



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
LABORATORIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN
SOBRE EL GENOMA HUMANO**

**DESCIFRANDO LA RED DE REGULACIÓN
GENÉTICA QUE DIRIGE LA DIFERENCIACIÓN DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS EN HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

KAREN JULIA NUÑEZ REZA

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ALEJANDRA E. MEDINA RIVERA
LABORATORIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN
SOBRE EL GENOMA HUMANO**

**COMITÉ TUTOR
DRA. CLAUDINE IRLES MACHUCA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
DR. CEI ABREU-GOODGER
LANGEBIO-CINVESTAV**

QUERÉTARO. MAYO DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A la memoria de mi padre, pues sus enseñanzas viven en mí.

A mi mamá y mi hermana por ser mi fuerza e inspiración.

A Ernesto por su apoyo y motivación incondicional.

Agradecimientos

Al posgrado de Ciencias Biomédicas de la UNAM por el espacio para desarrollarme como investigadora.

Toda mi gratitud para mi tutora la Dra. Alejandra Medina Rivera por sus invaluable enseñanzas dentro y fuera del ámbito académico, por la confianza y por impulsarme para el desarrollo de mi doctorado.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Claudine Irles y al Dr. Cei Abreu-Goodger, por sus acertadas opiniones, sugerencias y apoyo incondicional a lo largo de este proceso.

Al Dr. Denis Thieffry por su guía en la construcción del modelo y recibirme de visita en su laboratorio. A Morgane Thomas-Cholier por sus enseñanzas, a Aurelian Naldi por su apoyo con el desarrollo del modelo y a todos los integrantes del laboratorio de Computational Systems Biology, en especial a Samuel Collombet, Zwann Floc'hlay, Celine Hernandez y Nathalie Lehmann.

A la Dra. Angélica Santana por siempre recibirme de visita en su laboratorio y por dar el punto de vista biológico en el proyecto. A todo su laboratorio por siempre recibirme con los brazos abiertos, en especial a Darely Gutiérrez.

Al Dr. Rafael Palacios por permitirme desarrollar mi proyecto de doctorado en el LIIGH. A la Dra. Daniela Robles, a la Dra. María Ávila, a la Dra. Lucia Morales y al Dr. Diego Ortega por contribuir en formación académica.

A Jair Sotelo, Luis Alberto Aguilar, Carina Uribe Díaz, Alejandra Carvajal y Alejandro de León por su asistencia técnica para el desarrollo de este proyecto.

A mis colegas Ana Beatriz Villaseñor, Miriam Bravo, Isaac García, Walter Santana, Laura Arenas, Raúl Ossio, Mónica Padilla, por su invaluable amistad y por todos los momentos maravillosos que pasamos juntos en esta etapa.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio Regulatory Genomics and Bioinformatics del LIIGH-UNAM, Ambey Shree, Ana Laura Hernández, Óscar Aldana, Ana Victoria León, Lucia Ramírez y a todos mis compañeros del LIIGH.

A mi mamá Lourdes Reza por siempre guiarme, sin evitar que siga mi propio camino. A mi hermana Diana Nuñez por hacerme reír siempre y por ser mi cómplice, eres la alegría de mi vida. A Ernesto Mascot por apoyarme siempre y acompañarme en esta aventura. Al resto de mi familia y amigos por su amor y apoyo en cada etapa de mi vida.

A Carmelita y la Mtra Leonor por su invaluable ayuda en la parte administrativa del posgrado.

Al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, a la Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz y a la Lic. Soledad Medina Malagón del Comité de la Biblioteca del Campus, quienes ayudan con el constante mantenimiento del acervo bibliográfico.

Al CONACYT por la beca (CVU/Becario: 634764/331823) recibida para realizar mi doctorado y por el financiamiento para el desarrollo del proyecto con los donativos 269449 y 1690; así como por el donativo FORDECYT-PRONACES número 11311. Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM) donativos: IA206517, IA201119 y IA203021. Al programa SEP-CONACYT-ECOS-ANUIES por el donativo 291235. A la UNAM en general por el espacio y la accesibilidad a todos los invaluable recursos de los que gocé.

DESCIFRANDO LA RED DE REGULACIÓN GENÉTICA QUE DIRIGE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN HUMANO

AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIACIONES.....	8
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN	11
CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	11
DIFERENCIACIÓN A MODC <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	12
REGULACIÓN GENÉTICA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN A MODC.....	16
MODELOS COMPUTACIONALES DE SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	18
MODELOS LÓGICOS.....	19
MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
RELEVANCIA.....	21
CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO BASADO EN LITERATURA	23
CONTEXTO	23
MÉTODOS	24
RESULTADOS.....	29
CONCLUSIÓN.....	32
BÚSQUEDA DE SITIOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL	33
CONTEXTO	34
MÉTODOS	36
RESULTADOS.....	37
GENES EN MONOCITOS Y MACRÓFAGOS	40
CONCLUSIÓN.....	41
EXPRESIÓN GÉNICA COMO PUNTO DE PARTIDA PARA INICIAR UN MODELO LÓGICO	43

CONTEXTO	43
MÉTODOS	43
RESULTADOS.....	44
CONCLUSIÓN.....	48

INTEGRACIÓN DE ELEMENTOS DE REGULACIÓN NUEVOS Y DE EXPRESIÓN PARA COMPLETAR UN MODELO LÓGICO 49

PUBLICACIÓN: *LOGICAL MODELING OF IN VITRO DIFFERENTIATION OF HUMAN MONOCYTES INTO DENDRITIC CELLS UNRAVELS NOVEL TRANSCRIPTIONAL REGULATORY INTERACTIONS* 49

CONTEXTO	49
CONTRIBUCIÓN	49
CONTEXTO	62
MÉTODOS	62
RESULTADOS.....	63
CONCLUSIONES.....	68

DISCUSIÓN GLOBAL..... 70

CONCLUSIÓN GLOBAL 73

BIBLIOGRAFÍA..... 74

ANEXO 1. REFERENCIAS USADAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL MODELO.	80
ANEXO 2. REGLAS LÓGICAS DEL MODELO DE LA DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS A MODC.....	86
ANEXO 3. IDENTIFICADORES DE LOS TF EN LA BASE DE DATOS JASPAR 2018 (KHAN ET AL. 2018)	88
ANEXO 4. PURIFICACIÓN DE CBMC, CD34+, PBMC Y MONOCITOS.....	89
CONTEXTO	89
MÉTODOS.....	90
RESULTADOS	92
CONCLUSIONES.....	93
ANEXO 5. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE SONICACIÓN EN EL LABORATORIO DE GENÓMICA REGULATORIA Y BIOINFORMÁTICA DENTRO DEL LIIGH-UNAM	94
CONTEXTO	94
MÉTODOS.....	94
RESULTADOS	95
CONCLUSIÓN	96
ANEXO 6. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.	97
ANEXO 7. APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA PARA LA RECOLECCIÓN DE BUFFYCOAT EN EL BANCO DE SANGRE.	98

Abreviaciones

DNA	Ácido desoxirribonucleico, (Deoxyribonucleic Acid)
RNA	Ácido ribonucleico, (Ribonucleic acid)
ChIP-seq	Inmuno precipitación de la cromatina seguido de secuenciación masiva
RNA-seq	Secuenciación masiva de RNA
TSS	Sitio de inicio de la transcripción, (Transcription Start Site)
TF	Factor de transcripción, (Transcription factor)
TFBS	Sitio de unión de un factor transcripcional (Transcription Factor Binding Site)
PSSM	Matriz de posición de peso (Position Specific Scoring Matrix)
cDC	Células dendríticas comunes
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
CSF2	Factor estimulante de colonias tipo 2 (Colony stimulating factor type 2)
IL4	Interleucina 4, (Interleukine 4)
moDC	Células dendríticas derivadas de monocitos
pb	Pares de bases
CDP	Progenitor de dendríticas común
CMP	Progenitor mieloide común
HSC	Células madre hematopoyéticas
NCOR2	Receptor de correpresión nuclear
PBMC	Células polimorfo nucleares de sangre periférica
CBMC	Células polimorfo nucleares de sangre de cordón umbilical
TLR	Toll like receptor
FDA	Administración de comida y medicamento de Estados Unidos
infDC	Células dendríticas inflamatorias
MHCI	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I
MO	Monocitos
DC	Células dendríticas

Resumen

Las células dendríticas juegan un papel importante en los procesos de inmunidad innata y adaptativa al presentar antígenos a los linfocitos T vírgenes y de esta forma desencadenar la respuesta inmune adaptativa. Es sabido que la obtención de células dendríticas es a partir de dos progenitores, el progenitor hematopoyético y desde monocitos. En condiciones de inflamación los monocitos se diferencian a células dendríticas a partir de los monocitos residentes de tejido.

Las células dendríticas diferenciadas *in vivo* guardan mucha similitud con las obtenidas *in vitro* de acuerdo con patrones de expresión génica, pero no se ha comprendido en su totalidad a todos los elementos participantes del proceso de diferenciación. Por lo tanto, en este proyecto nos planteamos el objetivo de construir un modelo lógico de la diferenciación *in vitro* de monocitos a células dendríticas que nos permitiera determinar los elementos clave (puntos de decisión) en el proceso. Para cumplir el objetivo construimos un primer modelo basado en la literatura, el cual analizamos y realizamos conclusiones preliminares. Después integramos al modelo datos de regulación génica obtenidos del análisis de datos de marcas de histonas de inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación (ChIP-seq) que nos permitieran definir los estados de la cromatina en ambos tipos celulares.

Una vez que añadimos estos nuevos datos de regulación pudimos completar el modelo, el cual fue probado cuando realizamos mutaciones *in silico* en donde corroboramos la importancia de varios TF como IRF4, AHR, PRDM1, STAT6, y PU.1. También identificamos nuevas interacciones de regulación de estos TF con genes específicos de células dendríticas entre ellos CD1A, CD1B, CD1C, DCIR, CD206.

Paralelamente estandarizamos las condiciones de purificación y cultivo de células PBMC, CBMC, CD34+ y monocitos, en nuestro laboratorio de reciente creación. De la misma manera estandarizamos la obtención de cromatina fragmentada de alrededor de 200pb de células PBMC.

Con la construcción del modelo lógico de la diferenciación de monocitos a células dendríticas logramos integrar la información conocida, así como nuevas interacciones de regulación y a la par pudimos estandarizar los métodos en el laboratorio para probar nuestro modelo o generar nuevos de datos para informar futuros experimentos de secuenciación masiva.

Abstract

Dendritic cells play an important role in the processes of innate and adaptive immunity by presenting antigens to naive T lymphocytes to trigger the adaptive immune response. It is known that dendritic cells can be obtained from two progenitors, the hematopoietic progenitor and monocytes. Under inflammatory conditions monocytes differentiate into dendritic cells from tissue resident monocytes.

Dendritic cells differentiated *in vivo* are very similar to those obtained *in vitro* according to gene expression patterns, but not all participants in the differentiation process have been fully understood. Therefore, in this project we set the objective of building a logical model of the *in vitro* differentiation of monocytes to dendritic cells. To reach our objective, we built a first model based on the literature, we analyzed and made preliminary conclusions with it. Then, we integrated the gene regulation data obtained from the analysis of histone marks data from ChIP-seq into the model, which allowed us to define the chromatin states in both cell types.

Once we added these new regulatory data, we were able to complete. Completeness was tested by *in silico* mutations, where we corroborated the relevance of transcription factors such as IRF4, AHR, PRDM1, STAT6, and PU.1. We also identify new regulatory interactions between these TFs and dendritic cell specific genes including CD1A, CD1B, CD1C, DCIR, CD206.

At the same time, we standardized the purification and culture conditions of PBMC, CBMC, CD34+ and monocytes, in our recently created laboratory. In the same way, we standardized the chromatin fragmentation of around 200 bp from PBMC cells.

The construction of the logical model of the differentiation of monocytes to dendritic cells, allowed us to integrate the known information, as well as the new regulatory interactions, and at the same time we were able to standardize the methodology in the laboratory to test our model or generate new data for high-throughput sequencing experiments.

Introducción

Células dendríticas

Las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) son las células presentadoras de antígenos, las que inician la reacción inmune adaptativa al activar a los linfocitos T (Radford, Tullett, and Lahoud 2014). Fueron descritas por primera vez en 1973 por Steinman y Cohn y recibieron su nombre por la forma característica de dendritas que presentaban (Steinman and Cohn 1973).

A partir del descubrimiento de las DC se describió su gran capacidad para la presentación de antígenos a través de receptores de reconocimiento, como los TLR (Toll like receptors), así como su habilidad para migrar a los tejidos linfáticos secundarios y activar a los linfocitos T vírgenes (Schraml and Reis 2015). Recientemente son estudiadas por su uso en inmunoterapias para diferentes enfermedades desde la primera vacuna aprobada por la FDA en 2010 para el cáncer de próstata resistente a castración (Kantoff et al. 2010).

Las células dendríticas de humano derivadas del progenitor mieloide se clasifican en dos grandes grupos células dendríticas comunes tipo 1 y 2 (cDC) y células dendríticas plasmocitoides (pDC); existe un tercer grupo de células dendríticas derivadas de monocitos, a su vez los macrófagos también pueden diferenciarse a partir de los monocitos (Figura 1).

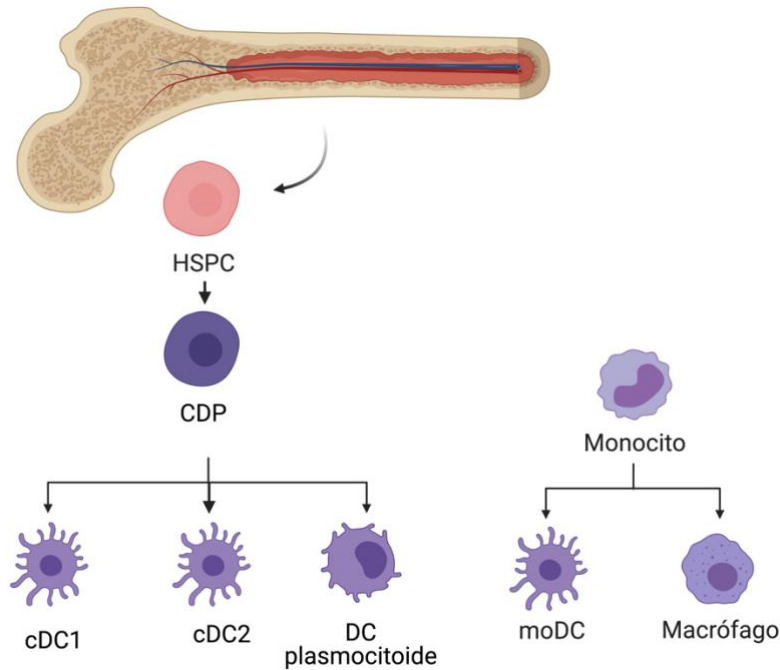


Figura 1. Clasificación de células dendríticas. Basada en (Tang-Huau and Segura 2018), creada en BioRender.com.

En estudios realizados por Segura y Amigorena (Segura and Amigorena 2013) se identificó que las DC derivadas de monocitos (moDC, por sus siglas en inglés) pueden diferenciarse *in vivo* y a estas células las llamaron células dendríticas inflamatorias (infDC, por sus siglas en inglés).

Diferenciación a moDC *in vivo* e *in vitro*

Los monocitos (MO) son células mononucleadas en circulación en el torrente sanguíneo con la capacidad de diferenciarse a macrófagos, una vez que los monocitos pasan a los tejidos inicia la diferenciación a macrófagos o a las DC (Randolph, Jakubzick, and Qu 2009). En 1994 Sallusto y Lanzavecchia establecieron el protocolo para la diferenciación *in vitro* de monocitos a moDC con el uso de la interleucina-4 (IL-4) y del factor estimulante de colonias de granulocítica/macrófagos (CSF2 o GM-CSF, por sus siglas en inglés) (Sallusto and Lanzavecchia 1994).

El descubrimiento de que los MO son precursores de las DC significa un gran avance para el área de la inmunología. Alteraciones en la diferenciación de MO a las DC se relaciona con diversas condiciones clínicas (Lapko et al. 2017).

Las infDC que se obtienen *in vivo* a partir de piel en humano y en ratón, se comparan con las moDC que se obtienen *in vitro* (en el laboratorio) y se observa que presentan prácticamente el mismo patrón de expresión génica (Segura et al. 2013; Goudot et al. 2017), por lo tanto es posible comparar directamente las DC diferenciadas en el tejido, con las que se obtienen en el laboratorio, esta observación sustenta la importancia de nuestro estudio, ya que nos centramos en el estudio de las moDC diferenciadas *in vitro* y son un reflejo de las moDC diferenciadas *in vivo*.

En diversos procesos inflamatorios los monocitos son el principal origen de las DC, por ejemplo, en infecciones por virus, los antígenos virales son reconocidos por “presentación-cruzada”, en donde principalmente las DC reconocen antígenos exógenos para su presentación a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I, por sus siglas en inglés) a las células T CD8+ (Heath and Carbone 2001).

