



**MÁSTER OFICIAL UNIVERSITARIO EN
BIOMEDICINA EXPERIMENTAL
FACULTAD DE MEDICINA DE ALBACETE
UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA**

**Análisis de la expresión de los receptores
NOTCH y sus ligandos en monocitos
humanos activados con lipopolisacárido
bacteriano**

Autora:

Olivia Santamaría-Veliz

Tutores:

José Javier García Ramírez

Eva María Monsalve Argandoña

Trabajo de Fin de Máster

Albacete, junio 2020

ÍNDICE

Resumen	i
Abreviaturas	ii
1. Introducción	1
1.1. Macrófagos	1
1.1.1. Funciones de macrófagos.....	1
1.1.2. Plasticidad y polarización.....	2
1.1.3. Inflamación y activación de los macrófagos.....	4
1.2. Los receptores <i>NOTCH</i>	6
1.2.1. Estructura de los receptores <i>NOTCH</i>	6
1.2.2. Ligandos canónicos.....	6
1.2.3. Vía de señalización de <i>NOTCH</i>	7
1.2.4. Funciones de la vía.....	9
1.2.5. Participación de la vía en la activación de macrófagos.....	11
2. Estado de la cuestión	13
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	13
5. Material y métodos	14
5.1. Cultivo de monocitos humanos	14
5.1.1. Extracción de monocitos de <i>Buffy coat</i> a partir de sangre de donantes.....	14
5.2. Activación de los monocitos	15
5.3. Análisis de la expresión génica	15
5.3.1. Extracción de ARN.....	15
5.3.2. Síntesis de ADNc.....	15
5.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	16
5.4. Análisis de proteínas mediante <i>WESTERN BLOT</i>	17
5.4.1. Preparación de las muestras.....	17
5.4.2. Electroforesis en gel.....	17

5.3.4. Transferencia gel- membrana.....	18
5.4.3. Bloqueo.....	18
5.4.4. Inmunodetección.....	18
5.4.5. <i>Stripping</i> de las membranas	19
5.4.6. Estudio por densitometría.....	19
5.5. Análisis estadístico	20
6. Resultados y discusión.....	21
6.1. Estudio de la expresión de los receptores <i>NOTCH</i> en monocitos humanos por estimulación de la señalización TLR4	22
6.2. Análisis la expresión de los ligandos canónicos <i>DELTA1</i> y <i>DELTA4</i> tras la activación de los monocitos humanos por estimulación proinflamatoria con LPS. 26	
6.3. Estudio de la expresión del gen diana <i>HES1</i> durante la activación de los monocitos humanos en respuesta a LPS.....	27
7. Conclusiones.....	30
8. Bibliografía.....	31

Resumen

Los receptores *NOTCH* se expresan en los macrófagos durante el proceso inflamatorio tras la activación de diferentes receptores, como el receptor TLR4, en respuesta a estímulos proinflamatorios tales como el LPS. La activación de los receptores da origen a señales moleculares que llevan a la activación de numerosos genes diana, así como también al aumento de la expresión y la activación de factores de transcripción como NF- κ B, que a su vez favorece la expresión de citocinas proinflamatorias. La implicación de las proteínas *NOTCH* y sus ligandos en la activación del macrófago durante la inflamación se ha descrito especialmente en modelos murinos, pero existen pocos datos con células humanas. En este trabajo se pretendió analizar el papel de la vía de señalización de *NOTCH* durante el proceso de inflamación en macrófagos humanos, con el fin de precisar si se corresponde con el mismo patrón descrito en los murinos. Conocer precisamente este patrón de expresión podría permitir establecer posibles dianas terapéuticas en enfermedades inflamatorias en las que estaría implicado *NOTCH*.

Se procesaron 10 muestras de *Buffy coats*, se siguió un protocolo previamente establecido por el laboratorio para el aislamiento de los monocitos humanos, seguido se extrajo el ARNm y la proteína total de las células, posteriormente mediante qPCR y *Western Blot* se analizaron los ARNm y proteínas de los receptores *NOTCH*, ligandos *DELTA1* y *DELTA4* y la diana *NOTCH*, *HES1*. Los datos obtenidos de qPCR se manejaron según la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los de proteína se trabajó por el método de densitometría mediante el programa *Quantity One*. Los datos fueron procesados mediante el Software Microsoft Excel v.2016, y lo que se muestra en el estudio son datos de experimentos representativos.

Los resultados mostraron que los receptores *NOTCH* presentaron diferentes patrones y niveles de expresión, el receptor *NOTCH1* evidenció mayor inducción, por lo que modularía la vía de señalización, *NOTCH3* es el principal receptor, ya que se indujo de manera temprana, y estaría implicado en la producción de citocinas proinflamatorias; sin embargo, *NOTCH4* no pareció presentar un papel importante. Asimismo, *DELTA4* se destacó como principal ligando de la vía por su mayor inducción, y la activación de la vía de señalización se confirmó con la variación de la expresión de *HES1*, que además reveló un perfil con fluctuaciones. Será necesario incluir en posteriores investigaciones los demás elementos de la vía de señalización, para tener un panorama completo de la función de la vía en los procesos inflamatorios.

Lo hallado demostró que los receptores *NOTCH* participaron en la activación de los monocitos humanos por activación proinflamatoria mediada por TLR4.

Abreviaturas

ADAM: Una desintegrina y metaloproteasa

ADNc: ADN complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Ribonucleasa

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albumina de suero bovino

CCL: Ligando de quimiocina 2

COX-2: Ciclooxygenasa-2

DAMP: Patrones moleculares asociados a lesión

DMEN: Medio de cultivo Eagle modificado de Dubecco

DTT: Ditiotreitól

EAE: Encefalomiелitis alérgica experimental

EDTA: Ácido etilendiaminotretaacético

EFG: Factor de crecimiento epidérmico

ERK: Quinasa regulada por la señal extracelular

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GM-CSF: Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

HDC: Dominio de heterodimerización C-terminal

HDN: Domicio de heterodimerización N-terminal

HES: Hairy Enhancer of Split

HEY: Hairy Related

IFN: interferon

IKK: Enzima IκB quinasas

IL: Interleucinas

iNOS: Óxido nítrico sintasa

IRAK: Cinasas asociadas al receptor de IL-1

LPS: Lipopolisacárido

MAML: Proteína Mastermind-like

MYD88: Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

NADPH Nicotidamina adenina dinucleótido fosfato

NCID: Dominio intracelular *NOTCH*

NECD: Dominio extracelular *NOTCH*

NF-κB: factor nuclear kappa B

NRR: Región reguladora negativa

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Tampón fosfato salino

PCAF: Factor asociado a P300/CBP

PPR: Receptores de reconocimiento de patrones

RBPJ: Proteína recombinante de unión supresora a calvicie

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

TACE: Enzima de conversión del TNF-α

TAK1: Factor de crecimiento transformante β-quinasa transformante 1

TGF-β: Factor de crecimiento transformante β

TLR: Toll-like receptor

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

TRAF6: Factor 6 asociado a factor de necrosis tumoral

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

1. Introducción

1.1. Macrófagos

Los monocitos/macrófagos se descubrieron a finales del siglo XIX por Elie Metchnikoff (1). Son una parte importante y **primera línea de defensa del sistema inmune innato y del sistema inmune adquirido**. Son pequeñas poblaciones de leucocitos, representan entre 4 al 10% de células nucleadas en la sangre de un humano saludable, tienen una vida media de 20 horas y ocupan nichos anatómicos específicos proximales a la vasculatura y epitelios (2). Tienen su origen en progenitores en la médula ósea e ingresan en la sangre periférica por estimulación frente a ciertos estímulos; por otro lado, surgen desde antes del nacimiento, ya que derivan del saco vitelino durante el desarrollo embrionario, teniendo la capacidad de autorrenovación (3,4). También, según su ubicación anatómica, se conocen con distintos nombres, como microglía en el sistema nervioso central, osteoclastos en el hueso, macrófagos alveolares en el pulmón, histiocitos en el bazo y el tejido conectivo intersticial, y células de Kupffer en el hígado (5).

1.1.1. Funciones de macrófagos

Los macrófagos monitorizan eficientemente a sus alrededores para detectar patógenos invasores, mediante la expresión de varios receptores de la superficie celular, como el receptor de manosa, receptor de glucano, los receptores carroñeros y los receptores *Toll Like Receptor* (TLR) (6). La unión del ligando a dichos receptores inicia la fagocitosis, que conduce a la estimulación de los linfocitos mediante la presentación de antígenos bacterianos y a la activación de otras células inmunes mediante la secreción de citocinas y quimiocinas como interleucinas IL-1, IL6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y CXCL8 (7). Esta orquestación de la respuesta inmune por parte de los macrófagos ayuda a inducir la **inflamación**, que es un requisito previo para la defensa exitosa frente al patógeno y permite que los monocitos circulantes dejen el flujo sanguíneo y migren dentro de los tejidos, para luego diferenciarse en macrófagos (2,4).

Los macrófagos contribuyen a **la homeostasis**, mediante la endocitosis y fagocitosis, y actúan como carroñeros generales limpiando patógenos, células muertas y restos celulares, lo que es esencial en la reparación de heridas; por ejemplo, los macrófagos del bazo eliminan los eritrocitos senescentes (5). Por otro lado, **los macrófagos asociados a tumores (TAM)** facilitan la angiogénesis, degradación de la matriz extracelular, así como la inhibición de la respuesta de las células T antitumorales, lo que permite la metástasis (8).

La acumulación de macrófagos cargados de colesterol (células espumosas) en la pared de la arteria está estrechamente relacionada con la aterosclerosis, al impulsar

el desequilibrio del metabolismo de los lípidos y la **respuesta inmune adaptativa**. Los macrófagos de médula ósea CD¹⁶⁹⁺ apoyan la eritropoyesis en condiciones patológicas mientras que los macrófagos asociados a los músculos promueven la regeneración del músculo esquelético después de una lesión (1). Por lo tanto, los macrófagos son un tipo de célula importante que contribuyen tanto a la patología como a la resolución en todas las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas que van desde infecciones, cáncer, obesidad, aterosclerosis, trastornos autoinmunes hasta enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (2,9).

1.1.2. Plasticidad y polarización

La polarización de los macrófagos es un proceso mediante el cual muestran un fenotipo específico y una respuesta funcional a los estímulos y señales microambientales. Se conocen dos subpoblaciones: **clásicamente activados o inflamatorios (M1)** y, **alternativamente, los macrófagos no activados o antiinflamatorios (M2)**. El desbalance entre ambas subpoblaciones puede promover desórdenes inflamatorios (7).

Los **macrófagos M1** participan en la eliminación de patógenos durante la infección a través de la activación del sistema NADPH (Nicotinamin Adenin Dinucleótido fosfato) oxidasa, así como en la presentación de antígeno (4), en la expresión de receptores de quimiocinas CCR1 y CCR5 y en la promoción de la diferenciación hacia helper T tipo 1 (Th1) y Th17 (7). Se producen en un entorno **inflamatorio** dominado por el receptor TLR y la señalización del IFN- γ . Son típicamente inducidos por citoquinas, como IFN- γ y TNF- α , o por reconocimiento de lipopolisacárido (LPS), y en estos dos últimos casos, están asociados con infección aguda, que desencadena rápidamente una actividad antimicrobiana robusta en el microambiente hipóxico (5). Los macrófagos M1 producen y secretan altos niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 y ciclooxigenasa-2 (COX-2) (11), que son importantes para la actividad antimicrobiana del macrófago. Dicha actividad es promovida por especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y bajos niveles de IL-10. Además, en macrófagos murinos se produce una expresión inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (10). Sin embargo, las reacciones excesivas podrían provocar daño tisular y conducir a restricciones que favorecen infecciones secundarias.

