-1754.
 129. Xanthoudakis S., Viola J. P., Shaw K. T., Luo C., Wallace J. D., Bozza P. T., Luk D. C., Curran T. & Rao A. (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 272, pp. 892-895.
 130. Xia Z., Justin P., Mosser E. & Mosser D. M. (2006). Dynamic and transient remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription. *Journal Immunology*, 177: pp. 1282-1288.
 131. Yang H. P., Magilnick N., Ou X. P. & Lu S. C. (2005b). Tumor necrosis alpha induces coordinated activation of rat GSH synthetic enzymes via NF- κ B and AP-1. *Journal Biochem*, 391: pp. 399-408.
 132. Yang X., Chen Y. & Gabuzda D. (1999). ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF- κ B. *Journal Biol. Chem.*, (39): pp. 27981-27988.
 133. Ylostalo J. H., Bartosh T. J., Coble K. & Prockop D. J. (2012). Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells*, 30(10): pp. 2283-2296.
 134. Yoshida H., Nishina H., Takimoto H., Marengere L. E., Wakeham A. C., Bouchard D., Kong Y. Y., Ohteki T., Shahinian A., Bachmann M., Ohashi P., Penninger J. M., Crabtree G. R. & W Mark T. (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 8: pp. 115-124.
 135. Yuan Z. L., Guan Y. J., Wang L., Wei W., Kane A. B. & Chin Y. E. (2004). Central role of the threonine residue within the p+1 loop of receptor tyrosine kinase in STAT3 constitutive phosphorylation in metastatic cancer cells. *Molecular Cell Biology*, 24(21): pp. 9390-9400.
 136. Yuna N., Mo D., Qin L., Wang C., Li A., Zhao X., Wang X., Xiao S., Wang Q., Xie Y., He Z., Cong P. & Chen Y. (2011). Lipopolysaccharide-induced miR-1224 negatively regulates tumor necrosis factor- α gene expression by modulating Sp1. *Immunology*, 133: pp. 8-20.
 137. Zdanov A., Schalk-Hihi C., Gustchina A., Tsang M., Weatherbee J. & Wlodawer A. (1995). Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure Cell PRESS*, (6): pp. 591-601.

APÉNDICE A Soluciones generales

PBS 10X

Na ₂ PO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.2 g
KCl	2.0 g
NaCl	80 g

- Disolver en 850 mL de H₂O milliQ estéril, ajustar el pH entre 7.2 - 7.4
- Aforar a 1 L y esterilizar

PBS 1X

- Tomar 100 mL de solución de PBS 10X y añadir 900 mL de H₂O, ajustar el pH y esterilizar

H₂O DEPC (dietil pirocarbonato)

H ₂ O DEPC 0.1 % (100 mL)	
Dietil pirocarbonato	0.1 mL
H ₂ O estéril	99.9 mL

- Preparar solución en recipiente ámbar en el cuarto oscuro, dejar reposar toda la noche y esterilizar

Rojo de Ponceau

Rojo de Ponceau	0.5 g
CH ₂ COOH (Ácido acético glacial)	1 mL
Aforar a 100 mL con H ₂ O estéril	

- Emplear máximo 4 meses y mantener en refrigeración

TBE 5X

Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5M pH 8	20 mL

- Aforar a 1000 mL con H₂O milliQ estéril

TBE 0.5X y 1X

- TBE 0.5X: Tomar 100 mL de la solución TBE 5X y aforar a 1 litro con H₂O estéril milliQ
- TBE 1X: Tomar 200 mL de la solución TBE 5X y aforar a 1 litro con H₂O estéril milliQ

TBS

Tris 1M pH8 (Estéril)	20 mL
NaCl 5M (Estéril)	30 mL
Aforar a 1000 mL de H ₂ O estéril	

APÉNDICE B Soluciones Western blot

FT-buffer de lisis

600 mM	KCl	3 M (stk)
20 mM	Tris HCl pH 7.8	1 M (stk)
20 %	Glicerol (estéril)	
X uL	Inhibidores de proteasas	

TBS-Tween 0.05 %

Tris 1M pH 8 (estéril)	20mL
NaCl 5M (estéril)	30mL
Aforar a 1000 mL de H ₂ O estéril	
Tween	0.5 mL