La diferenciación de los monocitos a células dendríticas ocurre en tejidos periféricos al reconocer factores en el microambiente por inflamación o cambios metabólicos, algunos de los factores que se conocen es la IL-4 y el CSF2 en ensayos *in vivo* (Lapko et al. 2017). A pesar de estos conocimientos aún es necesario identificar que otros factores se encuentran involucrados en este proceso, así como la regulación de la expresión de los factores involucrados en el proceso. Se conoce la estabilidad del proceso de MO a DC a través del tiempo, y esta depende de la proteína PU.1 (Lapko et al. 2017).

El papel de la IL-4 en la diferenciación celular de MO a DC aún no se termina de elucidar. La señalización por esta interleucina en estudios *in vitro* induce la polarización de macrófagos M2 por la activación de STAT6 que a su vez induce la expresión del gen *Jmjd3* (Jumonji-dominant-containing-3). La proteína JMJD3 desmetila la histona 3 en la Lys 27 y regula la expresión de la proteína IRF4, la activación de IRF4 es un requerimiento específico para la diferenciación de monocitos a células dendríticas (Vento-tormo et al. 2016). Se conoce que la IL-4 aumenta la transcripción del gen *Batf3* durante la diferenciación de MO en DC, BATF3 se requiere para el desarrollo de DC que son capaces de realizar “presentación-cruzada” de antígeno (Briseño et al. 2016). Se encuentran ciertos marcadores en los monocitos que inhiben su potencial para

diferenciarse en DC, tales como NUR77 y/o TREML4, esto lo hacen por la represión de IRF4 (Briseño et al. 2016).

Señalización por IL-4

La IL-4 se descubrió en 1980, principalmente es producida por los basófilos, mastocitos, eosinófilos, así como los linfocitos Th2. Comparte receptor, homología de secuencia y señalización intracelular con la IL-13. La IL-4 participa en la proliferación celular, expresión de genes y previene la apoptosis en varios tipos celulares como linfocitos, macrófagos, células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales. Existen dos tipos principales de receptor para la IL-4, el tipo I se encuentra principalmente en células hematopoyéticas, mientras que el tipo II generalmente se encuentra en células no-hematopoyéticas, pero ambos tipos de receptores son expresados en células mieloides y en linfocitos B (Figura 2) (Ul-haq, Naz, and Mesaik 2016; Ranasinghe et al. 2014).

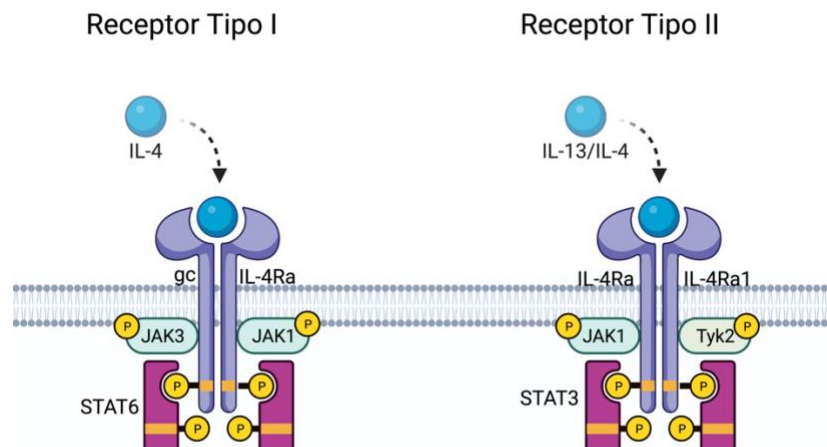


Figura 2. Tipos de receptor de la interleucina-4. Basada en (Ul-haq, Naz, and Mesaik 2016) realizada en BioRender.com.

La cascada de señalización de IL-4 se propaga a través de cinasas asociadas al receptor, por ejemplo, JAK-1, JAK-2, JAK-3 y TyK-2 que son fosforiladas y sirven de anclaje a las moléculas de señalización subsecuentes dentro del citoplasma. IL4 no activa la cascada de Ras/MAPK, principalmente inicia la fosforilación de tirosina de STAT6 que puede estimular a otras

subunidades de STAT. STAT6 forma un homodímero que es translocado al núcleo para regular la activación de genes.

La activación de la vía de señalización por JAK3-STAT6 en la diferenciación de las DC permite la transcripción de genes que son específicos de las moDC y se bloquea la expresión de genes de macrófagos. Cuando esta vía es inhibida, la expresión cambia a los genes específicos de macrófagos, pues se apaga la activación de los genes específicos para las DC (Vento-tormo et al. 2016). La cascada de señalización de STAT6 se suprime por al menos dos proteínas conocidas SHP-1 y SOCS-1 (Ul-haq, Naz, and Mesaik 2016).

Señalización por CSF2

La citosina CSF2 circula en condiciones normales en bajas concentraciones, pero aumenta cuando ocurre infección o inflamación y permite la diferenciación de las DC, como se replica *in vitro*. El receptor de CSF2R tiene dos subunidades, la cadena- α y el receptor común- β , este receptor también reconoce a la interleucina-3 y 5. La cascada de señalización iniciada por CSF2 cuando se une a su receptor involucra la activación de las vías JAK/STAT, MAPK, PI3K y la vía canónica de NF- κ B (Figura 3) (van de Laar, Coffey, and Woltman 2012).

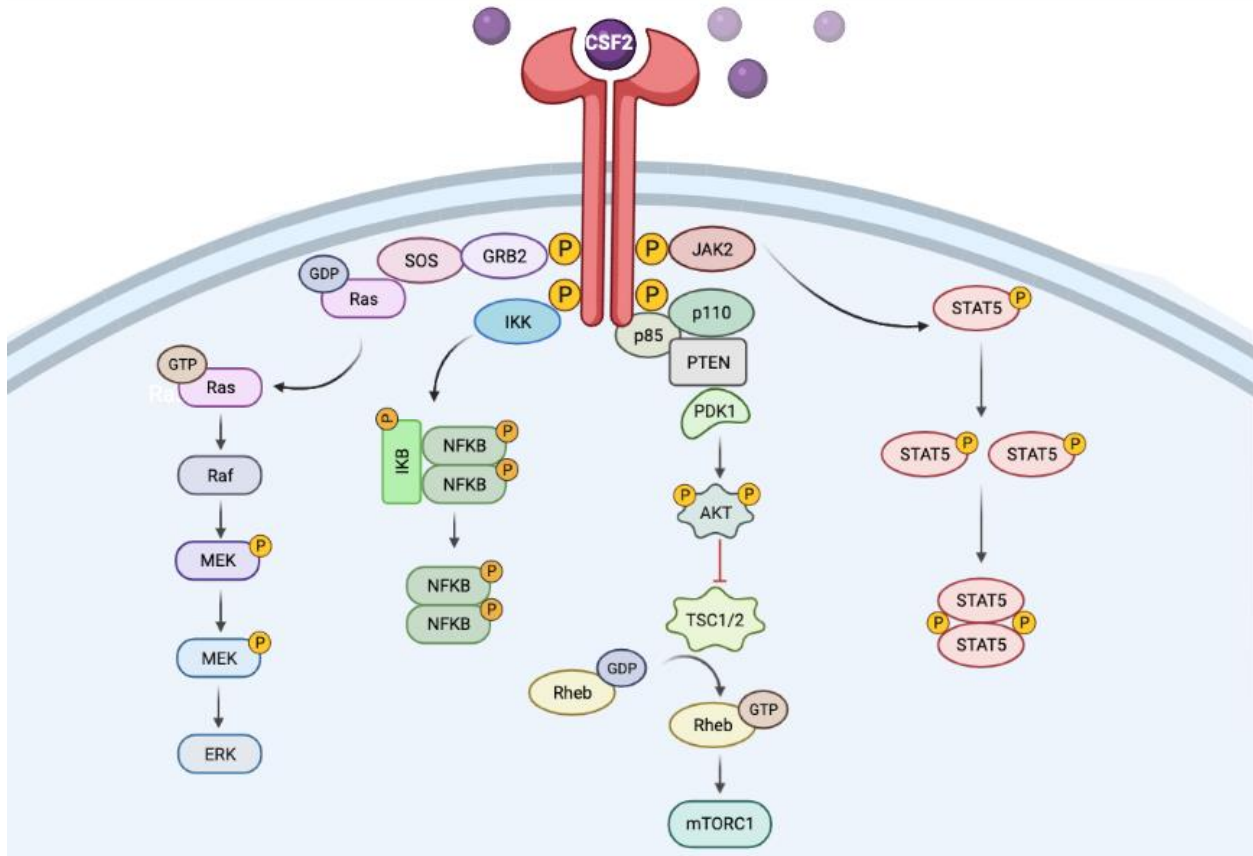


Figura 3. Vía de señalización de CSF2. Activación de cuatro vías MAPK, NFκB, PIK3 y JAK/STAT listadas de izquierda a derecha. Figura basada en (van de Laar, Coffey, and Woltman 2012) realizada en BioRender.com.

Una vez que ocurre la activación del receptor y la cascada de señalización es iniciada y da lugar a la activación de varios factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés), por ejemplo, NFκB activa la transcripción del TF C/EBPα e IRF4. STAT5 participa en la activación de la expresión de la proteína CIITA que es requerida para la transcripción del MHCII. La activación de STAT5 y NFκB se relaciona con un aumento en la inmunogenicidad de las DC (van de Laar, Coffey, and Woltman 2012).

Regulación genética durante la diferenciación a mDC

Las DC se diferencian a partir de un progenitor de dendríticas común (CDP, por sus siglas en inglés) que a su vez se diferencia del progenitor mieloide común (CMP, por sus siglas en inglés) que se deriva de células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) multipotentes. El

progenitor CMP controla diferenciación a las DC con la expresión del TF IRF8, si hay baja concentración de IRF8 el progenitor se deriva a monocitos. El precursor CDP deriva a las Pre-cDC que son los precursores directos de las DC y se encuentran en tejido linfoide, sangre, médula ósea, vaso y amígdalas; sin embargo, no se encuentran en piel. Se describen diversos TF que participan en la diferenciación *in vivo* de las DC a partir del progenitor CDP, NOTCH, BATF3, GATA2, e IRF8 (Villar and Segura 2020).

En la diferenciación de moDC se conoce que participan diferentes factores entre ellos TF, complejos remodeladores de la cromatina y mecanismos de metilación. Dentro de los TF que participan en la diferenciación de moDC se encuentra PU.1 que es necesario para el correcto desarrollo de las células mieloides y linfoides. En la diferenciación de monocitos a macrófagos la expresión de PU.1 es baja, cuando ocurre la diferenciación a las moDC los niveles de PU.1 aumentan, lo que sugiere una regulación por medio de los niveles de expresión de PU.1 (Bakri et al. 2005).

IRF4 es otro TF que participa en la diferenciación a las moDC se activa por NF κ B y STAT6 y a su vez activa la transcripción de genes específicos de las moDC como CCL17, ITGAX (Lehtonen et al. 2005; Hsu et al. 2018). Se observa que IRF4 está sobre expresado en las moDC, lo que soporta su importancia en la diferenciación de las moDC. El TF MAFB es sobre expresado en macrófagos en condiciones *in vivo* e *in vitro*. En mutaciones del gen IRF4 se observa que las moDC reducen drásticamente (Goudot et al. 2017).

AHR participa en la diferenciación de las moDC al activar al TF BLIMP-1 (PRDM1) en donde PRDM1 inhibe la expresión de genes específicos de macrófagos. Cuando AHR se silencia, la diferenciación de las moDC también se abole, mientras que la diferenciación a macrófagos aumenta, lo que apoya que PRDM1 reprime los genes específicos de macrófagos (Goudot et al. 2017).

PRDM1 activa al receptor de correpresión nuclear (NCOR2) quien a su vez regula la diferenciación de las moDC. De acuerdo con la literatura NCOR2 regula genes que pertenecen a la firma de la IL4, esto se observa cuando NCOR2 se silencia y los genes de IL4 se sub-expresan

con respecto al control positivo, lo cual soporta su rol en la diferenciación a las moDC (Sander et al. 2017).

STAT6 es otro de los TF que participa importantemente en la diferenciación a las moDC con la presencia de IL4 es activado y a su vez activa a IRF4 (Briseño et al. 2016). La vía de señalización IL4-JAK3-STAT6 propicia la demetilación de las regiones de los genes específicos de las moDC. Cuando STAT6 es silenciado la demetilación cambia a los genes específicos para macrófagos y los marcadores CD209 y CD83 específicos de las moDC disminuyen su expresión (Vento-tormo et al. 2016).

Modelos computacionales de sistemas biológicos

Los modelos computacionales integran y analizan procesos biológicos que suelen ser complejos, la construcción de un modelo permite tener una visión global para tener un entendimiento funcional con el cual se pueden realizar simulaciones para predecir el comportamiento del sistema y de esta forma proponer experimentos para su comprobación.

Existen dos grandes grupos de modelos, los cualitativos y los cuantitativos, dentro de los cualitativos encontramos a los modelos lógicos o booleanos. Dentro de los cuantitativos encontramos a los modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias, de ecuaciones diferenciales parciales y modelos estocásticos. Los modelos cuantitativos requieren de mediciones para poder generar el modelo y muchas veces en diversos procesos biológicos es difícil obtener tales mediciones (Karlach and Shamir 2008). En comparación, los modelos lógicos pueden integrar varios tipos de información, ya sean datos cuantitativos y cualitativos lo cual les confiere gran versatilidad. Los modelos lógicos, así como los cuantitativos, tienen una construcción rigurosa y pueden escalar de tamaño, es decir, podemos añadir componentes, también permite realizar perturbaciones/mutaciones *in silico* para predecir la respuesta celular, actualmente existen diversas herramientas que permiten obtener información muy interesante sobre el proceso biológico de interés (Abou-jaoudé et al. 2016).

Modelos lógicos

Los modelos lógicos son modelos dinámicos y relativamente simples, que permiten representar las relaciones de causa y efecto, y al mismo tiempo permiten realizar cómputo, es posible realizar escalamiento del tamaño del modelo (Terfve and Saez-Rodriguez 2012). En los modelos lógicos se hace uso de redes booleanas en donde existen dos estados ON/OFF (encendido/apagado), se componen de nodos (componentes) y arcos (interacciones), para poder construir una gráfica regulatoria con la que es posible realizar simulaciones del comportamiento de los nodos y sus interacciones entre ellos (Naldi, Hernandez, Abou-Jaoudé, et al. 2018).

Los nodos son los componentes que participan en el proceso biológico de interés y los arcos son las interacciones que tienen los nodos que explican lo que ocurre en la naturaleza. Los componentes en estados cero o uno, interactúan de acuerdo con las reglas lógicas o booleanas. La gráfica regulatoria es la representación global de la interacción de los nodos con la que podemos realizar análisis computacionales a diferentes niveles, desde ver todos los posibles resultados de la interacción de nodos, es decir el cómputo de estados estables, hasta realizar “mutaciones” *in silico* y probar el comportamiento del modelo, entre otros (Abou-jaoudé et al. 2016).

Los tipos de componentes/nodos se clasifican en tres, los inputs/entrada que son los que no están regulados por ningún otro nodo, los nodos internos y los nodos de salida, todos los nodos de cierta forma guardan relación en su regulación, ya sea de encendido o apagado (Schwab et al. 2020).

Para la construcción de un modelo lógico la integración de información puede ser de diversas fuentes como de bases de datos, provenientes de nuevos experimentos, de repositorios, de vías de señalización, de la literatura científica, etc., de esta forma se construye una idea global del proceso biológico en estudio (Trewavas 2006).

Existe un ciclo para la construcción de un modelo en donde iniciamos con una pregunta biológica, se desarrolla el primer modelo, se realizan simulaciones computacionales para verificar el comportamiento del modelo, se realizan predicciones que de ser posible pueden validarse experimentalmente y si es necesario se corrige el modelo y vuelve a iniciar el ciclo (Kitano 2002).

La construcción de un modelo no tiene fin, pero se realizan aproximaciones lo suficientemente buenas para comprender el proceso biológico de interés.

Motivación y objetivos de la tesis

Hipótesis

El modelo lógico de la diferenciación de monocitos a células dendríticas complementado con datos de transcriptómica y epigenómica permitirá identificar elementos (nodos) determinantes en la diferenciación de monocitos a células dendríticas.

Objetivo general

Estudiar y caracterizar los mecanismos regulatorios que controlan la diferenciación de células dendríticas e integrar esta información en un modelo dinámico que identifique los elementos (nodos), así como su interacción entre los mismos que permiten la diferenciación.

Objetivos particulares

- Construir un modelo lógico que describa la diferenciación de monocitos a células dendríticas *in vitro*.
 - Usar las vías de señalización: CSF-2 e IL-4.
- Revisar coherencia de la red con los datos de expresión genética en los tres tipos celulares.
- Mejorar el modelo por medio de la inclusión de genes con expresión diferencial e interacciones nuevas de regulación, sin reporte previo o sin incluir.
- Probar *in silico* mutantes conocidas con el modelo para corroborar su comportamiento.