Por el contrario, la respuesta inflamatoria crónica es inhibida por mecanismos reguladores de los **macrófagos M2**, evitando reacciones inmunes destructivas. Los macrófagos M2 tienen la capacidad para participar y promover la **respuesta inmune tipo 2**, que se desencadena en respuesta a la infección parasitaria, el asma y los trastornos alérgicos (1). Su función se caracteriza por una alta actividad mitocondrial y

fosforilación oxidativa; además, tienen un perfil de citocinas antiinflamatorias, que se caracteriza por una baja o nula producción de IL-12 y una alta producción de IL-10 y TGF- β o glucocorticoides (10). Funcionalmente, los macrófagos M2 tienen la potente capacidad de fagocitosis, eliminan los desechos y las células apoptóticas, promueven la reparación de tejidos y la curación de heridas, poseen propiedades pro-angiogénicas y pro-fibróticas (11), y producen catecolaminas para mantener la termogénesis adaptativa en respuesta al frío. Se han descrito varios subconjuntos de macrófagos de tipo M2 de acuerdo al tipo de estímulo: tipo M2a, tipo M2b y tipo M2c (12). Por otro lado, los TAM se han definido como un nuevo subconjunto similar a M2, M2d, que pueden inhibir los macrófagos proinflamatorios M1(13)

En trabajos recientes se menciona la presencia de una reprogramación negativa mediada por macrófagos M3, que regulan la respuesta pro y antiinflamatoria según la población de macrófagos M1 o M2. Por tanto, estos macrófagos tendrían una función importante para el control de enfermedades inflamatorias (14).

Existe una nueva nomenclatura recientemente propuesta, que refleja estímulos específicos, por ejemplo, M (IFN γ) y M (LPS) en lugar de M1 para macrófagos proinflamatorios; M (IL-4) y M (IL-10) para fenotipos antiinflamatorios o reparadores en lugar de M2 (13). La representación esquemática de los tipos de macrófagos está en la figura 1.

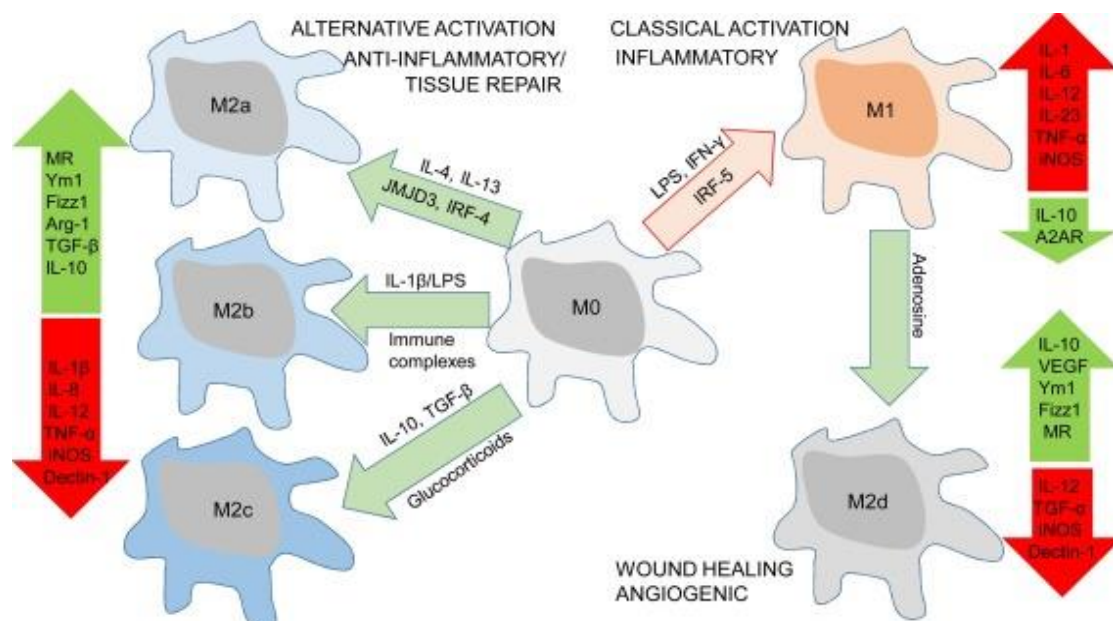


Figura. 1. Polarización de macrófagos no activados (M0) a clásicamente activados (M1) y macrófagos alternativamente activados. Chistiakov et al., 2018.(15) *The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2.* [Revisión].

1.1.3. Inflamación y activación de los macrófagos

La inflamación es la respuesta fisiológica a una variedad de lesiones, incluidas las infecciones, y conduce a una compleja respuesta inmune innata *in situ*, que conduce al inicio de la cascada inflamatoria y a la activación de una respuesta adecuada ejercida por los macrófagos (4). Este proceso comprende cuatro fases interrelacionadas: reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos por receptores de reconocimiento de patrones expresados en macrófagos, enriquecimiento de la cantidad de macrófagos en tejido infectado localmente mediante el reclutamiento de monocitos circulantes y/o proliferación *in situ*, mediación de macrófagos de la actividad microbicida y conversión a fenotipo antiinflamatorio para terminar la respuesta antiinfecciosa y promover la reparación de tejidos (1).

En la primera fase, los monocitos circulantes pasan el endotelio vascular para convertirse en macrófagos en los tejidos periféricos. En estos tejidos, los macrófagos pueden activarse de diversas maneras por factores endógenos o exógenos (11). La detección de estímulos exógenos, como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) tipo LPS, que son liberados por patógenos invasores (4), se produce mediante una serie de receptores, como receptores de reconocimiento de patrones (PPR) tipo TLR, receptores de lectina tipo C (16), receptores de hormonas nucleares y citoquinas, y moléculas de adhesión. Sin embargo, el repertorio de estos receptores varía entre los macrófagos de los distintos tejidos.

1.1.3.1. Los receptores TLR4

Los TLR fueron los primeros PRR identificados y son los mejor caracterizados (4). Son proteínas transmembrana de tipo I que contienen un ectodominio para el reconocimiento del PAMP, una región transmembrana y dominios citosólicos del receptor Toll-IL-1 (TIR) para activar las vías de señalización intracelulares. Se han identificado diez y 12 TLR funcionales en humanos y ratones, respectivamente (17). **TLR4 reconoce LPS, tras el inicio de la respuesta inmune innata contra la infección; por este motivo, se ha empleado en este el estudio para estimular la inflamación a través de este receptor.** La activación de TLR4 induce cambios moleculares en los dominios TIR, que interaccionan entre sí y con la proteína adaptadora (MYD88), lo que induce el reclutamiento de la proteína TRAF6 (factor 6 de necrosis tumoral) a la membrana. A continuación, la quinasa TAK1 que traduce una señal que activa una quinasa de la familia IKK, que a su vez fosforila a I κ B asociada a NF- κ B en los macrófagos (14) (figura 2).

NF- κ B coordina el vínculo de la inflamación con los estados de enfermedad al inducir la expresión de citocinas inflamatorias (4), como TNF- α o IL-1, también citocinas de la familia IL-6 e IL-12, a saber IL-23 e IL-t27, que regulan la diferenciación de células T y la secreción de mediadores reactivos (18).

La activación desenfrenada de las respuestas TLR puede provocar inflamación excesiva y daño tisular, y contribuir a la patogénesis de trastornos inflamatorios como el shock séptico.

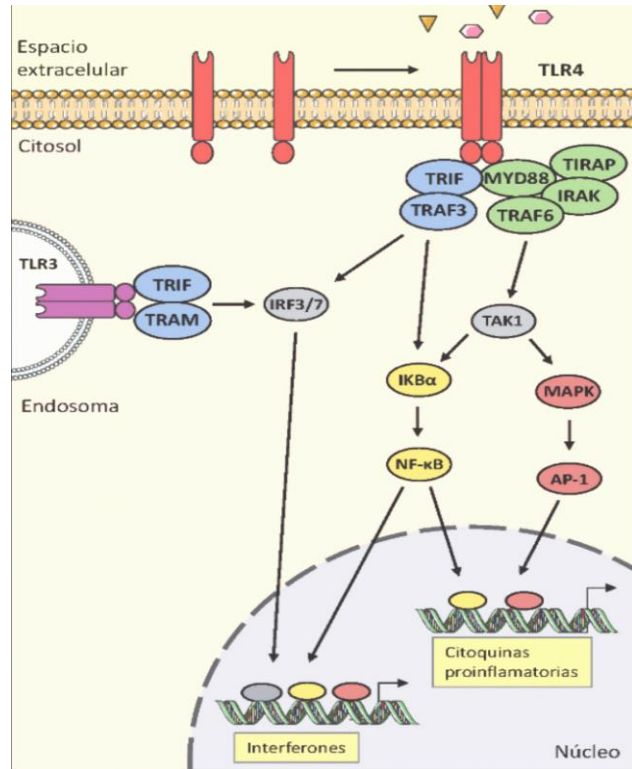


Figura. 2. Vía de señalización de TLR4 a través de TRIF y MDY88. González Guerrero, 2017. Nuevas dianas de la inflamación en modelos de daño renal. Estrategias de intervención terapéutica. Tesis. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10486/678314>

1.1.3.2. NF- κ B

NF- κ B es posiblemente uno de los reguladores más importantes de la expresión de genes proinflamatorios (19). La activación de NF- κ B por vía clásica canónica y la translocación nuclear constituyen un sello distintivo de la estimulación de macrófagos frente a PAMP o los patrones moleculares asociados a lesión (DAMP) a través de vías PRR. En ausencia de estímulo, algunos miembros de la familia NF- κ B ($I\kappa$ B) secuestran en el citoplasma al NF- κ B, que enmascara la señal de translocación nuclear de NF- κ B, reteniendo así el factor de transcripción en el citoplasma en forma inactiva (20). Tras la estimulación celular, inducida por un patógeno o una señal de estrés, $I\kappa$ B α es fosforilada por el complejo de IKK, lo que conduce a la degradación mediada por ubiquitina de $I\kappa$ B en el proteasoma 26S (19), que permite que los dímeros NF- κ B (p50-p65), se trasladen al núcleo y se unan al ADN, con el fin de inducir la transcripción de sus genes diana como TNF- α , IL-1, IL-6, COX2, VEGF (factor de crecimiento endotelial), GM-CSF (Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos), CCL2, etc (20).

Existen diferentes vías para la **reprogramación de los macrófagos a M1**, como la vía HIF1 α , JAK/STAT1, JNK, TLR/NF- κ B (p65-p50), PI3K/AKT y la vía **NOTCH** que se procederá a estudiar en el siguiente apartado.

1.2. Los receptores *NOTCH*

Los receptores *NOTCH* fueron descubiertos por John Dexter y Thomas Hunt Morgan, cuando observaron en mutantes de alas dentadas en *Drosophila melanogaster* (21). Estos receptores se encuentran presentes en diversos metazoos. En las moscas se descubrieron un receptor *NOTCH* y dos ligandos, que son las proteínas transmembrana Delta y Serrate (Ser). Los mamíferos tienen cuatro parálogos de *NOTCH* (*NOTCH1-4*) que se encuentran en posiciones cromosómicas sinténicas (22), y varios ligandos similares a Delta (DLL1, DLL3 y DLL4) y Jagged (JAG1 y JAG2) (18), que se tratarán a continuación.

1.2.1. Estructura de los receptores *NOTCH*

Los receptores *NOTCH* son glucoproteínas que tienen aproximadamente 300 kDa y se expresan en la superficie celular como heterodímeros. El **dominio extracelular (NECD)** contiene de 29 a 36 repeticiones similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) esenciales para la unión del ligando (17), seguidas de las repeticiones Lin / *NOTCH* (LNR) ricas en cisteína y la HD que evita la activación del receptor. En ausencia de ligando forman la NRR, que oculta el sitio de escisión para una enzima desintegrina y metaloproteasa (ADAM) (23), el **dominio transmembrana (TM)** que transmite la señal al núcleo y el **dominio intracelular (NCID)** que está implicado en la señalización celular. Este NCID contiene múltiples dominios de proteínas conservados (24) y presenta un dominio RAM, reconocido por el factor de transcripción RBPJ, dos secuencias de localización NSL, seis repeticiones de CDC10/ ankirina (ANK), que son necesarias para las interacciones con el complejo de unión al ADN CSL (CBF1, Supresor de Hairless, LAG1), una secuencia NCR para responder a las citocinas, un dominio de activación transcripcional (TAD) y la región rica en prolina-glutamato-serina-treonina (PEST), que tiene cualidades proteolíticas (25).

Los cuatro receptores tienen estructuras similares, con diferencias a nivel de NECD en la región amino terminal: *NOTCH1* y 2 tienen 36 repeticiones EGF, *NOTCH3* tiene 34 y *NOTCH4* tiene 29. Por otro lado, el dominio de transactivación no se encuentra en los receptores *NOTCH3* y *NOTCH4*.