Buffer de corrida SDS-PAGE

0.5 g	SDS
1.514 g	Tris base
7.2 g	Glicina

- Aforar a 500 mL

Buffer de Stripping

15 g	Glicina
1 g	SDS
10 mL	Tween 20

- ajustar pH a 2.2 y aforar a 1 litro

Solución desteñidora

Ácido Acético	10 %
Metanol	50 %
H ₂ O estéril	40 %

APÉNDICE C Soluciones ChIP

Solución paraformaldehído al 4% para fijación de proteínas

1.- Soluciones:

- A) NaH₂PO₄ 22.6 g/L
- B) NaOH 25.2 g/L
- C) Paraformaldehído al 40%

C) Paraformaldehído al 40%:

- Disolver 4 g de PFA en 10 mL de H₂O dd en un vaso de precipitados
- Calentar la mezcla a 70 °C por 2 h (cubrir la mezcla con un plástico al calentar)
- Adicionar unas gotas de NaOH 2 M agitando suavemente hasta que la solución se vuelva clara
- Dejar enfriar la solución de PFA 40% y agregar 0.54 g de glucosa (la solución debe estar a temperatura ambiente para evitar la caramelización)

2.- Fijador PFA al 4%:

- Mezclar 83 mL de la solución A y 17 mL de la solución B.
- Tomar 90 mL de la mezcla A+B y adicionarle 10 mL de la solución C

El pH de la solución debe de estar entre 7.4 y 7.6, si es necesario ajustar el pH con HCl 1M (No usar potenciómetro, usar papel indicador de pH)

Buffer ChIP de Lisis

50 mM	Tris HCl pH 8	1 M (stk)
1mM	EDTA	0.5 M (stk)
0.1%	SDS	10 % (stk)
Inhibidor de proteasas		

Buffer ChIP de dilución

16.7 mM	Tris HCl pH 8.1	1 M (stk)
167 mM	NaCl	2 M (stk)
1.2 mM	EDTA	0.5 M (stk)
0.01%	SDS	10 % (stk)
1.1 %	TritonX- 100	
Inhibidores de proteasas		

Buffer RIP

50 mM	Tris HCl pH 8	1 M (stk)
150 mM	NaCl	2 M (stk)
1mM	EDTA	0.5 M (stk)
0.1%	SDS	10 % (stk)
0.5%	Deoxicolato de Na	
1 %	NP-40	
Inhibidores de proteasas		

Buffer de alta sal

20 mM	Tris HCl pH 8.1	1 M (stk)
500 mM	NaCl	2 M (stk)
2 mM	EDTA	0.5 M (stk)
0.1%	SDS	10 % (stk)
1 %	TritonX - 100	

Buffer de baja sal

20 mM	Tris HCl pH 8.1	1 M (stk)
150 mM	NaCl	2 M (stk)
2 mM	EDTA	0.5 M (stk)
0.1%	SDS	10 % (stk)
1 %	TritonX - 10	

Buffer de LiCl

10 mM	Tris HCl pH 8	1 M (stk)
0.25 M	LiCl	1 M (stk)
1 mM	EDTA	0.5 M (stk)
1 %	Deoxicolato de Na	
1 %	NP-40	

Inhibidores de proteasas

Buffer TE

10 mM	Tris HCl pH 8	1 M (stk)
1 mM	EDTA	0.5 M (stk)

Buffer elución

0.1 M	NaHCO ₃
0.3 %	SDS

APÉNDICE D Soluciones IP

Buffer Lisis RIPA

150 mM	NaCl
50 mM	Tris pH 8
1 %	Tritón X-100
0.1 %	SDS
0.5 %	Deoxicolato de sodio
Inhibidores de proteasas	

Buffer de lavado

150 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl pH 8
1 %	NP-40
1 %	Deoxicolato
0.5 %	SDS

Buffer de baja sal

150 mM	NaCl
20 mM	Tris-HCl pH 7.5
1 %	NP-40
1 %	Deoxicolato
0.5 %	SDS

Buffer de alta sal

500 mM	NaCl
20 mM	Tris-HCl pH 7.5
1 %	NP-40

Buffer de elución

500 mM	NaCl
20 mM	Tris-HCl pH 7.5
1 %	NP-40

Buffer de carga proteínas SDS- PAGE 6X y 4X

3.0 mL	Glicerol
2.5 mL	Tris-HCl 0.5M pH 6.8
4.0 mL	SDS 10%
0.62 g	DTT (4X)
0.93 g	DTT (6X)
0.2 mg	Azul de bromofenol
- Aforar a 10 mL con H ₂ Odd estéril	