Relevancia

Las DC juegan un papel muy importante en la activación de la respuesta inmune adaptativa y son usadas en tratamientos contra el cáncer, enfermedades autoinmunes y algunos tipos de inmunodeficiencias. Con la integración de datos previamente publicados y los sitios de regulación que buscaremos en este estudio podremos identificar a los participantes principales de la diferenciación de monocitos, lo cual sentará las bases para futuras investigaciones sobre las DC. Con nuestro modelo podremos mutar componentes específicos que ayudarán a identificar

afecciones en el proceso de diferenciación. El conocer a detalle la diferenciación y cuáles son los componentes determinantes en el proceso de diferenciación puede, en un futuro, ayudar al desarrollo del uso de las moDC en inmunoterapias. Los monocitos pueden ser obtenidos de sangre periférica, que es un procedimiento menos invasivo que la obtención del progenitor hematopoyético de las DC de médula ósea.

La investigación sobre la diferenciación *in vitro* de monocitos a las moDC y a macrófagos puede ser usada en los próximos años para su uso en terapias. Las células derivadas de monocitos juegan un papel importante en la presentación de antígenos, en la fagocitosis por parte de los macrófagos y la regulación de la respuesta inmune por las DC.

El entender todos los componentes que se requieren para la obtención de las moDC o macrófagos ayudará a dilucidar su participación en diversos procesos de salud-enfermedad, como las enfermedades autoinmunes.

Construcción de un modelo basado en literatura

Para estudiar la diferenciación de monocitos a células dendríticas *in vitro* realizamos la búsqueda de información en la literatura del proceso, referenciada en el Anexo 1. Se conoce que los monocitos deben incubarse con CSF2 e IL4 agregadas al mismo tiempo y durante todo el cultivo. CSF2 activa JAK/STAT, PI3K y NFkB, mientras IL4 activa la vía de JAK/STAT pero diferentes subunidades a las activadas por CSF2. Utilizamos un modelo lógico para representar todos los componentes participantes del proceso de diferenciación. Los modelos lógicos son una herramienta que permite describir un sistema biológico para luego manipularlo y realizar perturbaciones con el fin de probar diferentes condiciones que tomarían mucho tiempo y recursos al realizar las mismas pruebas en el laboratorio. Los modelos lógicos son útiles cuando se carecen de datos cuantitativos sobre el proceso biológico. De ahí la importancia de construir un modelo lógico de la diferenciación de monocitos a las moDC.

Contexto

Los modelos lógicos se usan para describir fenómenos biológicos y predecir futuros comportamientos. En el área de inmunología hay varios modelos lógicos enfocados principalmente en células T (Abou-Jaoudé et al. 2015; Rodríguez-Jorge et al. 2019; Hernandez et al. 2020), pocos relacionados con células dendríticas (Ramírez and Mendoza 2018). Pero no existe ninguno modelo relacionado con la diferenciación de células dendríticas a partir de los monocitos *in vitro*, a pesar de que las moDC son las células dendríticas más usadas en las inmunoterapias (Saxena and Bhardwaj 2018).

En modelos lógicos previos sobre sistemas biológicos se describen procesos complejos como la transdiferenciación de linfocitos B a macrófagos, en donde utilizan datos de secuenciación masiva de RNA-seq y ChIP-seq. Se construyó una red de regulación que incluye los principales TF y los componentes que participan en las principales vías de señalización involucradas en el desarrollo mieloide y linfoide (Collombet et al. 2016).

El emplear información descrita en la literatura y complementarla con regulación genética de un proceso biológico tiene mucho potencial y es muy útil en procesos complejos. El emplear un modelo lógico te permite integrar toda esa información en un solo lugar para describir la diferenciación de monocitos a las moDC y macrófagos.

Métodos

Primero se realizó la curación manual de la literatura involucrada en la diferenciación de monocitos a las moDC. Los artículos científicos revisados enlistados en el Anexo 1 proceden principalmente de datos provenientes de humano y que siguieron el mismo proceso de obtención de las moDC a partir de monocitos cultivados con CSF2 e IL4. Se integraron las vías de señalización que se activan en los monocitos tras la estimulación con CSF2 e IL4, las cuales son JAK/STAT, MAPK, NF κ B y PI3K.

Para la construcción del modelo usamos la herramienta el software libre GINsim, que realiza modelado y simulación de redes reguladoras genéticas y se encuentra disponible en ginsim.org. GINsim permite construir un modelo de una red de regulación genética usando funciones lógicas asíncronas o síncronas para simular y/o analizar su comportamiento dinámico cuantitativo (Naldi, Hernandez, Abou-Jaoudé, et al. 2018). GINsim nos permitió realizar un análisis dinámico del modelo, en donde graficamos los estados estables, que pueden ser síncronos o asíncronos. En el caso de gráficas síncronas cada estado tiene un solo cambio que se conecta con el siguiente, que solamente tiene un estado de cambio. En la gráfica asíncrona, cada uno de los nodos puede ser actualizado al siguiente estado, lo cual lo vuelve un análisis más complejo y es poco recomendado en modelos con muchos nodos, porque el cómputo se vuelve muy lento a comparación de lo que ocurriría en la naturaleza (Schwab et al. 2020).

GINsim tiene una interfaz en java donde es posible dibujar los nodos y sus interacciones (Figura 4). Cada nodo tiene tres tipos de información, (i)reglas (Formulae) en donde definimos el comportamiento de los nodos, (ii)anotación (Annotations) donde referenciamos los estudios consultados sobre dicho nodo y (iii)parámetros (Parameters) en donde incluimos la información de los nodos con los que el nodo tiene interacción y el tipo de interacción.

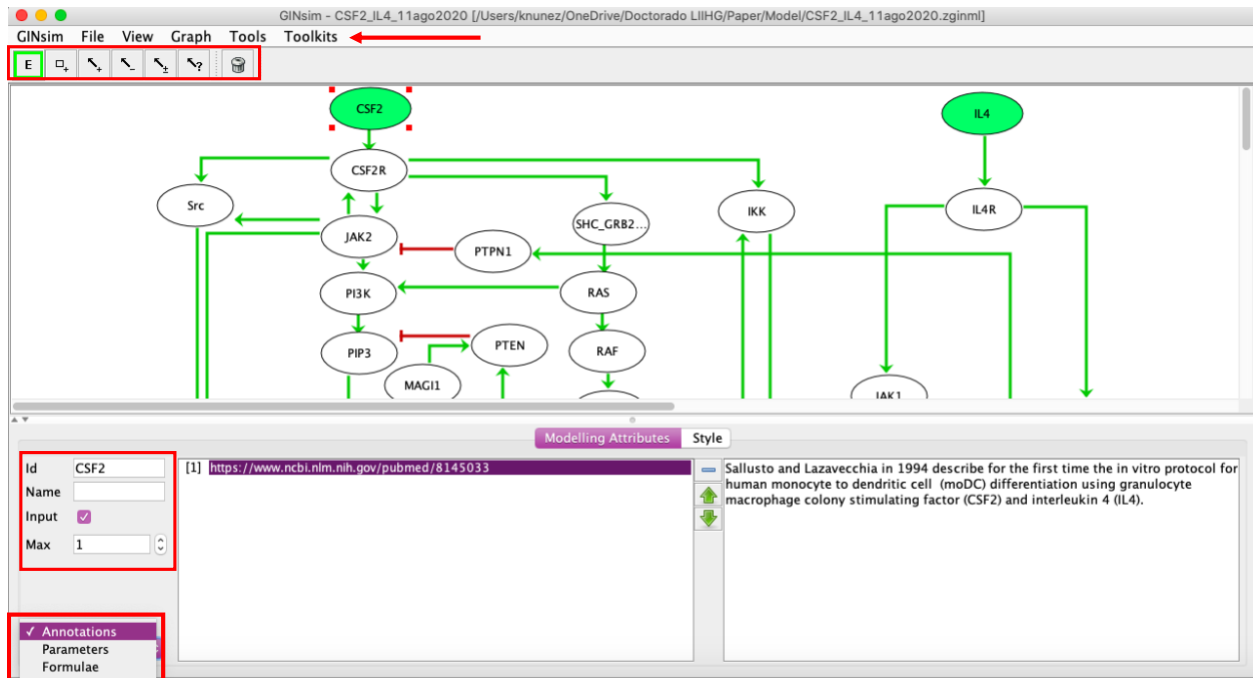


Figura 4. Interfaz de GINSim. Arriba marcado con una flecha el menú de GINSim. De arriba hacia abajo, en el primer cuadro los botones para editar los nodos y las conexiones, en el segundo cuadro tenemos el nombre del nodo que está seleccionado, está indicado que es una entrada (input) y el nivel máximo que puede tener, en el último cuadro tenemos las opciones de información sobre el nodo, en este ejemplo se muestra la información contenida en anotaciones (Annotations).

El primer paso para construir un modelo fue dibujar los nodos con sus interacciones de acuerdo con el conocimiento previo y escribir las reglas que rigen cada interacción nodo-nodo. Las reglas siguen la notación booleana "AND (&)", "OR (|)" y "NOT (!)", por ejemplo, AKT es activado por PIP3, pero en presencia de NCOR2 es inactivado, la regla para la activación de AKT se escribió: PIP3 & !NCOR2 (Figura 5).

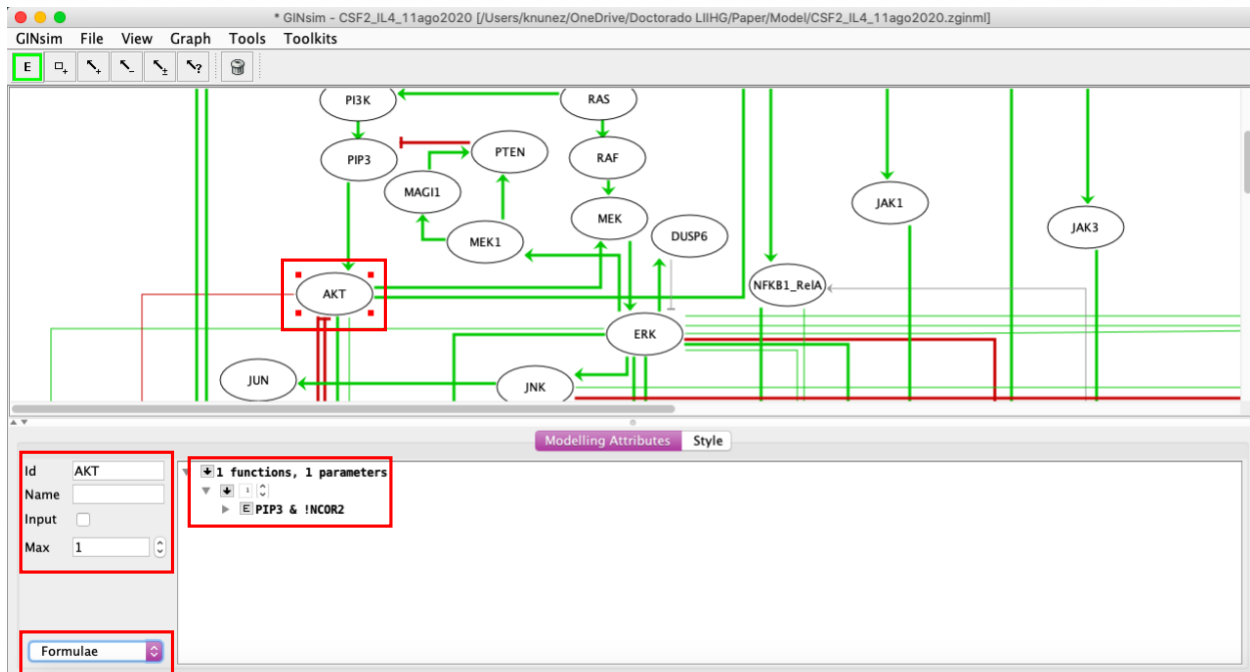


Figura 5. Anotación de las fórmulas de interacción entre los nodos del modelo. En el primer recuadro está el nodo AKT usado como ejemplo para la descripción de activación, en los recuadros inferiores se observa la fórmula o regla de activación.

Una vez que construimos nuestra red de regulación en GINsim realizamos los primeros análisis con el modelo en la sección de *Tools* (Figura 6):

- 1) *Compute stables states*: computamos estados estables con toda la combinatoria de estados de los nodos
- 2) *Analyse circuits*: nos permitió identificar circuitos negativos o positivos en el modelo.
- 3) *Compute interaction functionality*: con la cual identificamos las interacciones que no eran activas y poder corregirlas.
- 4) *Trap-spaces identification*: con este cómputo identificamos si dentro de los estados estables existen estados cíclicos.

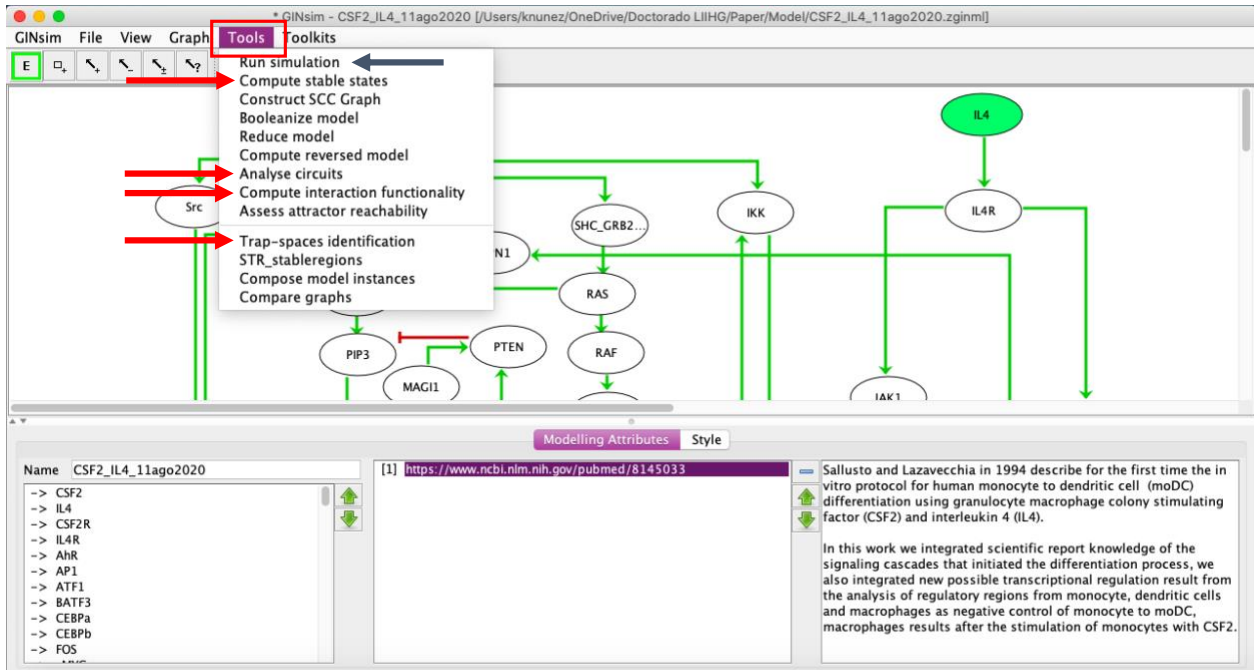


Figura 6. Análisis realizados en nuestro modelo con GINsim.

Con la red construida y con las reglas establecidas iniciamos con la definición de estados estables que sabemos el modelo debe recapitular, en este caso, monocitos, macrófagos, las moDC y muerte celular. Cada estado tuvo un comportamiento único con respecto al estado de activación de los nodos, así como de cada uno de los estímulos. Definimos un estado inicial de los nodos relacionados con los monocitos en el estado previo a la estimulación. Se definieron los estados finales que son los monocitos sin estimular (muerte celular), estimulados con interleucina 4 (monocitos estimulados), con CSF2 (macrófagos) y con la combinación de los dos estímulos (moDC).

La definición de estados iniciales y finales se realizó en la ventana emergente obtenida de *Tools>Run simulations* (Figura 6). Una vez en la nueva ventana se definieron los estados iniciales, se les dio nombre y se definió el estado inicial (*Initial States*) de cada uno de los componentes del modelo que corresponde a los monocitos iniciales; también se determinaron la presencia de entradas fijas (*Fixed inputs*), se probaron diferentes combinatorias de las diferentes entradas (Figura 7).