1.2.2. Ligandos canónicos

Los ligandos deben ser endocitados y reciclados de vuelta a la superficie celular antes de madurar y ser competentes para la señalización (26). Los ligandos de DSL de mamíferos son un subtipo de ligandos que pueden actuar solos, como DLL4, o en combinación con coligandos DOS (24). Los ligandos DSL son proteínas transmembrana de tipo 1 que comparten una disposición común en sus **dominios extracelulares** que comprenden un dominio N-terminal (MNNL), seguido por el dominio DSL y múltiples

repeticiones similares al EGF en tándem que son necesarias, pero no suficientes, para las interacciones con *NOTCH*, y un dominio rico en cisteínas (27,28). **Los dominios intracelulares** presentan el nivel más bajo de homología de secuencia global (29), con la excepción de Dll3, y contienen múltiples residuos de lisina, que son sitios potenciales para la actividad de distintas ubiquitinas ligasas E3 (D'Souza et al., 2010). En la figura 3 se detalla la estructura de los receptores y ligandos *NOTCH*.

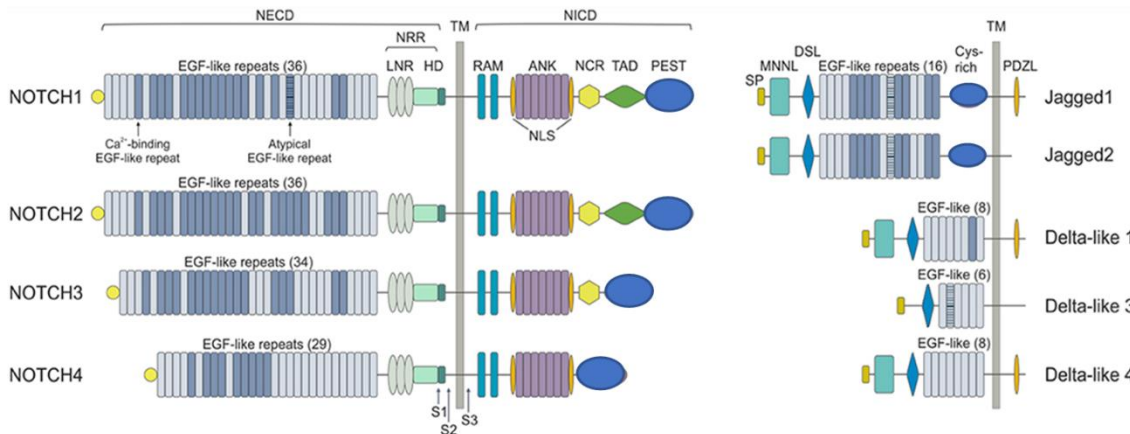


Figura. 3. Receptores NOTCH y sus ligandos canónicos. Arruga et al., 2018. (27). *The NOTCH Pathway and Its Mutations in Mature B Cell Malignancies*. Artículo. Recuperado de 10.3389/fonc.2018.00550.

1.2.3. Vía de señalización de *NOTCH*

Existen sistemas de comunicación celular conservados en los metazoos, por lo que mayoría de las células de un organismo se comunican durante el desarrollo y toda la vida a través de los receptores y ligandos. Se conocen dos tipos de interacciones célula-célula y en la misma célula conocidas como **interacción *trans* y *cis***, respectivamente (23). La interacción *trans* conduce a la activación del receptor, mientras que la interacción ligando-receptor en *cis*, inhibe la señalización. Por otro lado, otro posible modo de **señalización a larga distancia** puede depender del uso de exosomas, pequeñas vesículas de membrana que se liberan de una célula y pueden fusionarse con otras células a distancia (31). La información es transmitida desde la superficie celular al genoma a través de un mecanismo simple, pero desempeña múltiples funciones en el desarrollo y la enfermedad (32).

El receptor *NOTCH* se procesa proteolíticamente en varios sitios diferentes, de los cuales tres están asociados con la señalización canónica. **La escisión del sitio 1 (S1)** está controlada por la furina convertasa y se ejecuta en el tránsito desde el Golgi hacia la membrana plasmática como un heterodímero inactivo (32). **La división S2**, se produce en respuesta a la interacción del ligando, es un "modelo de tracción", ya que el

ligando ejerce una fuerza de tracción sobre el receptor, que permite la división S2, que da lugar al dominio intracelular. A continuación, el ligando elimina el dominio extracelular y lo internaliza en los lisosomas de la célula que expresa el ligando (33). La escisión de S2 está mediada por una proteína de la familia ADAM, como ADAM 10 o 17, conocidas como homólogas de las proteínas Kuzbanian y TACE, respectivamente, y su papel está relacionado con la liberación del ectodominio (32). **La escisión S3** es llevada a cabo mediante proteólisis constitutiva a través del complejo de múltiples proteínas γ -secretasa en el sitio 3. La escisión ocurre en la membrana plasmática, liberando la NICD escindida en Val1744 (NICD-V), o en el ambiente ácido de las vesículas endocíticas, liberando NICD - S (escindida en Ser1747). **La escisión en el S4** se realiza por la γ -secretasa que libera el péptido β de *NOTCH* extracelularmente (23).

La NICD, una vez escindida, se transloca al núcleo e interactúa con CSL/CBF/RBP-Jk, y juntas se unen a las regiones promotoras de genes inducibles por *NOTCH*. La unión de *NOTCH* a CSL produce la transactivación de una gran variedad de genes, reclutando coactivadores como la proteína MAML (Mastermind-like, P300) y PCAF (factor asociado a P300/CBPF) (32). Entre los genes diana mejor caracterizados de los receptores *NOTCH* se encuentran los genes *Hairy Enhancer of Split (HES)* y *Hairy Related (HEY)*, pero se han caracterizado otros muchos como Akt, ciclina D1, c-myc, COX-2, ERK, NF- κ B, p21, p27 y p53, entre otros (34).

La escisión proteolítica gradual de *NOTCH* proporciona un mecanismo simple, directo e irreversible para transmitir una señal extracelular al genoma, la cual es directa, lineal, transitoria y sin amplificación de señal, ya que cada receptor se usa solo una vez y el NICD liberado dura poco.

El NICD se somete a amplias modificaciones postraduccionales que incluyen metilación, hidroxilación, acetilación, ubiquitilación y fosforilación, que pueden proporcionar nuevas vías para la modulación de la señal. Asimismo, la corta duración del NICD es importante para el control dinámico de la señalización de *NOTCH*, controlándose su vida media mediante ubiquitinación y degradación por el proteasoma (15,19). Por otro lado, la manera de organizarse de los ligandos y receptores en la membrana celular para provocar la señalización sigue siendo un área importante de la investigación de *NOTCH* (26).

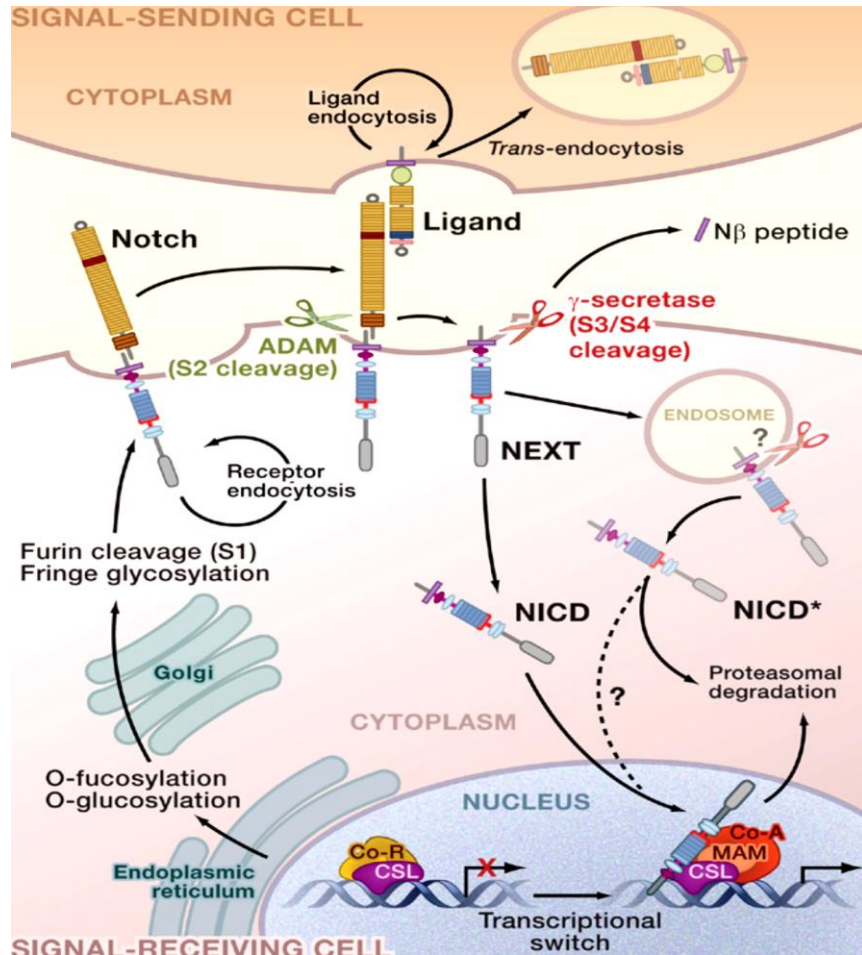


Figura. 4. Vía de señalización NOTCH regulada por proteólisis. Kopan & Ilagan, 2009. (35) *The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism*. Artículo.

1.2.4. Funciones de la vía

La vía de señalización de *NOTCH* regula la diferenciación celular, la embriogénesis, la somatogénesis, la migración, la proliferación, la supervivencia, el metabolismo y el desarrollo de varios tipos de células y órganos. También contribuye al desarrollo de diversos tipos de enfermedades inflamatorias, incluido el cáncer de mama, con niveles sobreexpresados de los receptores (17). Este hecho hace que la señalización de *NOTCH* sea considerada un objetivo atractivo para modular el sistema inmunitario durante afecciones patológicas y para la terapia contra el cáncer.

La función de la señalización de *NOTCH* ha sido mejor estudiada durante el desarrollo y maduración de varios subconjuntos de linfocitos en el timo (36), especialmente linfocitos T, mediados por señalización canónica *DLL1-NOTCH2*, sin requerir de *HES1* (37). Al mismo tiempo, se ha visto que la inhibición del receptor *NOTCH1* produce un bloqueo completo de activación de las células T acompañado de la acumulación de las células ectópicas en el timo. El efecto inverso se observa cuando este receptor presenta una activación constitutiva. Por otro lado, las mutaciones de

NOTCH1 y *NOTCH2* en la médula ósea conducen a un trastorno mieloproliferativo. También, la expresión de *NOTCH1*, o la expresión compensatoria de *NOTCH2* en ausencia de *NOTCH1*, es determinante para la diferenciación de células Th1 que secretan IFN- γ durante la infección de *Leishmania major* (38).

La desregulación de la señalización de *NOTCH* en el sistema hematopoyético está relacionada con la leucemia y linfoma. En estas neoplasias se observaron translocaciones cromosómicas que involucran a *NOTCH1* (más del 50 % de pacientes tienen mutaciones en este receptor), lo que produce una mayor escisión del receptor o liberación de NICD (39). Se ha descrito la importancia de este mismo receptor en el inicio y progreso de esclerosis múltiple usando el modelo experimental murino EAE, en el que la ausencia del gen *NOTCH1* permitió una progresión menos severa de EAE (40).

La señalización *NOTCH* se requiere tanto en el corazón como en la cresta neuronal. La sobreexpresión de *NOTCH* en el miocardio de ratones produce una conducción aberrante y una preexcitación ventricular, similar a la observada en el síndrome de Wolff Parkinson-White. También, *NOTCH* participa en la homeostasis de las células dendríticas (36)

1.2.4.1. NOTCH3 y CADASIL

NOTCH3 se encuentra ubicado en el cromosoma 19p13 que codifica un receptor (41). El dominio extracelular es codificado por los exones de 2-24, donde se sitúan las mutaciones. La presencia de la mutación en uno de estos es la causa de la arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL) (42). Los pacientes tienen degeneración de las células vasculares del músculo liso, lo que conduce a accidentes cerebrovasculares, que se acompañan con cambios en la sustancia blanca. La enfermedad autosómica dominante presenta mutaciones sin sentido, que afectan la distribución de residuos de cisteína en las repeticiones EGF (23), por lo que se pierde un residuo de cistina o se agrega uno nuevo, de tal manera que deja un mal plegamiento del receptor (43) y la agregación del dominio extracelular, conocido como el material osmiófilo granular (GOM), el cual sirve para el diagnóstico de la enfermedad y el principal mecanismo de patogenicidad. Por otro lado, varios autores han mostrado que la alteración de *NOTCH3* no es determinante de la enfermedad. Sin embargo, se requieren más estudios para comprender el papel de *NOTCH3*, de tal manera que permita un diagnóstico certero.

1.2.4.2. **NOTCH4**

Estudios del rol de *NOTCH4* en la inflamación no se hallan en la literatura, sin embargo, se encuentran dirigidos a cáncer, esquizofrenia, enfermedades renales y esclerosis múltiple. En los pocos estudios hallados, se identifica a *NOTCH4* como un regulador negativo de la respuesta inducida de *Mycobacterium tuberculosis*, ya que se ha visto que la deficiencia de *NOTCH4* en ratones hace que estos sean más resistentes a este patógeno, con una carga bacteriana mucho menor y menos cambios patológicos en los pulmones. Además, la producción de citoquinas proinflamatorias se ve inhibida por interacción de TAK1, así como de su interacción (44).

1.2.5. **Participación de la vía en la activación de macrófagos**

Estímulos proinflamatorios como el LPS, IFN- γ , IL-1 β o modificaciones mínimas de la lipoproteína de baja densidad activan a los macrófagos humanos primarios, que adquieren la habilidad para expresar los elementos de la vía *NOTCH*. La activación de los macrófagos empleando LPS, reconocido por el receptor TLR4, activa a la subpoblación proinflamatoria de macrófagos, M1, M (LPS), desencadena la expresión de los integrantes de la vía de señalización *NOTCH* (figura 5), y deja repuestas como la inducción de la vía del NF- κ B, la expresión de iNOS y TNF- α , características de la activación proinflamatoria del macrófago. Muchos estudios han demostrado la interrelación en múltiples niveles entre las vías *NOTCH* y NF- κ B.

Otros estudios han informado de la expresión de *NOTCH1-4* y sus ligandos en macrófagos primarios murinos, pero no en humanos. Por ejemplo, en modelos *knockout* específicos de la línea mieloide de *NOTCH1*, se ha descrito una disminución de mediadores proinflamatorios (45). Nuestro grupo de investigación reportó un ciclo de retroalimentación positiva entre *NOTCH* y TLR, además la activación del receptor *NOTCH1* por LPS, causó la liberación del NICD (46). Por otro lado, se ha descubierto que la activación de TLR4 induce un incremento temprano rápido y transitorio de la expresión de *NOTCH3*, seguido de los demás receptores, además, de haber una diafonía entre *NOTCH3* y *NOTCH1* y una modulación de *NOTCH1* a *NOTCH3*. También, un siARN de *NOTCH3* inhibió la producción de citocinas proinflamatorias; además, *NOTCH4* inhibe la vía de señalización *NOTCH* por inhibición y su sobreexpresión produce una baja producción de citocinas proinflamatorias (47). Otro estudio del grupo informa resultados similares, pero agrega que los niveles de ARNm de *NOTCH3* no se inducen tras la activación de los macrófagos vía TLR4 con LPS, en contraste con los demás receptores que se expresan en mayor medida (48).

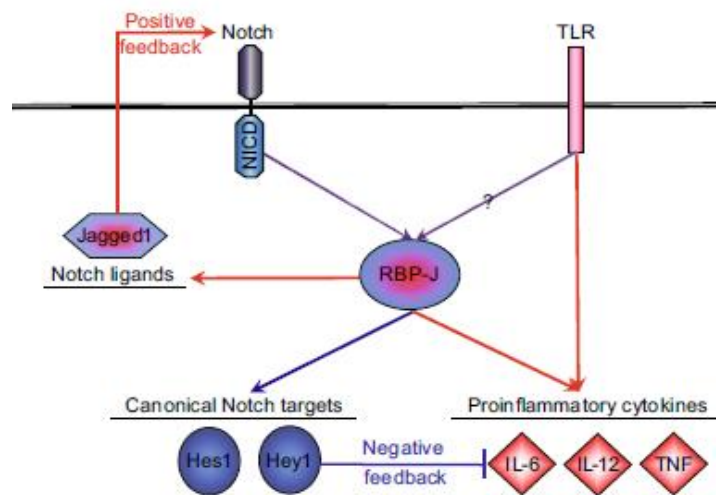


Figura. 5. Diafonía entre la vía de señalización TLR y la señalización NOTCH. Shang et al., 2016 (49). *Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease*. Revisión.

2. Estado de la cuestión

¿Cuál es la función de los receptores *NOTCH* en monocitos humanos por activación proinflamatoria mediada por TLR4?

3. Hipótesis

Los receptores *NOTCH* participan en la activación de los monocitos humanos por activación proinflamatoria mediada por TLR4.

4. Objetivos

- a) Determinar la expresión de los receptores *NOTCH* en monocitos humanos por estimulación de la señalización TLR4.
- b) Analizar la expresión de los ligandos canónicos *DELTA1* y *DELTA4* tras la activación de los monocitos humanos por estimulación proinflamatoria con LPS.
- c) Estudiar la expresión del gen diana *HES1* durante la activación de los monocitos humanos en respuesta al estímulo proinflamatorio anteriormente mencionado.

5. Material y métodos

5.1. Cultivo de monocitos humanos

5.1.1. Extracción de monocitos de *Buffy coat* a partir de sangre de donantes.

Las muestras de sangre procedieron de donantes de sangre del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA), aprobado por el comité de ética del hospital.

Los monocitos humanos se obtuvieron a partir de la capa leucocitaria entre el plasma y los glóbulos rojos, llamada en inglés *Buffy coat*, tras la centrifugación de la sangre total. Se siguió el protocolo que a continuación se detalla y que fue previamente establecido por el laboratorio: el *buffy* se dejó por 30 minutos en el balancín, se lavó la bolsa externamente con etanol de 70 %, se repartió su contenido en dos tubos Falcón de 50 mL y se completó hasta 50 mL con PBS sin Ca^{2+} y sin Mg^{2+} . Luego se llevó a la centrífuga Eppendorf 5810R a 20°C por 10 minutos a 648 g a una aceleración de 3 y de velocidad de frenado de 0. A continuación, se aspiró el suero y se dejó 1 cm por encima del halo que se forma de PBMC, que es una capa de color blanquecino. Se aspiró la capa PBMC y se resuspendió en un volumen de 35 mL de PBS, y se añadió de manera cuidadosa sobre 15 mL de ficoll, seguido de una centrifugación a 400 g sin freno ni aceleración por 40 minutos a 20°C. Tras esto se formaron distintas fases, se obtuvo aquella que fue de color blanquecino entre el ficoll y el plasma, se le adicionó 50 mL de PBS en tubos Falcon de 50 mL con el PBMC y se llevó a centrifugar a 20°C por 10 minutos a 300 g, sin freno ni aceleración. El sedimento obtenido se resuspendió en PBS y se completó en 50 mL de volumen, y luego se centrifugó por 10 minutos a 200 g por 20 °C sin freno ni aceleración, para eliminar plaquetas. El sedimento se resuspendió en medio DMEN sin suero, suplementado con 4mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

En el paso donde se completó con 50 mL de PBS, se realizó el conteo de los monocitos en la cámara de Neubauer y se emplearon 10 µL de azul de tripan con 10 µL de las células suspendidas en PBS (relación 1:2), lo que permitió determinar qué células estaban vivas. Después, la siembra de los monocitos se realizó en placas de P60 en una cantidad de 20×10^6 células/mL, de las cuales el 10 % fueron monocitos. Las células se mantuvieron en incubador a 37°C y atmósfera de 5 % de CO_2 durante 24 horas.

5.2. Activación de los monocitos

Tras la siembra de los monocitos y su adhesión a la placa, se aspiró el medio y se lavaron dos veces con PBS. Luego se activaron mediante la suplementación del medio DMEN con LPS procedente de *Salmonella typhimurium* (Sigma-Aldrich, Sint Louis, Mi, EE. UU) a una concentración de 100 ng/mL. Este medio contenía 5% de FBS (suero fetal bovino), 4 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg de estreptomicina. Se consideraron diferentes tiempos de exposición frente a LPS.

5.3. Análisis de la expresión génica

5.3.1. Extracción de ARN

Luego del tratamiento, las placas se retiraron del incubador, el medio fue aspirado mediante bomba de vacío y las placas se almacenaron a -20°C. La extracción de ARN se hizo mediante el método de Trizol descrito a continuación:

A las placas se les añadieron 500 µL de trizol (Sigma- Aldrich), se homogenizó y se dejaron por cinco minutos a temperatura ambiente y el contenido se pasó a tubos eppendorf. Luego se les añadió 100 µL de cloroformo, se agitaron mediante vórtex durante 15 segundos y se dejaron de 2-15 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 14,4 g por 15 minutos a 4°C, se separó cuidadosamente la fase superior acuosa que contenía el ARN y se transfirió a un nuevo tubo, al que se añadieron 250 µL de 2-propanol y se mezcló, se centrifugó a 6,9 g por 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El pellet de ARN se lavó con 1 mL de etanol al 75 %, se agitó en vórtex y se centrifugó a 9,05g por cinco minutos a 4 °C. El pellet de ARN se dejó secar por 10 minutos y se resuspendió en agua libre de ARNasas. Posteriormente se cuantificó la cantidad del ARN obtenido mediante espectrofotometría a 260 nm en el NanoDrop One/OneC (Thermo Fisher Scientific, Walthman, MA, EE. UU.).

5.3.2. Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó en el termociclador Cyclor marca Bio-Rad, y se empleó el Kit 'RevertAidH Minus First Strand, cDNA Syntesus Kit (Thermo Scientific, Lituania). Se consideró de 400 a 500 ng de ARN total, que se mezclaron con 1 µL de oligo-dT (0,5 µg/µL) y completó con el resto de agua a un volumen final de 12 µL. Se incubó a 65°C por 5 minutos en el termociclador. Una vez culminada la reacción, se adicionó buffer de reacción (5X) 4 µL, 2 µL de dNTPs mix (10 mM), 1 µL de inhibidor de ARNasa (Ribolock Rnasa inhibitor (20u/µl)) y 1 µL de transcriptasa reversa (RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl)). Luego se llevaron al termociclador para obtener el ADNc, la programación fue de 5 minutos a 37°C, 60 minutos a 42°C y

10 minutos a 70°C. Después el ADNc se diluyó en 180 µL de agua libre de ARNasas (1:10) y se conservó a -20°C hasta su empleo.

5.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa empleó primers específicos para cada gen analizado. Se consideró en todos los a la GAPDH como un control interno o un gen *housekeeping*, cuya expresión no está afectada bajo ningún estímulo externo, es decir, se mantiene constante y sirvió para normalizar el nivel de expresión del resto de genes. La sonda empleada fue SYBR Green PCR Máster Mix (*Applied Biosystems*). El volumen final de cada reacción fue de 10 µL, compuesto por 5 µL de SYBR Green, *oligo up* 0,4 µL (7,5 µM), del mismo modo para el *oligo down* y de muestra de ADNc diluido, 4,2 µL. El volumen de reacción se cargó en una placa de 96 pocillos por triplicado. Luego, se centrifugaron a 3202 g por un minuto con el fin de recoger en el fondo todo el volumen de la reacción. El protocolo seguido para la PCR cuantitativa fue según el de SYBR GREEN de *Applied Biosystem*, considerando el sistema de detección de secuencias AB1 Prim 700 *Sequence Detection System* de la misma empresa. Para cada gen se obtuvieron los datos de Ct (*Cycle Threshold*) según las instrucciones del fabricante *TheStepOne™ Software*, de *Applied Biosystems*. Los datos se exportaron en hojas de cálculo de Excel y luego fueron analizadas. La expresión se calculó según esta fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde es $\Delta Ct = Ct_{\text{gen muestra problema}} - Ct_{P0}$.