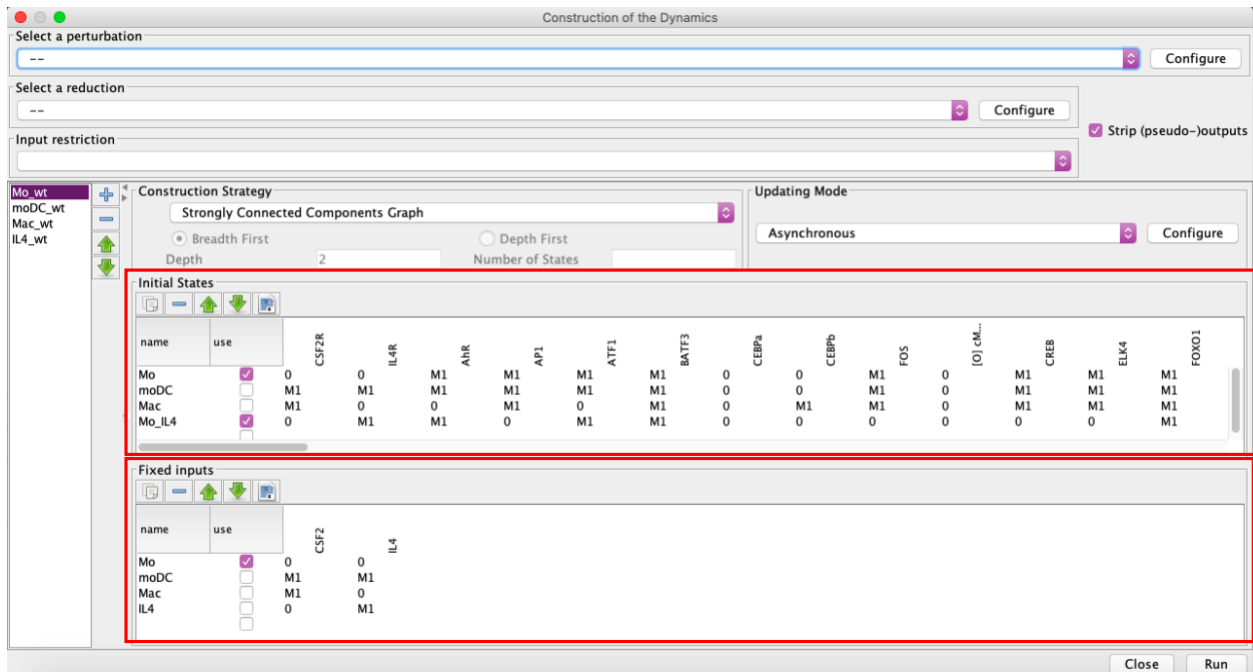


Figura 7. Panel desplegado por *Tools>Run simulation*, donde se puede realizar la definición de estados iniciales (*Initial States*) y entradas (*Fixed inputs*) dentro del programa GINSim.

Una vez que definimos los estados iniciales y las entradas podemos computar las gráficas de transición jerárquica, gráfica de componentes fuertemente conectados y la gráfica de estado de transición, cada una de estas gráficas se puede analizar de forma síncrona, asíncrona, completa y secuencial.

Una vez que se definieron los estados de cada uno de los nodos de acuerdo con las condiciones iniciales y finales y se determinaron las entradas del modelo, realizamos el cómputo de los estados estables. Durante el cómputo, partimos desde el estado inicial, en nuestro caso de un monocito, se realizó la búsqueda de todos los estados de estables. Los estados finales esperados para nuestro modelo son 4, uno por cada entrada y la combinatoria de las mismas (Figura 8).

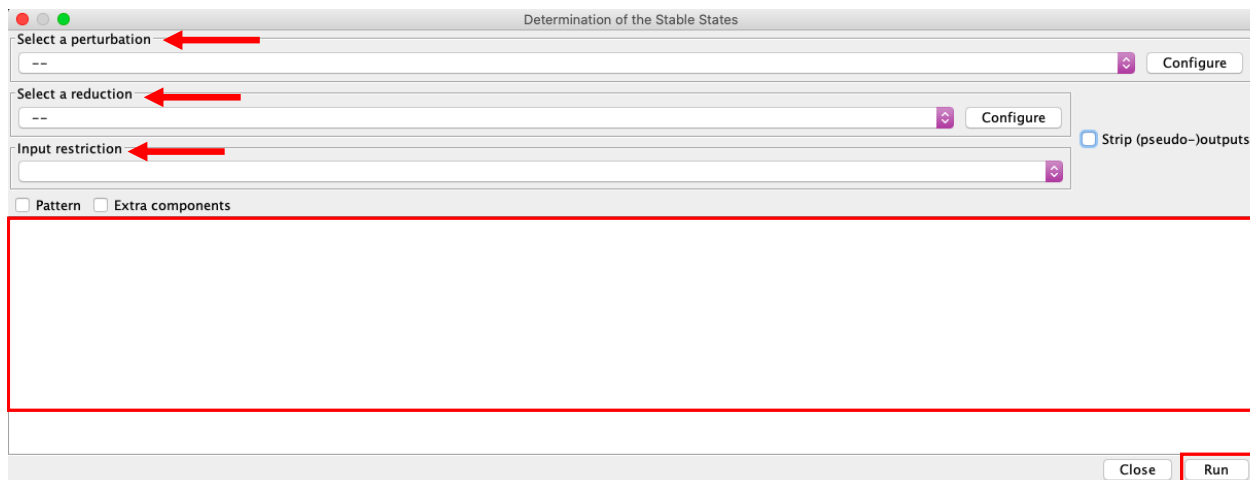


Figura 8. Panel emergente de *Tools>Compute stable states*. En este panel obtuvimos los estados estables en el recuadro marcado con rojo, con las flechas señalo las opciones adicionales que podemos computar, seleccionar una mutante, una reducción el modelo o fijar un tipo de entrada.

Resultados

Después de la curación manual de más de 100 artículos científicos que comprendieron desde la descripción del protocolo de diferenciación hasta las últimas revisiones sobre el fenotipo de monocitos y las moDC (Anexo 1). Basados en la literatura seleccionamos 53 nodos para representarlos en el modelo. Los nodos fueron seleccionados por su participación en la activación de las vías canónicas de señalización. En algunos casos como el del complejo SHC-GRB2-mSOS, lo incluimos en un mismo nodo; el paso de la dimerización de STAT lo omitimos. Definimos las interacciones y las reglas de activación de cada uno de los nodos de acuerdo con lo descrito en la literatura. Con el modelo basado en la literatura, corroboramos con *Compute Interaction functionality* que todas las interacciones estuvieran activas para realizar los análisis posteriores. Identificamos cinco estados estables (Figura 9) y cinco *trap-spaces*, lo que significa que no hay atractores cíclicos dentro de los estados estables. También identificamos un circuito funcional positivo con IRF4 involucrado (Figura 10).

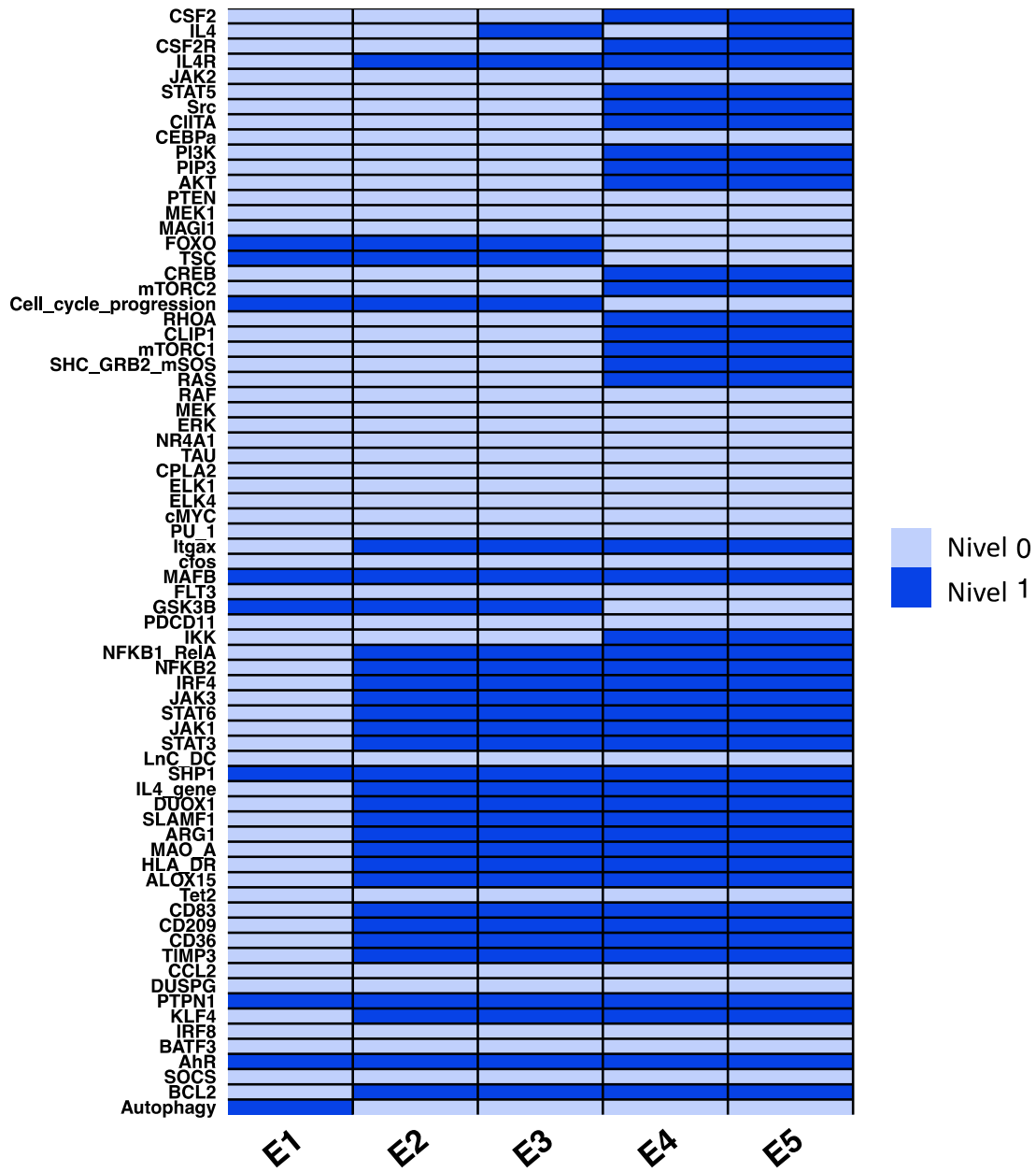


Figura 9. Estados estables obtenidos con el modelo construido a partir de la literatura curada. Las columnas representan los estados estables y en las filas se encuentran cada uno de los componentes. Azul claro representa los nodos apagados (nivel 0), mientras que el azul marino representa nodos encendidos (nivel 1). Los estados estables fueron computados, se tomó en cuenta ambos inputs y se consideró todas las posibles soluciones.

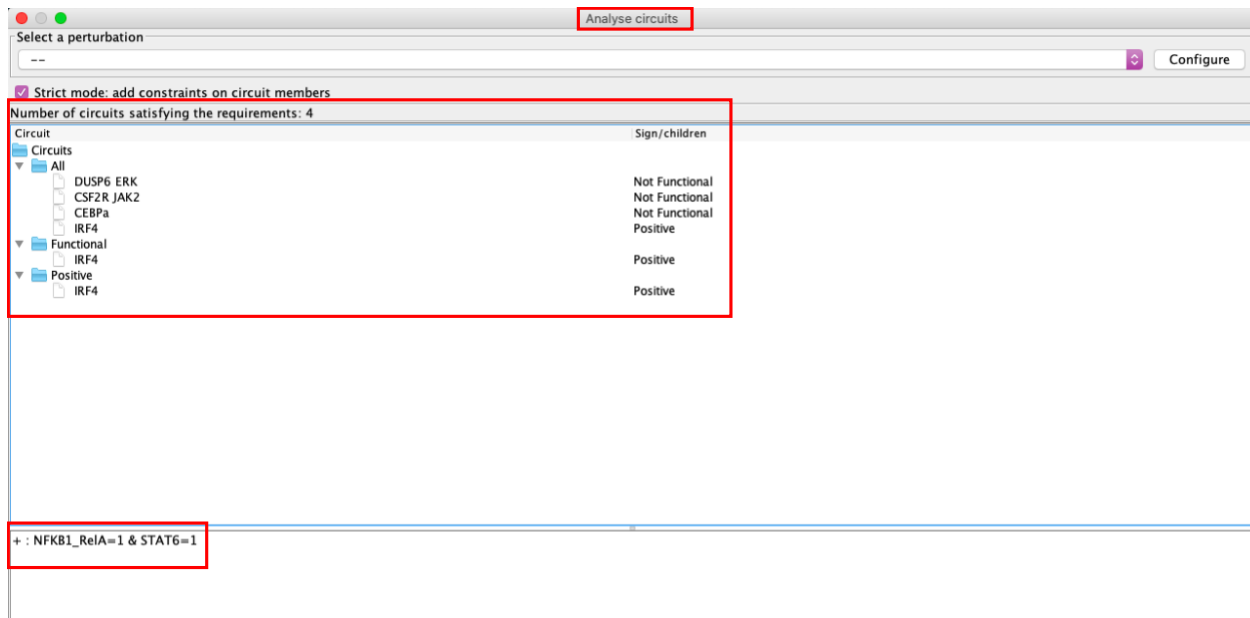


Figura 10. Análisis de circuitos funcionales dentro del modelo. Identificamos un solo circuito funcional que comprende NFKB1, STAT6 e IRF4, todos los TF que participan en la diferenciación a las DC y son activados por IL4.

Las vías de señalización que fueron requeridas para la diferenciación a las moDC son las de JAK/STAT, MAPK y NFKB, activadas por IL4 y CSF2. PI3K permaneció apagada durante la diferenciación.

El estado estable E1 de la Figura 9, que no tenía ningún input puede relacionarse con autofagia. El estado estable E2, que tampoco tuvo inputs, tuvo varios nodos en estado ON, relacionados con la vía de señalización de la IL4. En el estado estable E3, IL4 estaba encendido como input, por lo tanto, se activa la vía de señalización de IL4. En el estado estable E4, con CSF2 como input inicial, se enciende su vía de señalización y observamos que a su vez la vía de la IL4 también se encendía. En el estado estable E5, con IL4 y CSF2 como inputs observamos el estado que puede ser relacionado con el fenotipo de moDC, al activar las vías de la IL4 y del CSF2 por los dos inputs.

En nuestro modelo solo uno de los cinco estados estables hacía referencia a células pre-dendríticas, ya que no presentaba todas las marcas correspondientes a moDC completamente diferenciadas. Mientras que ninguno del resto de los estados podía recapitular cercanamente a los monocitos activados o a los macrófagos. Pues los estados obtenidos aún requerían de componentes que

podieran diferenciar de forma terminal cada uno de los fenotipos esperados. En el modelo teníamos los TF como nodos finales dentro del modelo, lo cual nos sugirió que teníamos que buscar posibles genes blancos que fueran regulados por estos TF y de esta manera poder obtener los fenotipos finales. Dado el reducido número de blancos regulados por los TF y de las pocas interacciones entre los TF, concluimos que teníamos un modelo incompleto de la diferenciación de monocitos.

Conclusión

De acuerdo con los resultados obtenidos con nuestro modelo basado en la literatura científica, podemos concluir que nuestro modelo aún no recapitula correctamente los estados finales correspondientes a los fenotipos celulares esperados. Los estados finales correspondientes a los fenotipos esperados son 4 y tenemos 5 estados estables, por lo que es necesario añadir componentes que permitan identificar fenotípicamente cada uno de los tipos celulares esperados.

Búsqueda de sitios de Regulación transcripcional

El genoma regulador se encontró a partir del descubrimiento que solo el 2% del genoma humano codifica para proteínas, se catalogó el resto del genoma como “genoma basura”. En años recientes ese concepto cambió porque se encontró evidencia que dentro de ese “genoma basura” se localizan regiones de regulación. En dichas regiones se unen los TF y proteínas reguladoras de la cromatina que pueden cambiar la expresión génica en un momento específico de la célula y también es dependiente del tipo celular. Dentro de las regiones de regulación encontramos a los promotores y los *enhancers*. Los promotores se encargan de regular la transcripción de un gen determinado. Los *enhancers* pueden estar río arriba, río abajo del TSS o dentro de un intrón del gen que regulan o pueden estar en regiones más lejanas, ayudando al aumento de la transcripción del gen blanco (Wittkopp and Kalay 2011).

Para estudiar mecanismos de regulación en el genoma humano, es necesario estudiar a los participantes que definen las regiones reguladoras. Sabemos que el genoma se ordena con ayuda de los nucleosomas para formar agregados que definen la compactación de la cromatina, dentro de los nucleosomas compuestos por histonas (pares cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Al About, Tupper, and Jialal 2020)). Existen también otras proteínas participantes, diferentes tipos de histonas, los TF, proteínas remodeladoras de la cromatina, entre otras (Maston, Evans, and Green 2006).

Los TF se encargan de regular la transcripción de genes específicos para momentos determinados, ya sea por tipo celular, el estado del ciclo celular, o durante el desarrollo celular (Vaquerizas et al. 2009). Para el estudio de los TF y conocer su sitio de unión en el genoma se han desarrollado diversos métodos, uno de los más populares es la construcción de matrices a partir de sitios conocidos de sitios de unión al TF determinado (De Bleser et al. 2007).

Se han desarrollado varias técnicas que han permitido estudiar las regiones reguladoras del genoma. Una de las técnicas utilizadas para identificar regiones del DNA con capacidad regulatoria es el ChIP-seq. Esta técnica utiliza un anticuerpo que reconoce una proteína de interés, puede ser una histona con una modificación postraduccional o un TF o la DNA-polimerasa, etc., las células son tratadas con formaldehído para fijar las proteínas con la región del DNA donde se

encuentran, después la cromatina (DNA) es cortado en fragmentos de alrededor 300 pb para después incubar esos fragmentos con el anticuerpo contra la proteína de interés, con los anticuerpos seleccionamos el DNA asociado a la proteína y se secuencian. Esta técnica te permite aislar regiones del genoma que estén asociadas a una proteína de interés en un momento específico de la actividad celular (Park 2009).