Tabla 1. Lista de primers considerados para qPCR

Nombre	Sentido	Secuencia
GADPH	UP	5'-CCA TGA CCC CTT CAT TGA CC-3'
	DOWN	5'-GAT CTC GCT CCT GGA AGA TG-3'
NOTCH1	UP	5'-GG ACG ACA ACC AGA ATG AG-3'
	DOWN	5'-CAT CCA GGT GCT GCT GAG-T-3'
NOTCH2	UP	5'-ACA GTT GTG TCT GCT CAC CAG GAT-3'
	DOWN	5'-GGG GAA ACC ATT CAC ACC GTT GAT-3'
NOTCH3	UP	5'-AAT GCC TAG ACC TGG TGG ACA AGT-3'
	DOWN	5'-GTT GCT GGC ACA GTC GTC AAT GTT-3'
NOTCH4	UP	5'-AGG ACC AGA AAG ACA AGG CCA ACT-3'
	DOWN	5'-ACA CAC ACA TGA GGA TCT CTG GCA-3'
DELTA1	UP	5'-TGT GAC GAG TGT ATC CGC TAT CCA-3'
	DOWN	5'-AGG GCT TAT GGT GTG TGC AGT AGT-3'
DELTA4	UP	5'-ACT GCG AGA AAG TGG ACA GGT-3'
	DOWN	5'-ACA TGA GCC CAT TCT CCA GGT CAT-3'
HES1	UP	5'-GTC AAC ACG ACA CCG GAT AAA CCA-3'
	DOWN	5'-TTT CCA GAA TGT CCG CCT TCT CCA-3'
TNFα	UP	5'-GCA GGT CTA CTT TGG GAT CAT TG-3'
	DOWN	5'-GCG TTT GGG AAG GTT GGA-3'

5.4. Análisis de proteínas mediante WESTERN BLOT

5.4.1. Preparación de las muestras

Extracción de proteínas

El medio de las placas se aspiró mediante una bomba al vacío, y se volvió a lavar con 1 mL de PBS, luego se colocó la suspensión celular en un tubo y se repitió el anterior procedimiento, luego se centrifugaron a 19,3 g por un minuto para sedimentarlas, se retiró el sobrenadante y se guardó a -20°C, hasta su procesamiento.

Al momento de procesarlas se esperó a que se descongelara, luego se añadió 200 µL del mix de RIPA (HEPES 25mM pH 7,5, 0,3 M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 20mM B-glicerolfosfato, 0.5% desoxicolato sódico) para lisar a las células, luego se suplementó con inhibidores de proteasas (protease inhibitor cocktail, Sigma) inhibidores de fosfatasa (phosphatase inhibitor cocktail 2 y 3, Sigma) y DTT en un relación de 10:10:1. Luego se agitaron en vórtex durante 10 segundos, seguido fueron sometidos a agitación constante y fuerte por 30 minutos en cámara fría. Luego se centrifugaron durante 15 minutos a 19,3 g. Se procedió a guardar el sobrenadante, ya que contenía las proteínas extraídas, se conservaron a -20°C, para posterior cuantificación.

Cuantificación de proteínas

Las muestras almacenadas se retiraron del congelador y se mantuvieron en hielo, luego se procedió a la cuantificación de proteínas por el método de BCA. Se trabajó con una solución de concentración conocida de BSA de *Thermo Scientific* a concentración de 1 mg/µL, que permitió hacer una recta patrón de las concentraciones de la proteína. Las muestras de este último se hicieron por duplicado; por otro lado, las muestras problema se cargaron a 2 µL con 8 µL de agua, y también por duplicado. Se empleó la mezcla de RIPA, inhibidores y DTT como blanco, luego se procedió al cargado de una placa de 96 pocillos. Seguido se añadieron 200 µL de la solución de BCA, que contenía además de este último, 4 µL de solución sulfato previamente añadida. Posteriormente, se llevó a estufa a 37°C durante 20 minutos, y se hizo la medición de las proteínas a una λ de 562 nm, empleando el lector ASYS UVM 340.

5.4.2. Electroforesis en gel

Las muestras se prepararon a una concentración de 26 a 50 µg de proteína total para su análisis mediante *Western Blot*. Se mezcló con tampón de carga Laemly (50mM Tris HCl, pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%; 100 mM de β -mercaptoetanol con azul de bromofenol, 0,025%), luego se sometieron a 95°C durante 5 minutos. Se consideró el

marcador de peso molecular *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific, Made in Lituania) de 120 kDa a 250 kDa.

La separación de las proteínas se realizó en una electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturizantes, por lo que se empleó SDS. Se prepararon los geles de 10 % (gel resolutivo) y 4% (gel concentrador) para una separación de 15 a 300 kDa de proteína. El sistema empleado fue el mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) y se aplicó una corriente de 0,03 A por gel.

5.3.4. Transferencia gel- membrana

Una vez terminada la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (polidivinilo de fluoruro) marca Amersham, GE *Healthcare Life Sciences*. El sistema que se utilizó fue Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad), según especificaciones de la casa comercial:

Se activó la membrana con metanol y luego se hidrató. Se preparó el gel sándwich, se colocó el *cassette* con el lado gris hacia abajo, encima una almohadilla humedecida con el buffer de transferencia (25 mM Tris HCl, 192 mM de glicina, SDS 0,1% y metanol 20%), seguido un papel de filtro, después se colocó el gel previamente humedecido, sobre este un papel filtro y luego una almohadilla humedecida. Después se trató de eliminar las posibles burbujas al pasar una placa de vidrio y se cerró el *cassette* firmemente. Este proceso se hizo en medio húmedo. Luego se colocó el *cassette* en el tanque, y este se llenó hasta la línea límite con buffer de transferencia, también se colocó una barra de agitación para mantener uniforme la temperatura y la concentración de iones. Se aplicó 0,4 A durante dos horas.

5.4.3. Bloqueo

Las membranas se bloquearon con el propósito de bloquear los sitios de unión inespecíficos. Se colocaron por una hora en una solución de leche en polvo desnatada (5 %) en tampón TTBS (tampón salino con 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH7,4 y Tween -20 a 0,1%, según los requerimientos de los anticuerpos primarios, en agitación constante y suave a temperatura ambiente.

5.4.4. Inmunodetección

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios según las especificaciones de la casa comercial. Este procedimiento se realizó por toda la noche en agitación constante en cámara fría a 4°C. Seguido las membranas se lavaron por cuatro veces con TTBS (poner composición del tampón) en agitación constante y rápida durante 10 minutos cuatro veces a temperatura ambiente para eliminar los anticuerpos no unidos. Después se incubaron con el anticuerpo secundario por una hora

en agitación suave a temperatura ambiente, luego las membranas se lavaron cuatro veces con las mismas condiciones que el lavado anterior, con la excepción que en el último lavado se hizo con TBS (tampón salino con 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH7,4).

. Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpos primarios	Dominio de reconocimiento	Referencia	Tipo	Animal producido	Casa comercial
<i>ERK</i>		Sc-154	Policlonal	Conejo y cabra	Santa Cruz Biotechnology
<i>HES1</i>		Sc-13844	Policlonal	Cabra	Santa Cruz Biotechnology
<i>NOTCH 1</i>	TAD	Sc-6014	Policlonal	Cabra y conejo	Santa Cruz Biotechnology
<i>NOTCH 3</i>	NICD	Ab23426	Policlonal	Conejo	Abcam
<i>NOTCH 4</i>	NECD	Ab184742	Monoclonal	Conejo	Abcam

Posteriormente se procedió al revelado, se emplearon los correspondientes anticuerpos secundarios, acoplados a la peroxidasa de rábano picante (HRP). La detección de las proteínas se permitió visualizar mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL Plus *Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific). Las películas expuestas fueron reveladas mediante autoradiografía (Konica Medical Film, Tokio, Japón).

5.4.5. *Stripping* de las membranas

El *Stripping* se realizó con el fin de remover los anticuerpos primarios y secundarios de la membrana. Se empleó la solución de *stripping* 1X que contenía 100 mM β -mercaptoetanol, SDS 2% y 62,5 mM Tris HCl pH 6,7. Las membranas se sumergieron en esta solución durante 30 minutos a 60°C, con posteriores lavados con TTBS hasta eliminar el olor a mercaptoetanol.

5.4.6. Estudio por densitometría

Las películas obtenidas se escanearon, luego se determinó por densitometría la concentración de las proteínas identificadas y para esto se empleó el software *Quantity One* de Bio Rad. La identificación de la banda de la proteína de interés fue según los pesos moleculares especificados por la casa comercial.

5.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos del análisis de expresión relativa de ARNm y de proteínas totales fueron procesados en el programa Microsoft Excel v.2016. Se obtuvieron las medias y desviaciones de los triplicados de la qPCR, así como también de las muestras de *Buffy coat* que se procesaron, La expresión relativa se mostró en gráfico de barras y se seleccionaron datos de experimentos representativos.

6. Resultados y discusión

Los monocitos son una clase defensiva de células pleiotrópicas y el tipo más grande de PBMC. Una vez diferenciadas en macrófagos lanzan una serie de moléculas proinflamatorias necesarias para la respuesta inmune frente a cualquier antígeno que reconoce a través de diversos receptores en su superficie, como los receptores *NOTCH*, que son elementos clave en la polarización de los monocitos, ya que estimulan la producción de una serie de citocinas. Los receptores *NOTCH* se han estudiado en modelos murinos, sin embargo en el presente estudio se planteó analizar la expresión de estos receptores en monocitos humanos, obtenidos de muestras de sangre de donantes. El aislamiento de monocitos humanos se hizo mediante centrifugación de gradiente de densidad empleando ficoll, este método se desarrolló por Bayum en 1968 (50). El ficoll tiene una densidad de 1,007 g/ml, y debido a esta densidad elevada, la línea eritrocitaria, granulocitos y células muertas atravesarán la capa de ficoll, al mismo tiempo que los linfocitos y monocitos, que tienen menor densidad, se conglomerarán en la barrera gradiente del plasma.

Se procesaron 10 muestras de *buffy coats* para el aislamiento de monocitos humanos, los cuales se activaron con LPS a diferentes tiempos de exposición según la cantidad de células obtenidas por paciente. El rendimiento varió en función del género, en varones se obtuvieron mayor cantidad de células que en mujeres, como ya había sido reportado en la literatura científica. Los datos clínicos de los pacientes no se conocieron por cuestiones éticas.

Los monocitos aislados fueron expuestos a una misma concentración de LPS (100 ng/ml) a diferentes tiempos de exposición. El LPS de las bacterias Gram-negativas es uno de los estímulos de activación inmunológica innata más potentes que se conocen (51), del mismo modo se utilizan otros estímulos para polarización y maduración de las células como IFN γ , que resulta en un fenotipo proinflamatorio (M1), también IL o glucocorticoides para activar el fenotipo M2 (11). Las lecturas para la activación de los monocitos son la morfología, la expresión de algún marcador y la producción de citocinas, por lo que para determinar que el tratamiento con LPS activó a las células, se evaluó la expresión de ARNm de *TFN α* , citocina importante en procesos inflamatorios tras la activación por estímulos como LPS, que promueve el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos, De esta manera, se corroboró que el tratamiento activó a los monocitos. La expresión relativa del ARNm del gen *TFN α* se muestra en la figura 6, que correspondió a un experimento representativo. Se evidenció una inducción a partir de los treinta minutos hasta las tres horas, con máxima expresión en este tiempo y bajada abrupta a tiempos posteriores; por lo que este gen se expresa a tiempos cortos. Se ha

visto que en ratones deficientes de TLR4 (-/-) y en ratones C3H/HCJ que carecen de la capacidad de respuesta a LPS (RC-595) y al lípido A (506), no se produjeron niveles detectables de $TFN\alpha$ en respuesta a LPS (S. minnesota Res595), pero sí niveles bajos en respuesta a una concentración de O:55:B5 LPS, en contraste con los monocitos de tipos salvaje de ratones que produjeron mayores niveles de $TFN\alpha$ en respuesta a cada LPS de una manera dosis dependiente (52). Esto sugirió que la ausencia de la expresión del receptor TLR4 es clave para la activación de la vía de señalización implicada, así como también de la posterior activación de NF- κ B para subsecuente producción de citocinas proinflamatorias, como tal es el caso.