Diferentes modificaciones de histonas se han relacionado con estados de la cromatina y la combinatoria de ellas en cierta zona del genoma pueden presentarse en estados biológicos específicos, por ejemplo, se conoce que una abundancia en la marca H3K4me1 se refiere a un promotor (Bae and Lesch 2020), cuando tenemos la combinación de H3K27ac con H3K4me3 podemos hablar de un *enhancer* (A. Lim, Lim, and Kim 2019), cuando tenemos abundancia de la marca H3K36me3 en los cuerpos de los genes (Chantalat et al. 2011), hablamos de que ese gen es transcripcionalmente activo, los promotores, *enhancers*, y cuerpos de genes son accesibles para diversas proteínas en donde la cromatina está relajada o abierta, con las marcas H3K27me3 y H3K9me3 la cromatina se encuentra condensada o cerrada y no es accesible para la RNA-polimerasa o los TF (Kimura 2013).

Contexto

Existen diferentes esfuerzos para caracterizar el genoma regulador como Encode (<https://www.encodeproject.org/>) (ENCODE Project Consortium 2012), Roadmap (<http://www.roadmapepigenomics.org/>) (Consortium et al. 2015), Fantom5 (<https://fantom.gsc.riken.jp/5/>) (Lizio et al. 2015) y el Blueprint (<https://www.blueprint-epigenome.eu/>) (Stunnenberg et al. 2016) entre otros. El consorcio Blueprint se esforzó en realizar una gran cantidad de experimentos con muchas de las células hematopoyéticas desde precursores provenientes del cordón umbilical, hasta células totalmente diferenciadas, también estudiaron líneas celulares y células derivadas del cordón umbilical, células neoplásicas, de enfermedades autoinmunes y también de ratones. Los experimentos realizados por el Blueprint fueron Bisulfite-seq, DNase-seq, RNA-seq, CHIP-seq, y de diversas marcas de modificaciones histonas (H3K4me3, H3K4me1, H3K9me3, H3K27ac, H3K27me3, H3K36me3, H2AZ-ac, H3K9/14ac).

Los datos analizados en este trabajo provienen del consorcio Blueprint (Stunnenberg et al. 2016) usamos datos de ChIP-seq de monocitos, las moDC y los macrófagos derivados de monocitos, con los siguientes identificadores: EGAD00001001552, EGAD00001002484, EGAD00001002485, EGAD00001001576, EGAD00001002504. Los datos incluyen archivos *fastq* (figura 11), es decir el archivo proveniente del secuenciador en donde cada 4 líneas es una secuencia de DNA con su calidad por pb, de seis marcas de histonas, cuatro marcas de activación (H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3 y H3K36me3) y dos marcas de represión (H3K27me3 y H3K9me3).

```

Identificador: @HWI-EAS209_0006_FC706VJ:5:58:5894:21141#ATCACG/1
Secuencia: TTAATTGGTAAATAAATCTCCTAATAGCTTAGATNTTACCTTNNNNNNNNNTAGTTTCTTGAGA
Signo: +
Puntuación de calidad: efcffffcfeefffcffffddfd`feed]` ]_Ba_^__[YBBBBBBBBBRT\]] [] dddd`

```

Puntuación phred = 29

Figura 11. Componentes de una secuencia fastq. Se asigna una puntuación de calidad en la escala phred, como ejemplo el signo “]” tiene una puntuación de 29, las puntuaciones van de 0 a 40, siendo 40 la de mejor calidad.

Con la combinatoria de las modificaciones de histonas es posible asociar regiones del DNA con estados de la cromatina, eso se puede realizar con diversas herramientas computacionales, en este estudio utilizamos la herramienta ChromHMM (Ernst and Kellis 2012), con la cual se fragmenta el genoma en ventanas de 200 pb y se analiza el enriquecimiento de las marcas de histonas presentes en esos 200 pb, el usuario es capaz de definir cuantos estados se espera encontrar. Posteriormente el usuario agrega las etiquetas a cada estado que corresponda a la combinatoria de histonas presentes en las ventanas.

Una vez que se identificaron y clasificaron los estados de la cromatina por tipo celular, es posible realizar otros análisis tales como la búsqueda de sitios de unión a los TF. Dicha búsqueda se realiza *de novo* con el uso del algoritmo *motif discovery*, el cual realiza la búsqueda de palabras sobre-representadas dentro de las secuencias de interés, haciendo corrección por pruebas múltiples (Thomas-Chollier et al. 2012). Existen otros métodos en donde se emplean matrices de TFs específicos (los identificadores usados se encuentran en el anexo 3) se ejecuta el algoritmo de

pattern matching, el algoritmo realiza la búsqueda de sitios conocidos para un TF en específico (Turatsinze et al. 2008). Este segundo algoritmo fue el que empleamos, ya que por el modelo inicial identificamos a los principales TF que participan en la diferenciación de monocitos *in vitro*.

Métodos

Usamos la herramienta ChromHMM (Ernst and Kellis 2012) para identificar estados de la cromatina con la combinatoria de las seis marcas de histonas de los monocitos, macrófagos y las moDC, usamos los archivos *fastq*, de las histonas y su respectivo input para cada marca, el programa binariza los archivos por cada marca en regiones de 200 pb. Con la segmentación obtenida con ChromHMM podemos estudiar cada segmento y asignarles nombre representativo como TSS activo o TSS de represión de acuerdo con la combinatoria de marcas presentes en una región.

Dividimos la cromatina en 10 estados con el uso de ChromHMM, los estados fueron anotados de acuerdo su posición en el genoma y las marcas de histona presentes en esa región. Usamos las anotaciones relacionadas con regulación génica para buscar en ellas, qué estado de la cromatina presentaban los genes incluidos en nuestro modelo y el estado de los genes candidatos para su integración. Para conocer el estado de los genes de interés, comparamos las coordenadas obtenidas con ChromHMM y las coordenadas de los genes con la herramienta *bedtools annotation*.

Con las mismas regiones de regulación, usamos la herramienta *matrix-scan*, usando los siguientes parámetros: modelo de fondo con orden de Markov de 1, p-valores $\leq 10^{-5}$ (-markov 1 -lth score 1 -uth pval 1e-5), con las matrices de los TF que se encontraban en el modelo y los TF relacionados con la actividad de monocitos estimulados, macrófagos y las moDC. *Matrix-scan* arroja las coordenadas de los sitios donde encontró sitios de unión a los TF, por lo que buscamos esas coordenadas y les anotamos el posible gen que regulan. Dentro de las regiones que anotamos, en donde buscamos sitios de unión a los TF y que fueron relacionadas con un gen, buscamos genes específicos de monocitos, de macrófagos y de las moDC.

Resultados

Obtuvimos 10 segmentos de los datos de las marcas de histonas por ChromHMM, las cuales fueron:

1. **TSS reprimido**, presentaba abundancia de la modificación de histona H3K9me3 en el TSS de acuerdo con las anotaciones de RefSeq.
2. **Quiescente/baja señal**, en este estado se agruparon las regiones del genoma que no presentaron las modificaciones de histona que analizamos.
3. **Polycomb reprimido**, presentaba abundancia de la modificación de histona H3K27me3 en el TSS de acuerdo con las anotaciones de RefSeq.
4. **Enhancer inactivo**, presentaba abundancia de las modificaciones de histona H3K4me1, H3K27ac, río arriba del TSS de acuerdo con las anotaciones de RefSeq.
5. **Promotor activo**, presentaba abundancia de las modificaciones de histona H3K4me1 y H3K4me3 en el TSS de acuerdo con las anotaciones de RefSeq.
6. **TSS activo**, presentaba abundancia de las modificaciones de histona H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac en el TSS de acuerdo con las anotaciones de RefSeq.
7. **Enhancer/gen activo**, presentaba abundancia de las modificaciones de histona H3K4me1, H3K4me3, H3K36me3, en el TSS y en los cuerpos de genes de acuerdo con las anotaciones de RefSeq.
8. **Enhancer reprimido**, presentaba abundancia de las modificaciones de histona H3K4me1, H3K4me3, H3K27me3 río arriba del TSS de acuerdo con las anotaciones de RefSeq.
9. **Baja transcripción**, presentaba un incremento leve en la modificación de histona H3K36me3 en los cuerpos de genes, de acuerdo con las anotaciones de RefSeq.
10. **Alta transcripción**, presentaba un aumento mayor en la modificación de histona H3K36me3 en los cuerpos de genes, de acuerdo con las anotaciones de RefSeq.

Comparamos el estado de la cromatina los genes que tenemos en el modelo en cada uno de los tipos celulares incluidos en nuestro modelo (Tabla 1). Encontramos que en algunos de ellos cambiaba el estado de acuerdo con el tipo celular pasan de cromatina inactiva en monocitos, a cromatina activa en las moDC o los macrófagos. Un claro ejemplo es el gen IRF4 que en monocitos y macrófagos está en un *enhancer* inactivo y en las moDC el gen está en estado de transcripción activo, de acuerdo con los estados de la cromatina anotados con chromHMM.

Tabla 1. Estados de la cromatina asociados a genes que participan en la diferenciación de las moDC. La presencia de colores en cada región indica que el inicio del gen está dentro de la región indicada, en verde coloreamos la región de TSS activo, en naranja TSS apagado y en amarillo *Enhancer* inactivo.

Genes	Mo TSS Activo	moDC TSS Activo	Mac TSS Activo	Mo TSS apagado	moDC TSS apagado	Mac TSS apagado	Mo <i>Enhancer</i> inactivo	moDC <i>Enhancer</i> inactivo	Mac <i>Enhancer</i> inactivo
CSF2R									
IL4R									
STAT5									
CIITA									
CEBPA									
FOXO									
CREB									
NR4A1									
ELK4									
cMYC									
PU.1									
ITGAX									
CFOS									
MAFB									
FLT3									
GSK3B									
PDCD11									
NFKB1									
NFKB2									
IRF4									
STAT6									
STAT3									
WFDC21P									
PTPN6									
DUOX1									
SLAMF1									
MAOA									
ALOX15									
CD14									
CCL22									
CD209									
CD83									
TRL4									
TRL8									
NCOR2									
CD226									
SELL									
CD48									
HLA-DR									
CD1A									
CD1B									
CD1C									

CD141									
CD206									
CD163									
MERTK									
IRF8									
DEC205									
DCIR									
KLF4									
BATF3									
ATF									
TRL6									
TIMP3									
DUSP6									
PTPN1									
TET2									
CD300LF									
USF1									
TRL3									
AHR									
CCL2									
PRDM1									

Posteriormente utilizamos 4 regiones de regulación (TSS reprimido, *Enhancer* inactivo, TSS activo y *Enhancer*/gene activo), cada una de las regiones de regulación tiene en promedio 1,300 pb en monocitos, 1,200 pb en las moDC y 1,000 pb en macrófagos. El número de regiones encontradas para monocitos y moDC fue muy similar con alrededor de 10 mil sitios y en macrófagos fueron un poco menos con 6 mil sitios en cada región de regulación. Buscamos en las regiones de regulación sitios de unión a los TF candidatos que participan en la regulación de la diferenciación de monocitos. Pudimos identificar regulación de genes importantes que no habían sido descritos con anterioridad como los TRL3, 4, 6, 7 y 8; así como de otros marcadores específicos de las moDC, de monocitos y de macrófagos. En la tabla 2 podemos ver el TF y sus genes blancos específicos de células dendríticas.

Tabla 2. Sitos de TF identificados en genes específicos de las moDC

<i>Factor de transcripción</i>	<i>de Genes blanco de moDC</i>
<i>AHR</i>	CCL22, DEC205(LY75)
<i>API/JUN</i>	CD1C, DCIR (CLEC4A), TLR4
<i>ATF1</i>	CD141 (THBD)
<i>BATF3</i>	CD1A, CD226,
<i>CEBPA</i>	CD141 (THBD), CD1A, CD1B, CD226, TLR6, TLR7 TLR8
<i>CEBPB</i>	CD1A, CD1B, TLR6, TLR7

<i>CREB1</i>	CD141 (THBD), CD1A, CD209
<i>ELK4</i>	CD209
<i>FOXO1</i>	CCL2, CCL22, CD1C, CD209, CD226, NCOR2
<i>IRF4</i>	CD11C, CD141 (THBD), CD1A, CD1B, CD1C, CD209, CD226, CD48, CD83, NCOR2, TLR3, TLR4, TLR7
<i>KLF4</i>	CCL22, TRL8
<i>MAFB</i>	CCL22
<i>NFKB2</i>	CD83
<i>NR4A1</i>	CD1C
<i>PRDM1</i>	CD11C, CD1A, CD1B, CD226, DEC205(LY75), TLR3, TRL4
<i>PU.1</i>	CD11C, CD1A, CD1C, CD209, CD226, CD48, DCIR (CLEC4A), TLR4
<i>STAT3</i>	CCL2, CD226
<i>STAT5</i>	CCL2, CD226
<i>STAT6</i>	CD1C, CD209, CD226, CD83, DCIR (CLEC4A), TLR6, TLR8
<i>USF1</i>	CD141 (THBD), CD226

IRF4 fue el factor de transcripción con el mayor número de genes regulados para los que encontramos sitios de unión dentro de su región reguladora, esto es consistente con publicaciones previas (Segura et al. 2013) donde se identificó IRF4 como necesario para la diferenciación de las moDC. STAT6 fue el segundo factor de transcripción con un mayor número de genes regulados, principalmente genes de los que no se conocía su regulación (Vento-tormo et al. 2016).

Genes en monocitos y macrófagos

Para poder completar el modelo de la diferenciación de monocitos identificamos sitios nuevos de regulación, los cuales usamos para buscar sitios de unión a TF presentes en nuestro modelo y de esta forma añadir genes específicos de monocitos y macrófagos para poder recapitular el proceso completo de diferenciación (Tabla 3).

Tabla 3. Regulación génica putativa por tipo celular.

<i>Tipo celular</i>	<i>Regulador</i>	<i>Gen blanco</i>
<i>Macrófago</i>	NCOR2	IRF8
<i>Macrófago</i>	AhR, IRF8	MAFB
<i>Macrófago</i>	PU1, AP1, CEBPb	CCDC151
<i>Macrófago</i>	MAFB, IRF8, PRDM1	CD163
<i>Macrófago</i>	MAFB, IRF8, USF1, PRDM1	CD206
<i>Macrófago</i>	IRF8, MAFB	MERTK
<i>Monocito</i>	NR4A1, AP1	KLF4

<i>Monocito</i>	STAT3, FOXO1, KLF4, CD14
<i>Monocito</i>	STAT5
<i>Monocito</i>	STAT6, FOXO1, PRDM1 SELL

También buscamos regulación transcripcional entre los mismos TF (Tabla 4) en donde observamos que PU.1 es uno de los TF que proponemos puede regular más TF. La regulación por PU.1 había sido descrita previamente en la literatura y pudimos corroborarla. Otro TF es STAT6 en el cual encontramos cuatro posibles nuevas interacciones de regulación, que son relevantes para la diferenciación de las moDC.

Tabla 4. Regulación putativa entre TF.

<i>TF regulador</i>	<i>TFs blanco</i>
<i>AHR</i>	IRF4, MAFB, PRDM1
<i>API1/JUN</i>	AP1, KLF4
<i>CEBPA</i>	CEBPA, CEBPB
<i>CEBPB</i>	CEBPB, MAFB
<i>FOXO1</i>	CEBPA
<i>IRF4</i>	AHR, IRF4, PRDM1
<i>IRF8</i>	BATF3, CEBPA, KLF4 MAFB
<i>KLF4</i>	IRF8, PRDM1, USF1
<i>MAFB</i>	CEBPB
<i>NFKB1</i>	IRF4, NFKB2
<i>NR4A1</i>	KLF4
<i>PU.1</i>	CEBPA, CEBPB, IRF4, IRF8, KLF4, MAFB
<i>STAT5</i>	CEBPA, KLF4, NFKB2
<i>STAT6</i>	AHR, ATF1, IRF4, NFKB1, NR4A1, PU.1
<i>USF1</i>	AHR, BATF3

Conclusión

Clasificamos en diez estados a la cromatina a cada uno de tipos celulares estudiados, con dicha clasificación fue posible revisar en detalle el estado de la cromatina de cada uno de los genes relacionados con la diferenciación de monocitos en sus posibles estados finales. Al usar las regiones relacionadas con la regulación genética, TSS activo, TSS apagado y *Enhancer* inactivo nos permitió identificar nuevos sitios de regulación de los TF relacionados con la diferenciación de monocitos con genes blanco-específicos para las moDC, macrófagos y monocitos estimulados.

La identificación de posibles nuevos sitios de unión a TF que pueden regular la expresión de genes en el proceso de diferenciación de monocitos no había sido estudiada. De ahí la relevancia de realizar este estudio y poder enlazar los TF participantes que ya habían sido estudiados y poder relacionarlos con genes blancos específicos y diferenciales en las células finales.

Expresión génica como punto de partida para iniciar un modelo lógico

La expresión genética está relacionada con el estado celular y la respuesta determinada a un estímulo o un proceso. La concentración de RNA puede hablarnos de la presencia de la proteína que codifica el gen expresado, sin embargo, esto no es un reflejo de la cantidad de proteína o su actividad, ya que el RNA es sujeto a modificaciones post-transcripcionales antes de ser traducido a proteína.