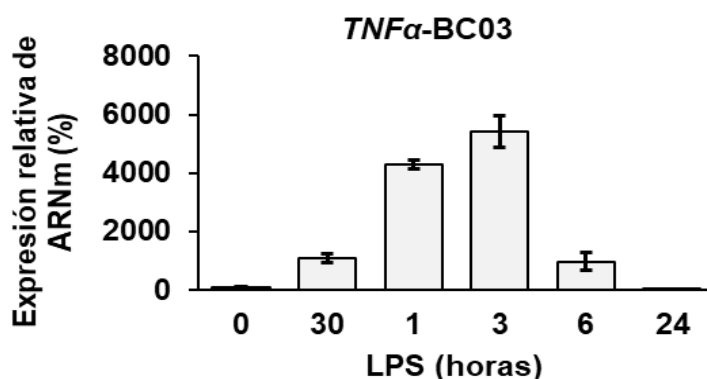


Figura 6. Análisis de la expresión relativa de ARNm de *TFN- α* obtenida tras la activación de monocitos humanos con LPS (100 ng/ ml). Se muestra los datos de un experimento representativo de *Buffy coats* BC03. Los valores se normalizaron mediante el gen *GAPDH* como control interno.

Los resultados presentados en este apartado indicaron que la vía de señalización TLR4 se activó por la producción de esta citocina proinflamatoria, por tanto, se procedió al estudio de los receptores *NOTCH*.

6.1. Estudio de la expresión de los receptores *NOTCH* en monocitos humanos por estimulación de la señalización TLR4

La señalización de *NOTCH* está ampliamente implicada en la determinación del destino celular a lo largo del desarrollo del sistema inmune, sin embargo no se ha definido su rol en células diferenciadas como los monocitos (53)

Se analizó la expresión de los receptores por medición de la expresión relativa de ARNm y la proteína total extraída de los monocitos a través de qPCR y *Western Blot*, respectivamente. La expresión de *NOTCH1* evidenció niveles mayores en comparación con los demás receptores, refiriendo que tras la activación de la vía de señalización TLR4 por LPS fue el receptor con mayor inducción (figura 6). Este mismo comportamiento también se ha visto en estudios realizados en monocitos hepáticos de

ratón y en una línea celular de monocitos murinos, en el que *NOTCH1* dictó la activación de los fenotipos M1 en la células mencionadas (54). El perfil de expresión de *NOTCH1* fue ligeramente progresivo, con una expresión abrupta a las 24 horas. Por otro lado, los niveles de expresión de los receptores *NOTCH2* y *NOTCH3* fueron similares; el patrón de expresión de *NOTCH2* presentó fluctuaciones en los diferentes tiempos, en la hora cero presentó niveles basales de expresión, con un pico máximo a los 30 minutos, bajada a las tres horas y a las 24 horas se observó una expresión similar que a los 30 minutos. Asimismo, el receptor *NOTCH3* presentó un patrón de expresión inducido, con una caída de su expresión, el pico máximo fue a las tres horas y bajada y similar expresión a las seis horas respecto al tiempo de una hora, y significativa disminución a las 24 horas. Los datos de los niveles de expresión de *NOTCH4* no se muestran, ya que no se obtuvieron datos fiables debido al mal funcionamiento de los oligonucleótidos diseñados para la q-PCR.

Los resultados mostrados en el estudio fueron similares a lo que el grupo de investigación reportó previamente, en el que en monocitos murinos de la línea RAW 264.7 *NOTCH1* se indujo fuertemente y *NOTCH3* no se indujo de manera significativa, sin embargo el nivel de expresión de *NOTCH2* no coincidió con el estudio (47). Probablemente esto se debió a la procedencia de las células, es decir, que se trabajó con líneas celulares en el modelo murino, mientras que en el presente estudio se han analizado células primarias procedentes de humanos, por lo que los patrones y niveles de expresión variaron.

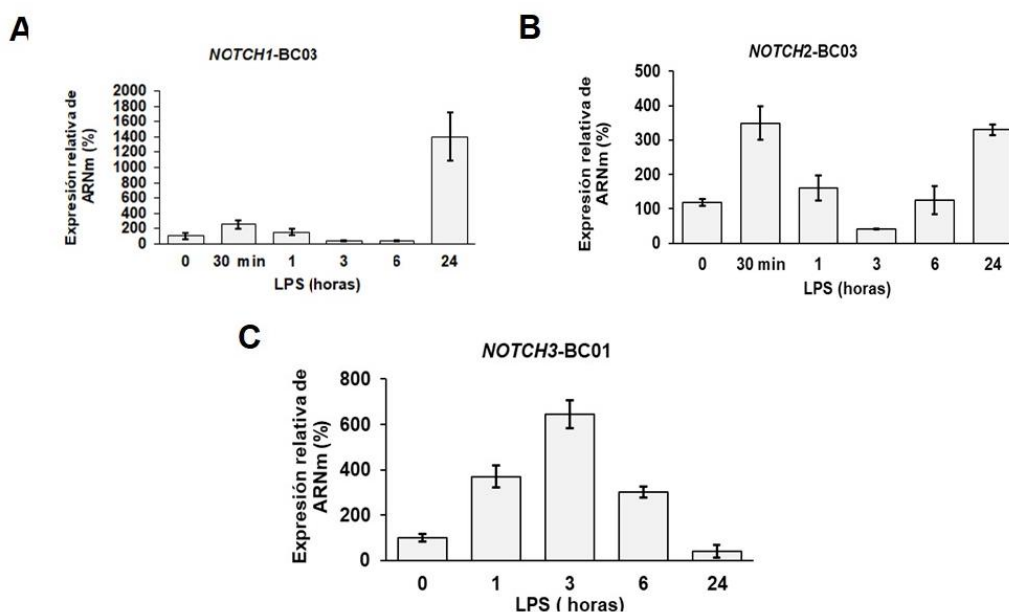


Figura 7. Análisis de la expresión relativa de ARNm de los receptores *NOTCH1*, *NOTCH2* y *NOTCH3* obtenida tras la activación de monocitos con LPS (100 ng/ ml). Se muestran datos de representativos de dos experimentos que correspondieron al *Buffy coats* BC1 y BC03. Los valores se normalizaron mediante el gen *GAPDH* como control interno.

Al mismo tiempo, se evaluaron los niveles de expresión de proteína total de cada uno de los receptores a excepción de *NOTCH2*, ya que no se disponía de un anticuerpo específico, por lo que limitó su estudio. La figura 8 muestra datos de dos experimentos representativos. *NOTCH1* presentó niveles de expresión mayores, seguido de *NOTCH4* y *NOTCH3*; por otro lado, los receptores analizados presentaron perfiles de expresión con fluctuaciones. *NOTCH1* se indujo tempranamente en los dos primeros tiempos y tardíamente en los últimos tiempos, tuvo una caída a las ocho horas y subida a las 24 horas, que coincidió con los perfiles de expresión de ARNm. Al mismo tiempo, la expresión del receptor *NOTCH3* fue mayor a cero horas y una hora de tratamiento, a diferencia de los demás tiempos y receptores; por tanto, su inducción fue mucho más temprana que *NOTCH1*, con una disminución de su expresión entre las tres y seis horas, mientras que a las 10 y 24 horas la expresión fue constante y coincidió con el aumento de los demás receptores. Este patrón de expresión de *NOTCH3*, sin embargo, no se correspondió con el de ARNm. El NCED de *NOTCH4* se indujo a tiempos prolongados, presentó una expresión similar a *NOTCH1* en el tiempo cero, una bajada en los mismos tiempos que *NOTCH3*, subida a las 10 horas, mostrando un nivel y perfil de expresión similar a *NOTCH1* a las 24 horas.

Los datos mostrados fueron similares a lo que reportó la investigación realizada en macrófagos murinos en nuestro laboratorio, en la que los perfiles de expresión de los receptores en monocitos de líneas murinas son semejantes a lo que se está reportando para monocitos humanos (47). Esto sugiere que a nivel transcripcional los patrones en ambas especies son similares y que los mecanismos a este nivel no se ven afectados por otros procesos.

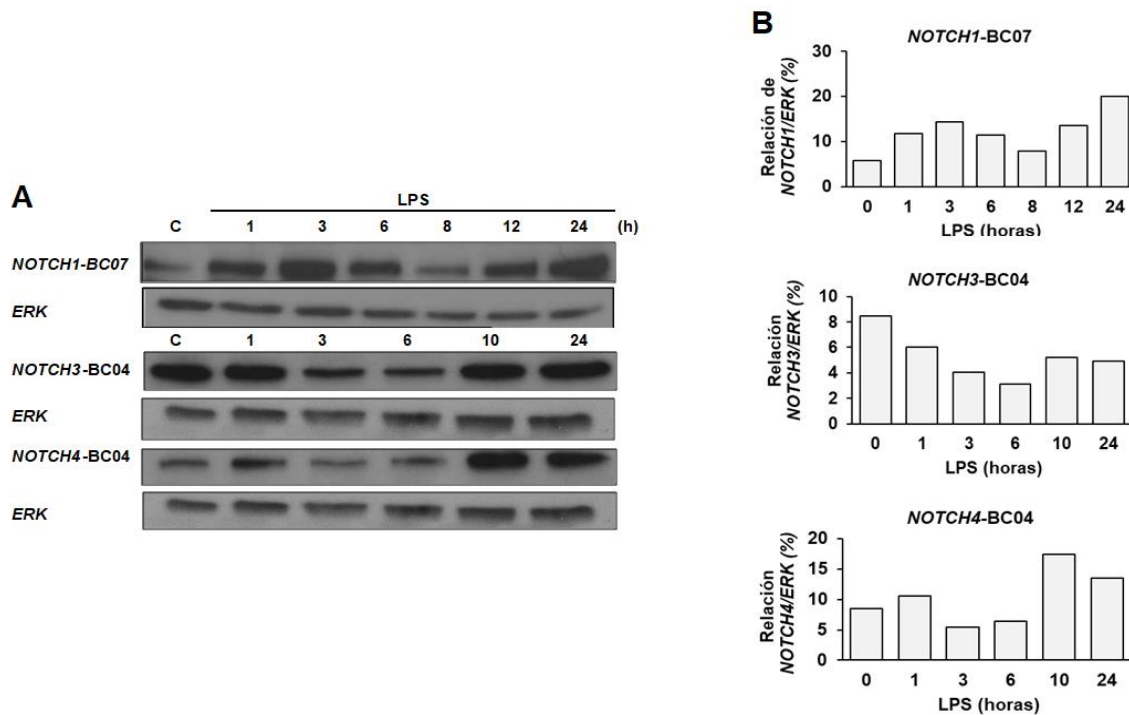


Figura 8 . Análisis de la expresión de proteína total obtenida mediante *Western Blot* de los receptores tras la activación de monocitos con LPS (100 ng/ ml). Se muestran dos experimentos representativos que correspondieron a los *Buffy coats* BC04 y BC07. El control de carga considerado fue de la proteína *ERK*. A. Proteína obtenida mediante *Western Blot* del dominio transmembranal (TAD) de *NOTCH1* de 120 kDa, NCID de *NOTCH3* de 97 kDa y NCD de *NOTCH4* de 150 kDa. B. Análisis de la relación *NOTCH/ERK*.

Los datos muestran que *NOTCH3* es un receptor clave en la activación temprana de monocitos, por su activación a tiempos cortos a nivel de proteína. El hecho de que el patrón de expresión a nivel de ARN no se correlacione directamente con el de proteína, hecho coincidente en monocitos humanos y murinos, nos da a entender que el aumento no depende de su síntesis, sino que estaría relacionado por una modulación continua por procesamiento postraduccional y/o estabilidad del receptor. Además, es importante señalar que la expresión temprana de la proteína *NOTCH3* es porque que la región NRR de este receptor es menos estable que la de los demás receptores (55), por lo que es más fácil de escindir. Asimismo, la expresión a cortos tiempos de este receptor indicó que la vía de señalización *NOTCH* estaría presente en la activación de monocitos de manera temprana y en los demás receptores de manera tardía.

Por otro lado, a nivel transcripcional *NOTCH3* estaría implicado en la expresión de citocinas proinflamatorias, como $\text{TNF}\alpha$, ya que como se observa en la imagen anterior, hay una coincidencia del perfil y máxima expresión de ambos genes a las tres horas (figura 6 y 8), por lo que este receptor estuvo más implicado en la activación del factor de transcripción de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ a diferencia de los demás receptores, en consecuencia se traduce en la expresión de genes proinflamatorios (46). Previamente, se ha confirmado tal implicación mediante ensayos de siARN y en ensayos de ratones

knockout (47). Un estudio de nuestro grupo de investigación destacó al receptor *NOTCH3* mediante ensayos de luciferasa y shARN, además que se corroboró mediante cicloheximidina una modulación postraduccional y/o estabilización del receptor; también se ha visto que en extractos nucleares, *NOTCH3* se detectó de manera temprana en el núcleo, a diferencia de los demás receptores (47).