La expresión diferencial de genes depende de cada tipo celular en estudio y ayuda a definir el estado inicial y final de los participantes en la diferenciación, en este caso de monocitos a las moDC, macrófagos y monocitos estimulados.

Contexto

Con la obtención de RNA total de las células y su posterior secuenciación masiva (RNA-seq), en diferentes condiciones, es posible identificar el cambio de la expresión de genes, ya sea que baje su expresión o que aumente. El RNA-seq nos permite analizar el contenido total de RNA de una población de células que se secuencian, para después conocer los genes que son sobre-expresados o sub-expresados en una condición específica. En este estudio analizamos RNA-seq total de monocitos, macrófagos derivados de monocitos y las moDC. Cada una de estas células son puntos finales de diferenciación que inicia con los monocitos, para ser estimulados y diferenciados a macrófagos o las moDC. Realizamos la comparación de los genes entre estos tipos celulares, de esta forma pudimos establecer las bases del estado de los genes que incluimos en el modelo.

La expresión diferencial de genes durante el proceso de diferenciación nos ayudará a identificar el estado de los genes dentro del modelo final de la diferenciación de monocitos.

Métodos

Utilizamos datos de RNA-seq provenientes del consorcio Blueprint tres réplicas biológicas por cada tipo celular, monocitos, macrófagos y las moDC, los datos los bajamos desde el portal del Blueprint (<http://dcc.blueprint-epigenome.eu/#/datasets>) con los identificadores:

EGAD00001002308, EGAD00001001506, EGAD00001002526, EGAD00001002507 y EGAD00001001582. El análisis de datos lo realizamos de acuerdo al protocolo descrito en (Law et al. 2016). Primero realizamos el análisis de calidad de las secuencias con *fastqc*, luego usamos *Kallisto* (Bray et al. 2016) que realiza un pseudo-alineamiento tomando en cuenta solo el transcriptoma de interés para asignar cada una de las lecturas a los genes anotados en el genoma humano hg38 versión 91 de *Ensembl*, después realizamos la importación de las lecturas para realizar el conteo usamos la herramienta de *Tximport* (Soneson, Love, and Robinson 2016), a partir de aquí el análisis se realizó en *Rstudio*. Realizamos la normalización de los datos, después realizamos el análisis de expresión diferencial de los genes con *edgeR* (Robinson, McCarthy, and Smyth 2009). Graficamos los resultados con *glimma* (Su et al. 2017) y *heatmap.2* (<https://www.rdocumentation.org/packages/gplots/versions/3.1.1/topics/heatmap.2>).

Resultados

Normalizamos los datos, una vez que las cuentas fueron asignadas a sus genes correspondientes, con el método *trimmed mean of M-values* con la función *calcNormFactors* del paquete *edgeR*. Esta normalización se realizó para quitar la variación por el número de lecturas en cada uno de los experimentos. En la figura 12 podemos observar la distribución de los datos previo a la normalización y el resultado de la normalización.

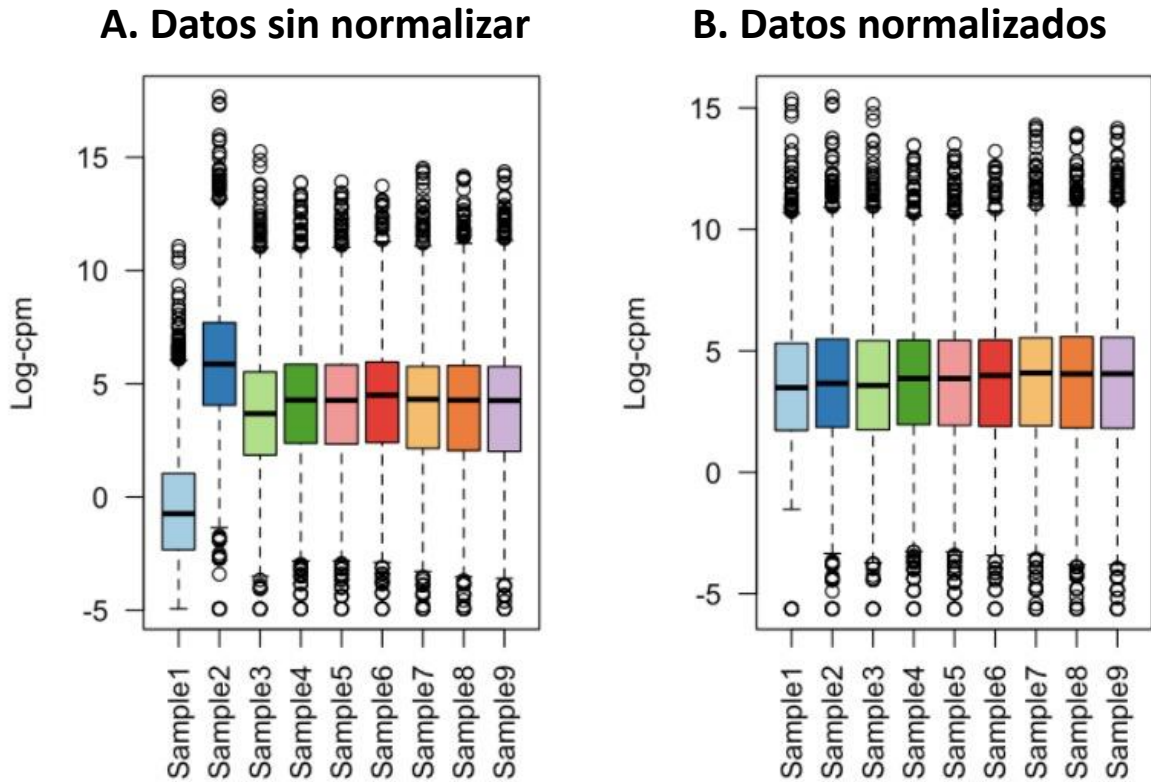


Figura 12. Distribución de los datos sin normalizar y normalizados. En el panel A se encuentran los datos sin normalizar, en el panel B se encuentran los datos normalizados.

Después de realizar la normalización de los datos fueron agrupados en una gráfica de escala multidimensional para observar el comportamiento de las muestras, y observamos que se agrupaban por tipo celular, cada réplica biológica agrupaba con su grupo, eso nos habla de que las réplicas biológicas son homogéneas, bastante parecidas entre sí y que no se agrupan por individuo, lo cual es un buen control (Figura 13).

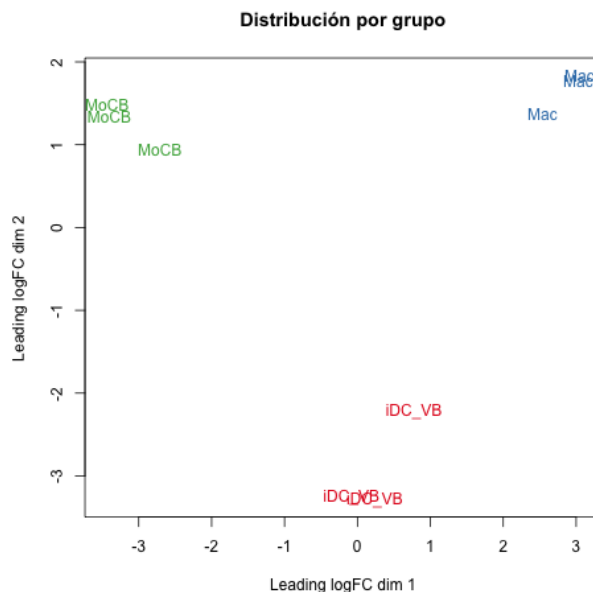


Figura 13. Gráfica de escala multidimensional de la distribución de las réplicas biológicas.

Una vez realizado el análisis de expresión diferencial, la significancia fue definida con el p-valor ajustado de 0.05 y que tuvieran un logFC mayor a 1, usando *empirical Bayes t-statistics*, en la tabla 5 resumimos la información:

Tabla 5. Número de genes diferencialmente expresados

	Monocitos vs moDC	moDC vs Macrófagos	Monocitos vs Macrófagos
Sobre expresados	1,040	311	1,787
Sin expresión diferencial	11911	13,413	10,385
Sub-expresados	1,288	515	2,067

Realizamos un análisis de las vías de expresión enriquecidas con los genes con mayor expresión diferencial en cada tipo celular, en las tablas 6 y 7 muestro las 15 primeras vías enriquecidas al usar genes con expresión diferencial.

Tabla 6. Vías enriquecidas en Monocitos vs las moDC, resaltadas en amarillo se encuentran las vías de la respuesta a IL4 y CSF2. En la primera columna tenemos las vías enriquecidas de la

comparación de monocitos y las moDC, en la segunda el no. de genes involucrados en esa vía, en la tercera columna la dirección de la expresión de la vía, UP para sobre-expresados y Down para sub-expresados, en la cuarta columna tenemos el p-valor del estadístico *eBayes* y en la quinta columna el valor de la corrección por pruebas múltiples llamada FDR, por sus siglas en inglés.

Vías enriquecidas Monocitos vs moDC	NGenes	Dirección	PValor	FDR
PICCALUGA_ANGIOIMMUNOBLASTIC_LYMPHOMA_DN	127	Up	1.54E-18	7.30E-15
REACTOME_PEPTIDE_CHAIN_ELONGATION	83	Up	3.81E-18	9.02E-15
KEGG_RIBOSOME	84	Up	1.21E-17	1.90E-14
REACTOME_3_UTR_MEDIATED_TRANSLATIONAL_REGULATION	103	Up	5.28E-16	6.23E-13
REACTOME_NONSENSE_MEDIATED_DECAY_ENHANCED_BY_THE_EXON_JUNCTION_COMPLEX	104	Up	3.64E-13	3.44E-10
BILANGES_SERUM_AND_RAPAMYCIN_SENSITIVE_GENES	67	Up	5.14E-13	4.05E-10
REACTOME_SRP_DEPENDENT_COTRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	106	Up	1.06E-12	6.99E-10
NAGASHIMA_NRG1_SIGNALING_UP	154	Up	1.18E-12	6.99E-10
RUTELLA_RESPONSE_TO_HGF_DN	232	Up	1.36E-12	7.12E-10
REACTOME_INFLUENZA_VIRAL_RNA_TRANSCRIPTION_AND_REPLICATION	99	Up	1.70E-12	8.05E-10
NAGASHIMA_EGF_SIGNALING_UP	48	Up	2.73E-12	1.17E-09
RUTELLA_RESPONSE_TO_CSF2RB_AND_IL4_DN	309	Up	4.52E-12	1.78E-09
REACTOME_TRANSLATION	143	Up	3.70E-11	1.34E-08
RUTELLA_RESPONSE_TO_CSF2RB_AND_IL4_UP	330	Down	6.85E-11	2.31E-08

Tabla 7. Vías enriquecidas en Monocitos vs Macrófagos. En la primera columna tenemos las vías enriquecidas de la comparación de monocitos y macrófagos, en la segunda el no. de genes involucrados en esa vía, en la tercera columna la dirección de la expresión de la vía, Up para sobre-expresados y Down para sub-expresados, en la cuarta columna tenemos el p-valor y en la quinta columna el valor de la corrección por pruebas múltiples llamada FDR, por sus siglas en inglés.

Vías enriquecidas Monocitos vs Mac	NGenes	Dirección	PValor	FDR
ROSTY_CERVICAL_CANCER_PROLIFERATION_CLUSTER	140	Down	1.11E-20	5.27E-17

GRAHAM_NORMAL_QUIESCENT_VS_NORMAL_DIVIDING_DN	81	Down	6.27E-20	1.48E-16
SOTIRIOU_BREAST_CANCER_GRADE_1_VS_3_UP	149	Down	2.42E-18	3.81E-15
WHITEFORD_PEDIATRIC_CANCER_MARKERS	106	Down	5.00E-18	4.78E-15
KANG_DOXORUBICIN_RESISTANCE_UP	54	Down	5.06E-18	4.78E-15
CROONQUIST_IL6_DEPRIVATION_DN	97	Down	1.61E-17	1.27E-14
LEE_EARLY_T_LYMPHOCYTE_UP	95	Down	4.04E-16	2.73E-13
REACTOME_OLFACTORY_SIGNALING_PATHWAY	68	Up	8.31E-15	4.91E-12
CROONQUIST_NRAS_SIGNALING_DN	71	Down	1.12E-14	5.87E-12
ISHIDA_E2F_TARGETS	51	Down	2.24E-14	1.06E-11
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_PR_UP	41	Down	7.59E-14	3.26E-11
WHITFIELD_CELL_CYCLE_LITERATURE	44	Down	1.26E-13	4.95E-11
GRAHAM_CML_DIVIDING_VS_NORMAL_QUIESCENT_UP	171	Down	6.20E-13	2.25E-10
KONG_E2F3_TARGETS	91	Down	1.48E-12	5.00E-10

Conclusión

La normalización de los datos de RNA-seq fue realizada con éxito, observamos que las muestras se agruparon por tipo celular y no por individuo, ya que cada muestra biológica corresponde a un individuo del que se purificaron monocitos y esos monocitos fueron diferenciados a moDC. De igual forma observamos que una vez que normalizamos nuestros datos todas las muestras presentaban la misma distribución de media. Cuando realizamos el análisis de la expresión diferencial y enriquecimiento de vías de señalización observamos que en monocitos los genes catalogados como sub-expresados durante la activación de las vías de CSF2 e IL4, estaban sobre expresados en monocitos. Los genes catalogados como sobre-expresados durante la activación de las vías de CSF2 e IL4, estaban sub-expresados en monocitos. Lo cual significa que los genes que se sobre-expresan con la activación de las vías de CSF2 e IL4 estaban apagados en monocitos, por lo tanto, es un indicador de que los monocitos no estaban previamente estimulados. Con estos resultados contamos con una base para conocer los niveles de expresión de los genes de interés y conocer el estado en que se encuentran en cada tipo celular, lo que nos ayudara a definir los estados que debemos alcanzar al completar el modelo de la diferenciación de monocitos.

Integración de elementos de regulación nuevos y de expresión para completar un modelo lógico

Publicación: *Logical modeling of in vitro differentiation of human monocytes into dendritic cells unravels novel transcriptional regulatory interactions*

Contexto

Las células dendríticas tienen un papel importante en la inmunidad pues regulan la respuesta inmune al activar o detener la respuesta inmune, lo que permite que el cuerpo regrese a homeostasia, determinante para concluir el proceso inflamatorio.

En este trabajo nos enfocamos en el estudio de la obtención de células dendríticas a partir de monocitos en el laboratorio. La obtención de estas células, así como su entendimiento tienen mucho potencial en la terapia clínica.

La aproximación que elegimos fue construir un modelo lógico de la diferenciación de monocitos a moDC obtenidas a partir de la incubación con CSF2 e IL4, pero no podíamos hacerlo de forma correcta sin incluir también la diferenciación a macrófagos a partir de monocitos, que son obtenidos al utilizar CSF2, también incluimos el tratamiento en solitario de los monocitos con IL4 y la ausencia de estímulos (citocinas y/o factores de crecimiento).

Contribución

Se construyó un modelo lógico de la diferenciación de monocitos a células dendríticas en humano *in vitro*. Se curó literatura científica al respecto, se analizaron datos de ChIP-seq y RNA-seq de monocitos, moDC y macrófagos para completar el modelo con los niveles de expresión de los genes y con las interacciones de regulación. También escribí y diseñé el manuscrito junto con los coautores.

El usar la información del transcriptoma en un modelo lógico no es una estrategia nueva, se ha utilizado en otros estudios (Hernandez et al. 2020), cuando determinamos los participantes de nuestro modelo es necesario conocer el estado de los componentes para el inicio del cómputo de las simulaciones. El artículo fue publicado en la revista *Focus Interface* y es de libre acceso en <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsfs.2020.0061>.

Research



Cite this article: Nuñez-Reza KJ, Naldi A, Sánchez-Jiménez A, Leon-Apodaca AV, Santana MA, Thomas-Chollier M, Thieffry D, Medina-Rivera A. 2021 Logical modelling of *in vitro* differentiation of human monocytes into dendritic cells unravels novel transcriptional regulatory interactions. *Interface Focus* **11**: 20200061.

<https://doi.org/10.1098/rsfs.2020.0061>

Accepted: 15 April 2021

One contribution of 11 to a theme issue 'Bioinformatics in Latin America: ISCB-LASOIBIO RMB Symposium 2020'.

Subject Areas:

bioinformatics, computational biology, systems biology

Keywords:

dendritic cells, differentiation, logical modelling, regulatory networks

Authors for correspondence:

Denis Thieffry

e-mail: denis.thieffry@ens.fr

Alejandra Medina-Rivera

e-mail: amedina@liigh.unam.mx

Electronic supplementary material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.5428716>.

**THE ROYAL SOCIETY
PUBLISHING**

Logical modelling of *in vitro* differentiation of human monocytes into dendritic cells unravels novel transcriptional regulatory interactions

Karen J. Nuñez-Reza¹, Aurélien Naldi², Arantza Sánchez-Jiménez¹, Ana V. Leon-Apodaca¹, M. Angélica Santana³, Morgane Thomas-Chollier², Denis Thieffry² and Alejandra Medina-Rivera¹

¹Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma Humano, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, México

²Computational Systems Biology team, Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, Inserm, CNRS, Université PSL, Paris, France

³Centro de Investigación en Dinámica Celular (ICBA), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México

KJN-R, 0000-0002-5459-8461; AS-J, 0000-0001-9572-2951

Dendritic cells (DCs) are the major specialized antigen-presenting cells, thereby connecting innate and adaptive immunity. Because of their role in establishing adaptive immunity, they constitute promising targets for immunotherapy. Monocytes can differentiate into DCs *in vitro* in the presence of colony-stimulating factor 2 (CSF2) and interleukin 4 (IL4), activating four signalling pathways (MAPK, JAK/STAT, NFκB and PI3K). However, the downstream transcriptional programme responsible for DC differentiation from monocytes (moDCs) remains unknown. By analysing the scientific literature on moDC differentiation, we established a preliminary logical model that helped us identify missing information regarding the activation of genes responsible for this differentiation, including missing targets for key transcription factors (TFs). Using ChIP-seq and RNA-seq data from the Blueprint consortium, we defined active and inactive promoters, together with differentially expressed genes in monocytes, moDCs and macrophages, which correspond to an alternative cell fate. We then used this functional genomic information to predict novel targets for previously identified TFs. By integrating this information, we refined our model and recapitulated the main established facts regarding moDC differentiation. Prospectively, the resulting model should be useful to develop novel immunotherapies targeting moDCs.

1. Introduction

Dendritic cells (DCs) are the main antigen-presenting cells [1]. By presenting antigens to the naive lymphocytes, they initiate the immune response against various kinds of pathogens [2]. This capacity of DCs to activate the adaptive immune response opens interesting prospects for immunotherapies [3]. Circulating in the peripheral blood, monocytes are easily accessible and can be differentiated into dendritic cells, called moDCs (for monocyte-derived DCs), using an established protocol [4].

The protocol to differentiate monocytes into moDCs consists in cultivating monocytes with colony-stimulating factor 2 (CSF2) and interleukin 4 (IL4) [4,5]. When only IL4 is used, monocytes are activated, while their treatment with only CSF2 results in their differentiation into macrophages. Only the combination of both stimuli enables DC differentiation, pointing to the importance of signalling interplay for the differentiation of moDCs. It is known that CSF2

© 2021 The Authors. Published by the Royal Society under the terms of the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>, which permits unrestricted use, provided the original author and source are credited.

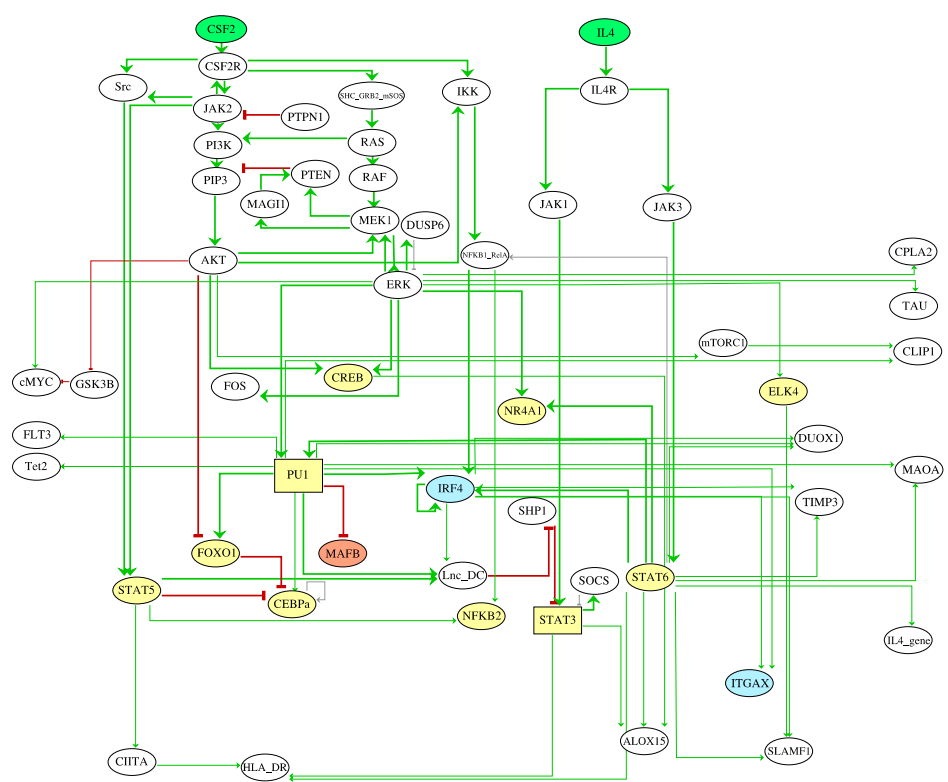


Figure 1. Regulatory graph controlling monocyte to moDC differentiation, as derived from the scientific literature. Ellipsoid nodes are associated with Boolean components (0 and 1), whereas the two rectangular nodes are associated with ternary components (0, 1 and 2). The green nodes at the top represent the inputs (CSF2 and IL4), the yellow nodes denote transcription factors, the blue nodes denote moDC-specific genes, while orange nodes denote macrophage-specific genes. Nodes left in white correspond to components of generic signalling pathways. Green and red arcs denote positive and negative interactions, respectively. The core network interactions are emphasized by thicker arcs.

signalling leads to the activation of NFKB, MAPK, PI3K, JAK2 and STAT5 [6,7]. By contrast, IL4 signalling activates the JAK/STAT pathway, with JAK1 activating STAT3, and JAK3 activating STAT6 [8]. There are several well-known transcription factors (TFs) that are ultimately activated by CSF2 and IL4 signalling pathways, but only a fraction of the target genes participating in moDC differentiation have been reported [7,9–11].

To integrate multiple signalling pathways into a comprehensive regulatory network and check its coherence with existing expression data, one can rely on the construction of a dynamical model [12]. As most of the available data are qualitative, we opted for using a qualitative approach. Logical modelling is well suited to represent such qualitative data and has been applied to similar processes [13–15]. This qualitative formalism relies on the construction of a regulatory graph, whose nodes denote molecular components (e.g. genes, proteins and lncRNA), while signed arcs denote positive or negative (or sometimes dual) regulatory interactions. In the simplest cases, nodes are associated with Boolean variables, which take the values 0 or 1, denoting the absence/inactivity or the presence/activation of the corresponding component, respectively [16]. When needed, multilevel variables (e.g. ternary variables taking the values 0, 1, 2) can be

used to account for different ranges of activation (e.g. negligible, medium and high). Logical models are usually derived from a careful manual curation of relevant scientific literature, but they can also be enriched with other sources of information, such as high-throughput sequencing data [17].

GINsim is a computational software dedicated to the building and analysis of logical models of cellular networks [16]. GINsim includes specific tools to perform model simulations, as well as efficient algorithms to identify the attractors of the system (stable states and/or oscillatory behaviour), for wild-type or mutant conditions [16]. The resulting model can be further analysed using the CoLoMoTo suite, an interactive toolbox integrating several logical modelling software tools, with a uniform interface to perform complementary analyses, which are easy to share and reproduce through the use of notebooks [18].

The aim of our study was to integrate all the information gathered from scientific literature and functional genomic data (RNA-seq and ChIP-seq) into a logical model of the regulatory network underlying moDC differentiation. We further included key macrophage differentiation elements to complement our study [11,19,20]. The resulting model recapitulates the salient cell commitment features for each of the

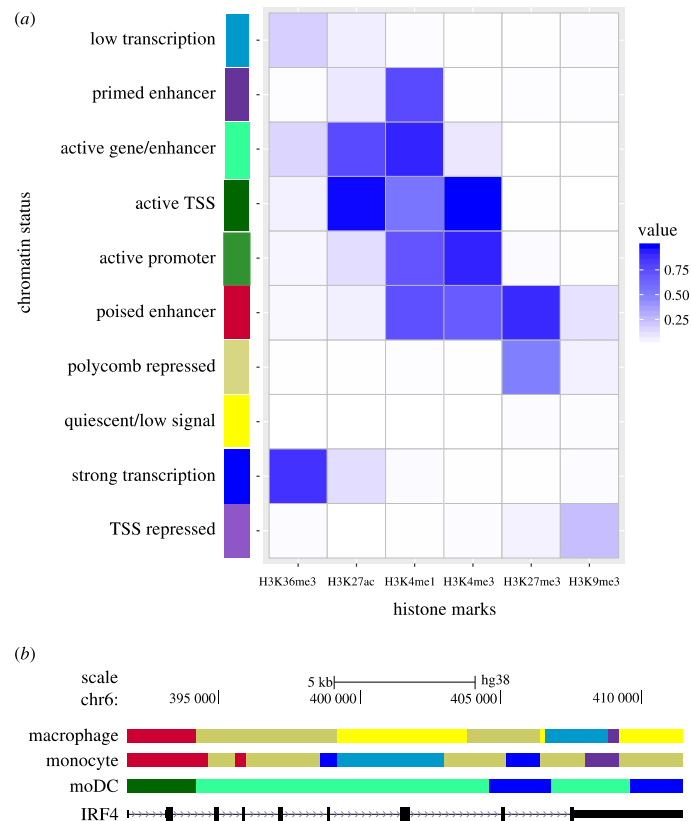


Figure 2. Epigenomic annotations of monocytes, moDCs and macrophages. (a) Heatmap showing the histone mark enrichment in each of the states determined with ChromHMM. (b) The genomic region coding for IRF4 is displayed in the UCSC genome browser. For each cell type, the ChromHMM analysis generates a specific segmentation, where each colour represents a chromatin state defined in the heatmap shown above. The annotation of chromatin state was derived from biological knowledge. Note that for this example, active gene marks (in green) are present only in the moDC track.

initial conditions considered: (i) IL4 alone fosters monocyte activation, (ii) CSF2 alone fosters macrophage commitments, while (iii) CSF2 and IL4 together foster moDC commitment, with the corresponding typical gene expression patterns.

2. Results

2.1. Information gathered from literature curation leads to a fragmentary model for the differentiation of monocytes into dendritic cells

To better understand the regulatory network controlling moDCs differentiation, we analysed the scientific literature and integrated relevant information into a regulatory graph. In this process, we focused on monocyte to moDC differentiation studies carried primarily on human cells, in particular on experiments where CSF2 and IL4 were used alone or in combination in otherwise similar culture conditions. The resulting regulatory graph is shown in figure 1.

Based on this first regulatory graph, we used GINsim to define logical rules, combining conditions on regulatory nodes with NOT, AND and OR Boolean operators, to compute

the corresponding stable states, and to perform simulations in order to determine the cellular phenotypes reached for each specific input condition. Note that although most nodes are associated with Boolean variables, we assigned ternary variables to the model components STAT3 and PU1. In such a situation, two non-overlapping rules are defined, enabling the value 1 and 2, respectively (see electronic supplementary material, table S1).

For this preliminary model, we obtained six stable states, but only one of them could be directly interpreted as a cellular phenotype (pre-DCs), while the other stable states diverged from the typical gene expression patterns of activated monocytes and macrophages.

Regarding the regulatory interactions between TFs and their target genes displayed in figure 1, we observed that several TFs exert only a few interactions. For example, CREB solely activates ALOX15, and no other target gene. Furthermore, this regulatory graph contains very few specific moDC markers. Consequently, to complete this preliminary network, we decided to take advantage of the public epigenome and transcriptome datasets to infer novel regulatory interactions and integrate them into our logical model (a proof of concept of this approach can be found in [17]).

Table 1. Cell type-specific gene markers selected to be added to the model. Based on the epigenome analysis, we identified novel regulatory interactions pointing to candidate genes for inclusion in our model.

cell type	gene	reference
moDCs	TLR8	[24]
moDCs	TLR7	[24]
moDCs	TLR6	[25]
moDCs	TLR4	[24]
moDCs	TLR3	[24]
moDCs	NCOR2	[9]
moDCs	DEC205 (LY75)	[24]
moDCs	DCIR (CLEC4A)	[24]
moDCs	CD83	[26]
moDCs	CD48	[9]
moDCs	CD226	[9]
moDCs	CD209	[24]
moDCs	CD1C	[9]
moDCs	CD1B	[27]
moDCs	CD1A	[28]
moDCs	CD141 (THBD)	[27]
moDCs	ITGAX (CD11C)	[9,29]
moDCs	CCL22	[9]
moDCs	CCL2	[30]
monocyte	CD14	[31]
monocyte	SELL	[9]
macrophage	CD163	[9]
macrophage	CCDC151	[32]
macrophage	MERTK	[9]
macrophage	CD206	[9]

2.2. Epigenomic data analysis helps to unravel relevant transcriptional regulatory interactions

In order to complete our model of the regulatory network controlling the differentiation of monocytes into moDCs, we included the TFs known to be activated by CSF2 and IL4 signals in moDCs, together with established monocyte markers. Moreover, we included information regarding the differentiation of monocytes into macrophages, which occurs when monocytes are treated with CSF2 alone [21]. In short, we (i) used monocyte, moDC and macrophage epigenome data to define chromatin states, (ii) defined genomic regions likely to be involved in the regulation of the genes included in the model, and (iii) searched for putative TFs binding sites in these regions.

We analysed ChIP-seq data from the Blueprint consortium for six histone marks (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3, H3K9me3 and H3K27me3) in monocytes, moDCs and macrophages derived from monocytes. We then used ChromHMM [22] to annotate the epigenome in each cell type based on these data. The resulting genomic segment states were classified into 10 categories: quiescent/low signal, polycomb repressed, poised regulation, active TSS, active

promoter, Primed enhancer, active gene/enhancer, low transcription, TSS repressed and strong transcription (figure 2a). As expected, it is possible to visualize clear differences in the epigenome of moDCs versus monocytes when exploring genes with specific cell expression in a genome browser. For example, the gene coding for IRF4, a TF that mediates the differentiation of moDCs, is active in moDCs, while it is poised in macrophages and monocytes (figure 2b).

In the following step, we selected the segments corresponding to promoter and enhancer states: active TSS, repressed TSS, active gene/enhancer and poised regulation. These regulatory regions were used to predict binding sites for the TFs known to be activated by the CSF2 and IL4 pathways (figure 1), using position-weight matrices collected from the Jasp database [19], with the pattern-matching tool *matrix-scan* [20] from the RSAT suite [23]. This led us to predict novel transcription factor binding site presumably involved in the regulation of specific gene markers for moDCs, monocytes and macrophages (table 1), thereby enabling us to complete the regulatory network controlling monocyte to moDC differentiation.

For 13 out of 19 genes related to moDC phenotype, we detected putative binding sites for IRF4 (figure 3a) into putative regulatory regions (cf. ChromHMM analysis) located near to the TSS of the corresponding genes. Interestingly, this led us to corroborate the central role of IRF4 in moDC differentiation. Indeed, we predicted that IRF4 possibly regulates several TLR genes (TLR3, 4 and 7), which play a crucial role in antigen recognition in myeloid cells and are thus relevant for moDC. Furthermore, we predicted that TLR6 and TLR8 are regulated by STAT6, another essential TF in moDCs [7], we acknowledge that TLRs genes are not specific for moDCs; however, their transcriptional regulatory mechanisms are not fully understood and our results provided useful insights for future studies. In addition, we predicted that the genes encoding for the trans-membrane proteins CD1A, CD1B and CD1C are regulated by IRF4, as well as by other TFs (PU1, PRDM1, NR4A1 and CEBPA) related to moDC differentiation. Furthermore, we predicted that the gene coding for CD48, a costimulatory molecule involved in T cell activation, is regulated by PU1, which is known to participate in the differentiation of STEM cell progenitors into leucocytes [33]. We also analysed the non-redundant peaks available from Remap and identified several concordances with our results (electronic supplementary material, table S6). We also looked for regulatory interactions between the identified TFs. In particular, we predicted regulatory interactions from PU1 onto CEBPA, IRF4 and IRF8. We also predicted that AHR regulates IRF4, MAFB and PRDM1, which represent interesting candidates to assess experimentally. Figure 3b summarizes the regulatory interactions between TFs that compose our final logical model.

2.3. Integration of predicted novel regulatory interactions improves model accuracy

We integrated the selected gene markers for each cell type with the predicted regulatory TFs into our model and connected them with the regulatory interactions reported in figure 3. Using this extended regulatory graph (figure 4a) together with relevant Boolean rules, we computed the stable states, which consistently recapitulated the main cell fates (see electronic supplementary material, table S3).