6.2. Análisis la expresión de los ligandos canónicos *DELTA1* y *DELTA4* tras la activación de los monocitos humanos por estimulación proinflamatoria con LPS.

Los ligandos canónicos interactúan con los receptores *NOTCH* una vez inducida la vía de señalización, y ejercen una fuerza de tracción que permite la liberación del NCID al núcleo. El perfil de expresión de estos varía, ya que la interacción es estocástica. La expresión de ARNm de *DELTA1* y *DELTA4* se muestra en la figura 9. *DELTA4* evidenció niveles de expresión mayores que *DELTA1*; por otro lado, ambos ligandos tuvieron una expresión tardía, los perfiles de expresión fueron similares, con aumentos ligeramente progresivos y una abrupta subida a las 24 horas. En otros estudios se ha visto que ambos ligandos envían una dinámica de señalización pulsátil o sostenida a través del mismo receptor *NOTCH*, lo que induce el destino celular opuesto durante la embriogénesis (56).

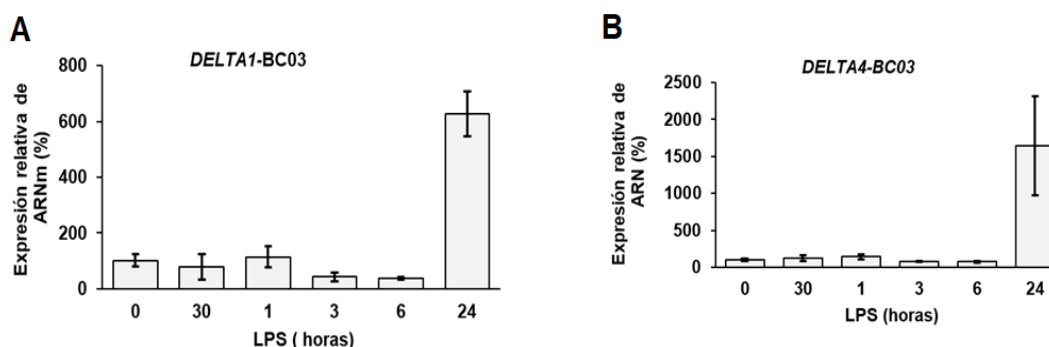


Figura 9. Análisis de la expresión relativa de ARNm de *DELTA1* y *DELTA4* obtenida de la activación de monocitos con LPS (100 ng/mL). Se muestra un experimento representativo que corresponde al *Buffy coats* BC03. Los datos se normalizaron con *GAPDH* considerado como control interno.

El nivel de expresión de *DELTA4* coincidió con el de *NOTCH1*; además, el perfil de expresión fue bastante similar, lo que podría sugerir que este ligando podría modular de forma más eficiente la señalización *NOTCH*, a diferencia de *DELTA1*. El laboratorio reportó similares resultados mediante ensayos de actividad luciferasa en la línea celular murina Raw 264.7, en el que se confirma que *DELTA4* es un activador importante de la vía de señalización estudiada (57). En dicho trabajo se menciona también que procesos postraduccionales mediados por proteínas de la familia de glicosiltransferasas *Fringe*, que glicosilan a los receptores *NOTCH* y que están relacionados con la afinidad y

respuesta a los diferentes ligandos, específicamente *DELTA-LIKE*, fundamenta la importancia de *DELTA4* en la vía *NOTCH* (47). La importancia de las proteínas *Fringe* en el proceso mencionado señala que es necesario estudiarlas para evaluar su relación con los ligandos y receptores *NOTCH*. Del mismo modo, sería interesante estudiar los ligandos *DELTA3*, *JAGGED1* y *JAGGED4* en procesos de activación de monocitos humanos, para analizar su implicancia en la vía de señalización *NOTCH* y verificar si los perfiles de expresión que han sido estudiados por nuestro grupo de investigación en línea murinas Raw267.4 son similares a los de las células humanas.

6.3. Estudio de la expresión del gen diana *HES1* durante la activación de los monocitos humanos en respuesta a LPS.

El NICD, una vez liberado en el núcleo, interacciona con CSL/CBF/ RBP-Jk, y juntos se unen a las regiones promotoras de genes inducibles por *NOTCH*, lo que produce la transactivación de una gran variedad de genes, y recluta coactivadores (32). Entre los genes diana mejor caracterizados de los receptores *NOTCH* se encuentra *HES1*. La figura 10 muestra datos de dos experimentos representativos de *HES1*.

La diana *HES1* a nivel transcripcional presentó un patrón de expresión con fluctuaciones, una inducción temprana a partir de la una y tres horas, con disminución progresiva a la seis horas y caída abrupta a las 24 horas. Al mismo tiempo, el perfil de expresión de proteína de esta diana *NOTCH* también presentó fluctuaciones, se indujo el tiempo de una hora, una bajada significativa a las ocho horas y subida a las 24, por lo que su inducción máxima fue tardía. Ambos perfiles analizados coincidieron en los tiempos de una y seis horas. La inducción de *HES1* señaló la activación de la vía de señalización *NOTCH*, así como se reportó en un estudio donde se informa sobre la participación de la señalización de *NOTCH* en la regulación de la expresión génica en monocitos activados (17). Este perfil analizado no fue similar a lo que se reportó en nuestro laboratorio, con monocitos procedentes de líneas murinas (47).

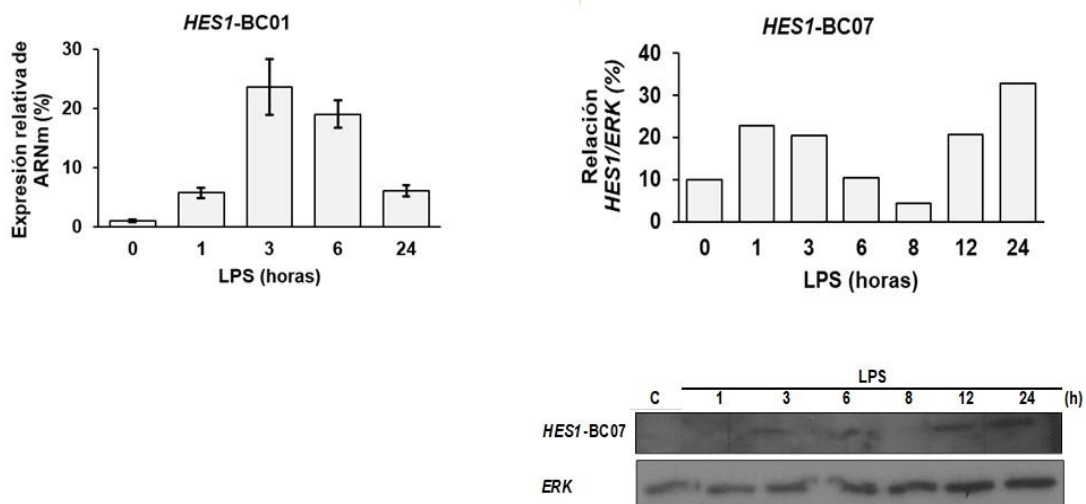


Figura 10.A. Análisis de la expresión relativa de ARNm y de proteína total de *HES1* (35kDa) de monocitos humanos activados con LPS (100 ng/ml). Se muestran dos experimentos representativos de los Buffy coat BC01 y BC07. Los datos de ARNm se normalizaron con el gen *GAPDH* y para proteína se empleó como control de carga a la proteína *ERK*.

El perfil de expresión a nivel de proteína coincidió con el de *NOTCH1* en la mayoría de los tiempos a excepción de las tres horas, con *NOTCH4* en los tiempos de cero y una hora, y todos los receptores coincidieron con la bajada de *HES1* a las seis horas. Un estudio y primer informe realizado en células epiteliales, que se cree que son las progenitoras de las células del sarcoma de *Kaposi*, señaló que la expresión de *HES1* estuvo modulada por la señalización JNK (proteína quinasa N-Terminal), es decir independiente de la vía *NOTCH*, ya que evidenció que la células analizadas a pesar de presentar bajos niveles de activación de *NOTCH*, expresaron niveles elevados de proteína *HES1* (58). Esto podría fundamentar por qué algunos tiempos de expresión no coinciden con los de *HES1* y receptores. Sin embargo, no se pudo negar que *NOTCH/RBP-Jk* afecta la localización nuclear de NF- κ B p50 de una manera canónica dependiente de *NOTCH*, posiblemente a través de *HES1* o asociación directa (59).

Una de las limitaciones que ha tenido el trabajo de investigación fue durante el procesamiento para obtener a los monocitos, que a pesar de tener una buena cantidad de células, éstas no se pegaban en la superficie, ya que las plaquetas les limitaban espacio. Referente a esto, una pesquisa señaló que los monocitos adherentes presentaban mayor cantidad de marcadores receptor de manosa (MR) y CD40, que los monocitos flotantes, por tanto estas diferencias de expresión de los marcadores podrían ser una indicación de un estado de activación moderadamente diferente en los monocitos (11). Asimismo, al contar con una gran cantidad de células adherentes, se obtuvo escasa muestra de ARNm y proteína total para el análisis de los respectivos

genes y proteínas involucradas en la vía de señalización *NOTCH*, al contrario que en línea murinas, razón por la que se mostraron datos de experimentos representativos.

Por otro lado, esta limitación también repercutió en la extrapolación de los resultados, ya que se han obtenido en algunos *Buffy coats* desviaciones considerables (datos no mostrados), por lo que sería necesario utilizar una mayor cantidad de muestras para tener un perfil fijo de la expresión de los receptores. Además, es importante mencionar que se detectaron variaciones interindividuales en los distintos elementos de la vía *NOTCH* analizados en cada paciente, así como en la expresión de $TFN\alpha$ y la activación de la vía *NOTCH*. Asimismo, en el futuro sería muy interesante analizar la expresión de las citocinas proinflamatorias con IL6, IL10 y IL12, ya que están relacionadas con estos receptores.

A pesar de lo mencionado, la investigación aporta un avance de la expresión de los receptores *NOTCH* en monocitos humanos en el proceso proinflamatorio activado vía TLR4 por LPS. Por lo que, los receptores estarían considerados como una diana terapéutica frente a enfermedades de tipo inflamatorias, en el que se destaca *NOTCH3*.

7. Conclusiones

Se detectó la expresión de todos los receptores *NOTCH* en monocitos humanos en respuesta a la activación de la señalización TLR4, aunque con perfiles distintos.

El receptor *NOTCH1* es el receptor con mayor nivel de inducción, mientras que *NOTCH3* es el principal receptor temprano, que estaría relacionado con la expresión de genes proinflamatorios tempranos como TNF α . *NOTCH4* parece desempeñar un papel menor en la vía, debido a su inducción tardía a nivel traduccional.

La expresión de los ligandos canónicos *DELTA1* y *DELTA4* tras la activación de los monocitos humanos por estimulación proinflamatoria con LPS reveló perfiles similares, aunque *DELTA4* podría ser el ligando con mayor implicación en la interacción ligando-receptor.

La expresión del gen diana *HES1* durante la activación de los monocitos humanos en respuesta al estímulo proinflamatorio anteriormente mencionado demostró un perfil con fluctuaciones.

8. Bibliografía

1. Zhang L, Wang C-C. Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* [Internet]. 15 de abril de 2014 [citado 28 de enero de 2020];13(2):138-52. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1499387214600242>
2. Schultze JL, Freeman T, Hume DA, Latz E. A transcriptional perspective on human macrophage biology. *Semin Immunol* [Internet]. 1 de febrero de 2015 [citado 23 de enero de 2020];27(1):44-50. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532315000020>
3. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2015 [citado 23 de enero de 2020];33(1):643-75. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
4. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 19 de junio de 2018 [citado 24 de enero de 2020];19(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032107/>
5. Schumann J. It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 15 de agosto de 2016 [citado 22 de enero de 2020];785:18-23. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299915004537>
6. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* [Internet]. 27 de mayo de 2011 [citado 23 de mayo de 2020];34(5):637-50. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761311001907>
7. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* [Internet]. 2018 [citado 23 de mayo de 2020];233(9):6425-40. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.26429>
8. Schmieder A, Michel J, Schönhaar K, Goerdt S, Schledzewski K. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 1 de agosto de 2012 [citado 23 de mayo de 2020];22(4):289-97. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X12000259>
9. Yuan H, Du S, Deng Y, Xu X, Zhang Q, Wang M, et al. Effects of microRNA-208a on inflammation and oxidative stress in ketamine-induced cardiotoxicity through Notch/NF- κ B signal pathways by CHD9. *Biosci Rep* [Internet]. 31 de 2019;39(5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6522736/>
10. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2009;27:451-83. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>
11. Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared.

- Immunobiology [Internet]. 1 de septiembre de 2014 [citado 24 de enero de 2020];219(9):695-703. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298514000862>
12. Ogando J, Toribio ML, Mañes S. Notch-regulated miR-223 targets the aryl hydrocarbon receptor pathway and increases cytokine production in macrophages from rheumatoid arthritis patients. 3 de febrero de 2016 [citado 2 de diciembre de 2019]; Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/151887>
 13. Nakano Toshiaki, Fukuda Daiju, Koga Jun-ichiro, Aikawa Masanori. Delta-Like Ligand 4-Notch Signaling in Macrophage Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1 de octubre de 2016 [citado 1 de diciembre de 2019];36(10):2038-47. Disponible en: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/ATVBAHA.116.306926>
 14. Malyshev I, Malyshev Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype [Internet]. *BioMed Research International*. 2015 [citado 1 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/341308/abs/>
 15. Chistiakov DA, Myasoedova VA, Revin VV, Orekhov AN, Bobryshev YV. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2. *Immunobiology* [Internet]. 1 de enero de 2018 [citado 25 de mayo de 2020];223(1):101-11. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298517301407>
 16. Osorio F, Reis e Sousa C. Myeloid C-type Lectin Receptors in Pathogen Recognition and Host Defense. *Immunity* [Internet]. 27 de mayo de 2011 [citado 23 de mayo de 2020];34(5):651-64. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761311001841>
 17. Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, Fauq AH, Golde TE, Kaufmann SHE, et al. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur J Immunol* [Internet]. enero de 2008;38(1):174-83. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.200636999>
 18. Hu X, Chung AY, Wu I, Foldi J, Chen J, Ji JD, et al. Integrated Regulation of Toll-like Receptor Responses by Notch and Interferon- γ Pathways. *Immunity* [Internet]. noviembre de 2008 [citado 2 de febrero de 2020];29(5):691-703. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2585039/>
 19. Ernst O, Vayttaden SJ, Fraser IDC. Measurement of NF- κ B activation in TLR-activated macrophages. *Methods Mol Biol Clifton NJ* [Internet]. 2018 [citado 22 de enero de 2020];1714:67-78. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6338324/>
 20. Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* [Internet]. mayo de 2018 [citado 6 de diciembre de 2019];18(5):309-24. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nri.2017.142>
 21. Dexter JS. The Analysis of a Case of Continuous Variation in *Drosophila* by a Study of Its Linkage Relations. *Am Nat* [Internet]. 1 de diciembre de 1914 [citado 15 de mayo de 2020];48(576):712-58. Disponible en: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/279446>

22. Larsson C, Lardelli M, White I, Lendahl U. The Human NOTCH1, 2, and 3 Genes Are Located at Chromosome Positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in Regions of Neoplasia-Associated Translocation. *Genomics* [Internet]. 15 de noviembre de 1994 [citado 15 de mayo de 2020];24(2):253-8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754384716132>
23. Bray SJ. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. noviembre de 2016 [citado 24 de abril de 2020];17(11):722-35. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrm.2016.94>
24. Borggreffe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: Transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 1 de mayo de 2009 [citado 23 de mayo de 2020];66(10):1631-46. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-009-8668-7>
25. Galvan L, Fabiola M. Perfil de expresión a nivel transcripcional en cáncer cervicouterino y su relación con la vía de señalización Notch. marzo de 2008 [citado 15 de mayo de 2020]; Disponible en: <https://repositorio.ipicyt.edu.mx//handle/11627/3085>
26. Siebel C, Lendahl U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev* [Internet]. 9 de agosto de 2017 [citado 15 de mayo de 2020];97(4):1235-94. Disponible en: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00005.2017>
27. Arruga F, Vaisitti T, Deaglio S. The NOTCH Pathway and Its Mutations in Mature B Cell Malignancies. *Front Oncol* [Internet]. 2018 [citado 26 de mayo de 2020];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00550/full>
28. Shimizu K, Chiba S, Kumano K, Hosoya N, Takahashi T, Kanda Y, et al. Mouse Jagged1 Physically Interacts with Notch2 and Other Notch Receptors ASSESSMENT BY QUANTITATIVE METHODS. *J Biol Chem* [Internet]. 11 de diciembre de 1999 [citado 16 de mayo de 2020];274(46):32961-9. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/274/46/32961>
29. Pintar A, De Biasio A, Popovic M, Ivanova N. The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference? *Biol Direct* [Internet]. 10 de julio de 2007 [citado 16 de mayo de 2020];2(1):19. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1745-6150-2-19>
30. D'Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G. Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol* [Internet]. 2010;92:73-129. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286395/>
31. Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, Xu B, Qiu Y, Yoon T, et al. Exosome Transfer from Stromal to Breast Cancer Cells Regulates Therapy Resistance Pathways. *Cell* [Internet]. 23 de octubre de 2014 [citado 15 de mayo de 2020];159(3):499-513. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867414012392>
32. Andersson ER, Lendahl U. Therapeutic modulation of Notch signalling — are we there yet? *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. mayo de 2014 [citado 24 de abril de 2020];13(5):357-78. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrd4252>

33. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* [Internet]. 8 de abril de 1999;398(6727):518-22. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10206645/>
34. Henrique D, Schweisguth F. Mechanisms of Notch signaling: a simple logic deployed in time and space. *Development* [Internet]. 1 de febrero de 2019 [citado 19 de enero de 2020];146(3). Disponible en: <https://dev.biologists.org/content/146/3/dev172148>
35. Kopan R, Ilagan MaXG. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* [Internet]. abril de 2009 [citado 16 de mayo de 2020];137(2):216-33. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409003821>
36. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol* [Internet]. junio de 2013 [citado 24 de abril de 2020];13(6):427-37. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nri3445>
37. Wendorff AA, Koch U, Wunderlich FT, Wirth S, Dubey C, Brüning JC, et al. Hes1 is a critical but context-dependent mediator of canonical Notch signaling in lymphocyte development and transformation. *Immunity* [Internet]. 24 de noviembre de 2010;33(5):671-84. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21093323/>
38. Auderset F, Schuster S, Coutaz M, Koch U, Desgranges F, Merck E, et al. Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFN γ secretion by T helper 1 cells during infection with *Leishmania major*. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012;8(3):e1002560. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002560>
39. Gu Y, Masiero M, Banham AH. Notch signaling: its roles and therapeutic potential in hematological malignancies. *Oncotarget* [Internet]. 26 de febrero de 2016 [citado 22 de mayo de 2020];7(20):29804-23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5045435/>
40. Fernández M, Monsalve EM, López-López S, Ruiz-García A, Mellado S, Caminos E, et al. Absence of Notch1 in murine myeloid cells attenuates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by affecting Th1 and Th17 priming. *Eur J Immunol* [Internet]. 2017 [citado 22 de mayo de 2020];47(12):2090-100. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eji.201646901>
41. Muiño E, Gallego-Fabrega C, Cullell N, Carrera C, Torres N, Krupinski J, et al. Systematic Review of Cysteine-Sparing NOTCH3 Missense Mutations in Patients with Clinical Suspicion of CADASIL. *Int J Mol Sci* [Internet]. 13 de septiembre de 2017;18(9). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28902129/>
42. Dziewulska D, Lewandowska E. Pericytes as a new target for pathological processes in CADASIL. *Neuropathology* [Internet]. 2012 [citado 23 de mayo de 2020];32(5):515-21. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1440-1789.2011.01290.x>
43. Meng H, Zhang X, Yu G, Lee SJ, Chen YE, Prudovsky I, et al. Biochemical characterization and cellular effects of CADASIL mutants of NOTCH3. *PloS One*

- [Internet]. 2012;7(9):e44964. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23028706/>
44. Zheng R, Liu H, Zhou Y, Yan D, Chen J, Ma D, et al. Notch4 Negatively Regulates the Inflammatory Response to Mycobacterium tuberculosis Infection by Inhibiting TAK1 Activation. *J Infect Dis* [Internet]. 20 de 2018;218(2):312-23. Disponible en: <https://academic.oup.com/jid/article/218/2/312/4712145>
 45. Pabois A, Pagie S, Gérard N, Laboisse C, Pattier S, Hulin P, et al. Notch signaling mediates crosstalk between endothelial cells and macrophages via Dll4 and IL6 in cardiac microvascular inflammation. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 15 de marzo de 2016;104:95-107. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26826491/>
 46. Argandoña M, María E. Estudio de la función del receptor NOTCH-1 en la activación del macrófago. [Internet] [Tesis Doctoral]. [España]: Universidad Castilla-La Mancha; 2009 [citado 5 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://ruidera.uclm.es/xmlui/handle/10578/2723>
 47. López-López S. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES NOTCH EN LA ACTIVACIÓN PROINFLAMATORIA DEL MACRÓFAGO [Tesis Doctoral]. [España]: Universidad Castilla - La Mancha; 2019.
 48. Romero de Avila Garcia Maria Jose. “Estudio de la función de receptor NOTCH3 en la activación del macrófago por agonistas del receptor TOLL4” [Tesis de fin de master]. [España]: Universidad Castilla -La Mancha;
 49. Shang Y, Smith S, Hu X. Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease. *Protein Cell* [Internet]. marzo de 2016 [citado 1 de diciembre de 2019];7(3):159-74. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s13238-016-0250-0>
 50. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Investig Suppl* [Internet]. 1968;97:77-89. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179068/>
 51. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, et al. LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2011 [citado 25 de junio de 2020];31(5). Disponible en: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,47d4cd1f0e2c889b,5453e7eb10564e78.html>
 52. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Investig Suppl* [Internet]. 1968;97:77-89. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179068/>
 53. Monsalve E, Pérez MA, Rubio A, Ruiz-Hidalgo MJ, Baladrón V, García-Ramírez JJ, et al. Notch-1 Up-Regulation and Signaling following Macrophage Activation Modulates Gene Expression Patterns Known to Affect Antigen-Presenting Capacity and Cytotoxic Activity. *J Immunol* [Internet]. 1 de mayo de 2006 [citado 27 de junio de 2020];176(9):5362-73. Disponible en: <https://www.jimmunol.org/content/176/9/5362>

54. Xu J, Chi F, Tsukamoto H. Notch, metabolism and macrophages. *Oncotarget* [Internet]. 25 de junio de 2015 [citado 27 de junio de 2020];6(24):19942-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4652967/>
55. Xu X, Choi SH, Hu T, Tiyanont K, Habets R, Groot AJ, et al. Insights into Autoregulation of Notch3 from Structural and Functional Studies of Its Negative Regulatory Region. *Struct Lond Engl* 1993 [Internet]. 7 de julio de 2015 [citado 26 de junio de 2020];23(7):1227-35. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4497832/>
56. Nandagopal N, Santat LA, LeBon L, Sprinzak D, Bronner ME, Elowitz MB. Dynamic Ligand Discrimination in the Notch Signaling Pathway. *Cell* [Internet]. 8 de febrero de 2018 [citado 27 de junio de 2020];172(4):869-880.e19. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867418300023>
57. Monsalve E, Ruiz-García A, Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Sánchez-Solana B, Rivero S, et al. Notch1 upregulates LPS-induced macrophage activation by increasing NF- κ B activity. *Eur J Immunol* [Internet]. 2009 [citado 27 de junio de 2020];39(9):2556-70. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eji.200838722>
58. Curry CL, Reed LL, Nickoloff BJ, Miele L, Foreman KE. Notch-independent regulation of Hes-1 expression by c-Jun N-terminal kinase signaling in human endothelial cells. *Lab Invest* [Internet]. agosto de 2006 [citado 24 de abril de 2020];86(8):842-52. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/3700442>
59. Wongchana W, Kongkavitoon P, Tangtanatakul P, Sittplangkoon C, Butta P, Chawalitpong S, et al. Notch signaling regulates the responses of lipopolysaccharide-stimulated macrophages in the presence of immune complexes. *PLOS ONE* [Internet]. 11 de junio de 2018 [citado 1 de diciembre de 2019];13(6):e0198609. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0198609>