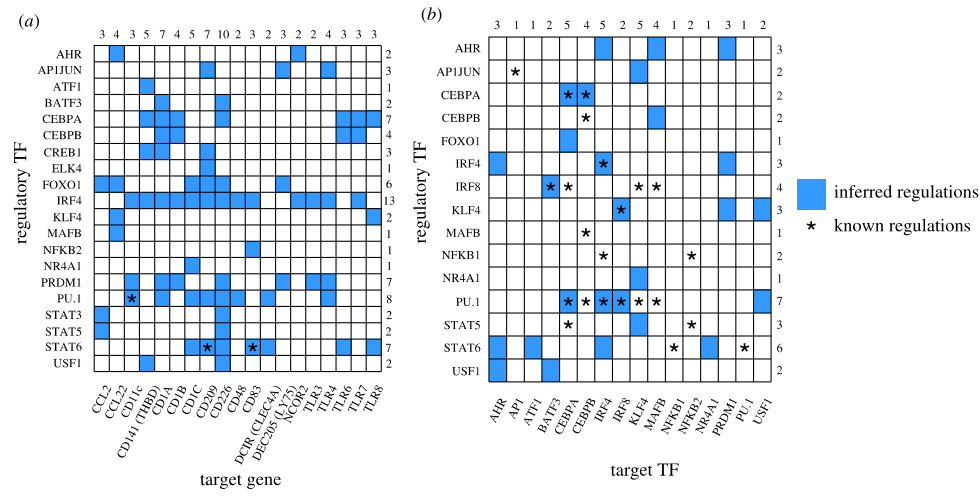


Figure 3. Predicted transcriptional regulatory interactions by TFs activated through CSF2 and IL4 signalling cascades. Position-weight matrices (from Jaspas database) for relevant TFs were used to predict binding sites in selected regulatory regions (based on chromatin state annotations) of specific genes. (a) The rows correspond to the regulatory TFs and the columns to the moDC-specific target genes. (b) The rows list the regulatory TFs and the columns list the target TFs. Turquoise coloured squares denoted the prediction of binding sites for the specified TF in the corresponding target gene region. Asterisks emphasize previously reported regulatory interactions (for the corresponding references, see electronic supplementary material, table S2). For each TF, the number of targets is reported on the right. The number of TF regulating each target gene is reported on the top of the corresponding column.

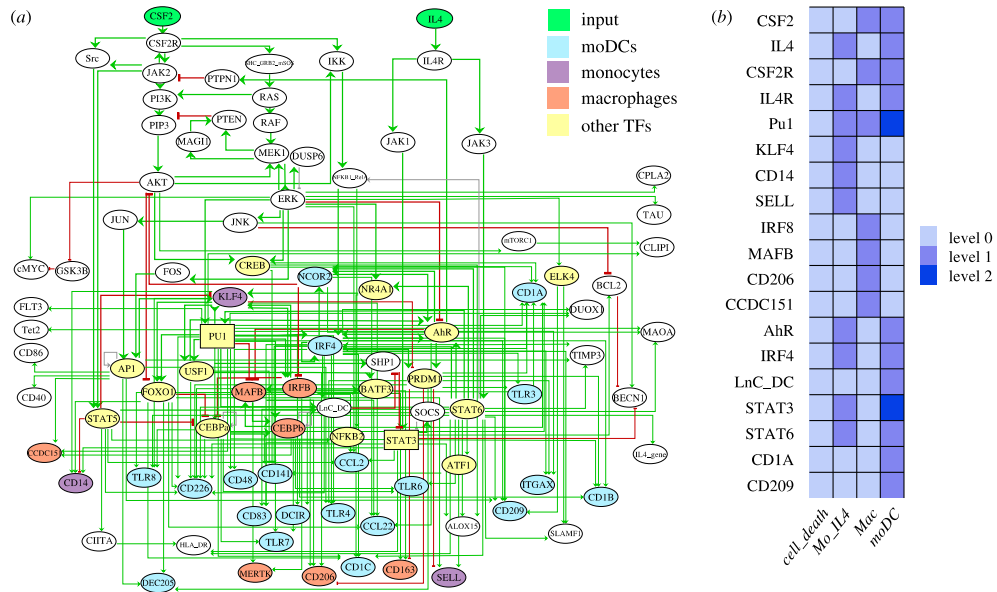


Figure 4. Logical model for the *in vitro* differentiation of monocytes into moDCs. (a) Ellipsoid nodes are associated with Boolean components (taking the values 0 and 1), whereas the two rectangular nodes are associated with ternary components (taking the values 0, 1 and 2). The green nodes at the top represent the inputs (CSF2 and IL4), the yellow nodes denote TFs, blue nodes correspond to moDC-specific genes and purple nodes to monocyte specific genes. Green and red arcs denote positive and negative interactions, respectively. (b) Stable states of the model and matching cell types (only the most relevant nodes are shown). The first column corresponds to the final outcome in the absence of both IL4 and CSF2, i.e. cell death of the monocytes. The second column corresponds to the stimulation of monocytes by IL4. The third column corresponds to the macrophage outcome, in the presence of the sole CSF2. Finally, the fourth column corresponds to moDC commitment, in the presence of both IL4 and CSF2, where STAT3 reaches level 2 in the presence of the long non-coding RNA LnC-DC, and PU1 reaches also level 2, which is required to turn-off MAFB during moDC commitment (for a complete listing of node values at the four stable states, see electronic supplementary material figure S1).

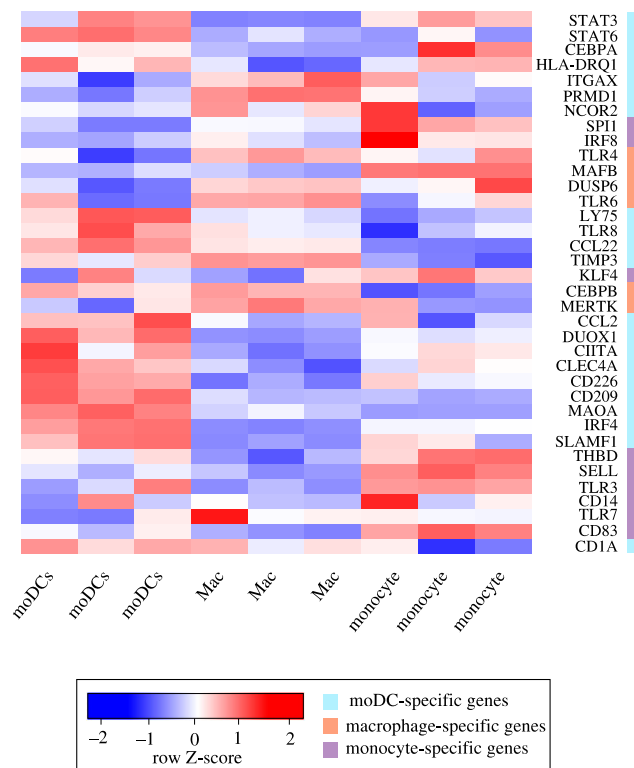


Figure 5. Heatmap showing differentially expressed genes between cell types after hierarchical clustering based on differential expression. The first three columns correspond to moDCs, the following three columns to macrophages and the last three columns to monocytes (each triplet of columns represent biological replicates). The colour-coded Z-score indicates the level of differential expression for each gene. Cell types are annotated based on known gene expression on the right, with light blue denoting moDCs expression, orange denoting macrophages and purple denoting monocytes.

Our revised model is characterized by four stable states (figure 4b; electronic supplementary material, figure S1). The first stable state, in the absence of IL4 and CSF2 activation, corresponds to cell death, which is the expected outcome in this situation. The second stable state is obtained upon IL4 activation and corresponds to the monocyte signature, with KLF4, SELL and CD14, in the ON setting. The third stable state is obtained for CSF2 activation and corresponds to a macrophage signature, with MAFB, IRF8, CCDC151 and CD206 ON. Finally, the last stable state is obtained when both CSF2 and IL4 are activated and corresponds to the moDC signature, with IRF4, STAT6, CD1A and CD209 all ON. Noteworthy, this analysis recapitulates the fact that PI3K signalling is inhibited during moDC commitment, as previously reported by van de Laar *et al.* [6].

To validate the different expression signatures, we analysed RNA-seq data from monocytes, moDCs and macrophages. Figure 5 displays the differential expression of the genes included in the model. Interestingly, we found two main clusters of genes highly expressed in moDCs, but downregulated in macrophages. These moDC differentially expressed genes include those coding for the TFs STAT3, STAT6, CEBPA and IRF4, which participate in moDC differentiation, as well as those for CD209, MAOA and SLAMF1,

which are specific markers for moDCs. Additionally, monocytes display high expressions of the genes coding for KLF4, IRF8, SELL and CD14.

In the next step, we took advantage of the CoLoMoTo toolbox to recapitulate documented cellular commitment experiments.

2.4. Model simulations recapitulate the main aspects of cellular commitment to differentiation

We imported our model into the CoLoMoTo environment to ease further analyses with complementary software tools such as Pint, BioLQM and MaBoSS [34]. The integration of all analyses can be found in a Jupiter (python) notebook (available at <http://ginsim.org/model/monocytes-to-dc>) further ensures reproducibility.

We used the tool BioLQM to compute the trap-spaces for the wild-type situations [35]. As trap-spaces provide approximations of cyclic attractors, we could thereby verify that the model does not generate any cyclic attractors.

We continued to use BioLQM [35] to assess the behaviour of the model for nine single gene losses-of-function (affecting IRF4, STAT6, PU1, IRF8, MAFB, NCOR2, AHR, JAK3 and CEBPB, respectively) that have been reported in the literature

Table 2. Perturbations tested in the model of monocyte to moDC differentiation.

protein	function	phenotype extracted from references	perturbation simulated	model phenotype
IRF4	transcription factor	monocytes were infected using lentiviral vectors containing shRNA against IRF4, silenced IRF4 induced a dramatic reduction of moDCs [11]	loss of function	lack of most of moDC-specific markers
STAT6	transcription factor	the ectopic expression of STAT6 in monocytes, resulted in increased levels of the DC-specific marker DC-sign, following CSF2 stimulation, and without IL4 [7]	gain of function	STAT6 is almost sufficient to archive moDCs differentiation
PU1	transcription factor	inducible constructions of PU1, and MAFB were used to infect monocytes. In cells with PU1 induced DCs, MafB differentiated macrophages [36]	loss of function	abolish moDCs, and macrophage phenotype commitment
IRF8	transcription factor	introduction of KLF4 into an <i>Irf8</i> ^{-/-} myeloid progenitor cell line induced a subset of IRF8 target genes and caused partial monocyte differentiation [30]	loss of function	abolish KLF4 expression, and the entire macrophage differentiation
MAFB	transcription factor	silencing of MAFB resulted in a strong decrease in mo-Macs, and an increase in mo-DC differentiation [36]	loss of function	moDCs differentiation is normal, Mac differentiation is abolished
NCOR2	transcriptional regulator	NCOR2 silencing resulted in 1834 variable genes that correspond with IL4 signature genes [9]	loss of function	lack of moDC-specific markers
AHR	transcription factor	AHR silencing reduced mo-DC differentiation while slightly increasing mo-Mac [11]	loss of function	lack of every moDC-specific markers, Mac differentiation is normal
JAK3	tyrosine-protein kinase	STAT6 phosphorylation disappeared following JAK3 inhibition. In the case of Macs, we did not observe STAT6 phosphorylation, given the lack of stimulation of JAK3 [7]	loss of function	Mac phenotype with CSF2, and IL4. Mac differentiation is not affected
CEBPB	transcription factor	in the absence of CEBPb in monocytes CEBPb-KO, only a very low amount (5%) of this Mac-like morphology was seen, and most of the cells stayed round [37]	loss of function	lack of some specific macrophage markers

to affect the differentiation process. Table 2 summarizes the results obtained for these perturbations, while figure 6 shows the activity of each node for each perturbation at the stable states. These results qualitatively replicate the behaviour of each of the documented mutants. We further simulated the knock-out of each TF from figure 3a and identified that BATF3, FOXO1, PU1 and USF1 affected the three final cell types (electronic supplementary material, table S7).

We then used the tool Pint [38] to verify the reachability of the stable states corresponding to the correct cell commitment for each combination of CSF2 and ILF4, starting from a quiescent Monocyte state. Next, we used the stochastic Boolean simulation tool MaBoSS to generate mean temporal curves, starting from initial conditions corresponding to quiescent Monocytes, towards the stable state reached in the presence of the corresponding combination of active CSF2 and ILF4 [39]. In figure 7, we can observe several curves initially growing but later decaying. These curves most likely represent transient cellular states during the conversion of cells from their initial state to the attracting state reached at the end of the simulations.

3. Discussion

The construction of logical models traditionally relies on manual curation of the literature on a biological system of interest. In this work, we further took advantage of public ChIP-seq and RNA-seq data from the Blueprint consortium [40] to delineate in more detail the network driving the differentiation of monocytes into moDCs. We were able to fill in various gaps in the regulatory network, which allowed us to reach a better understanding of this differentiation process. Noteworthy, this led us to predict 102 novel interactions, which were validated *in silico* through our simulations, and are amenable to further experimental tests.

In particular, we delineated a series of target genes presumably important for the differentiation of monocytes into moDCs. Some TFs are already well known, such as IRF4, AHR, STAT6 and PU1 [7,11,29]. Our analysis recapitulates several key features regarding the expression of the corresponding genes, such as a high expression of IRF4 and STAT6 genes in moDCs. We further validated the results obtained by Vento-Tormo *et al.* [7] indicating that STAT6

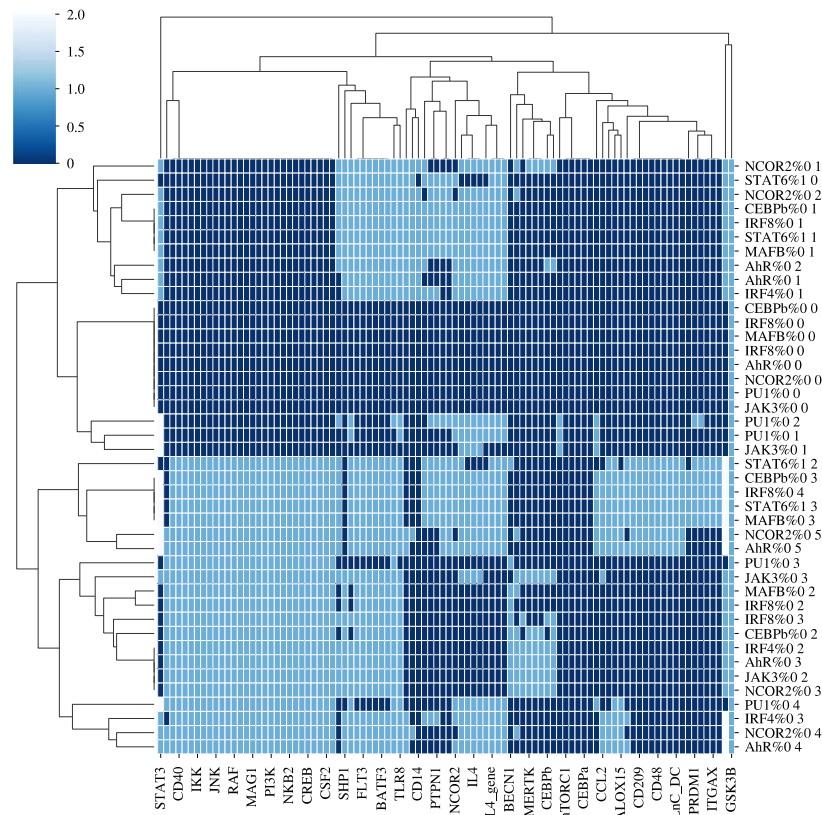


Figure 6. Clustered heatmap of the stable states obtained for all the perturbations considered. Each row represents one stable state for one perturbation. For example, ‘NCOR2%0 1’ denotes a knock-out of NCOR2 and corresponds to the first stable state obtained for this condition. Each column represents one of the 32 selected nodes of the logical model.

is required for moDCs differentiation; according to our model analysis, STAT6 is indeed required for moDC differentiation, but not for macrophage commitment (figure 6).

We were also able to predict novel TF targets that are relevant for this process, regulated by FOXO1, C/EBP α , AP1 and PRDM1. We predict that FOXO1 regulates at least six moDC genes, while C/EBP α could regulate at least seven of them. Furthermore, AP1 presumably regulates TLR4, DEC205 (LY75) and CD209 (DC-SING), which are associated with antigen-presenting cells. CREB1 is also presumably involved in the regulation of moDC genes, through the activation of CD141 and CD1A. We also predict for the first time that NR4A1 could regulate CD1C, a protein found at the surface of moDCs.

We further reviewed data recently published on the predicted TF-gene interaction considered in our model, and we found that some of these interactions have been recently experimentally confirmed. In particular, the regulation for the ITGAX gene was shown to be regulated by PU1 and IRF4 [29], as predicted by our epigenomic data analysis.

In summary, this study represents the first effort to integrate the current knowledge on monocytes to moDCs differentiation *in vitro* and should foster our understanding of this process.

Additionally, we unravelled novel transcriptional regulatory links presumably involved in this differentiation process.

4. Material and methods

4.1. Model implementation and simulations

Using the software GINsim [16], we integrated previously described signalling pathways activated when monocytes are cultured with CSF2 and IL4 (all the corresponding studies are referenced in the GINsim model as node annotations, and further listed in electronic supplementary material, table S3). We also reviewed the literature on the differentiation of monocytes into moDCs. The logical model was built using GINsim v. 3.0 [41], where nodes represent genes or proteins, and edges represent regulatory interactions between them, which can be negative or positive (or sometimes dual). In general, each node can take two values, zero or one, but in special cases, one may need to consider different qualitative levels of activation (e.g. STAT3 expression is activated by JAK1, but the presence of LnC-DC leads to a further increase of STAT3 expression). For such special cases, it is possible to use multilevel nodes, e.g. ternary variables enabling an additional level of activation (hence taking the values 0, 1 and 2). Logical rules are associated with each

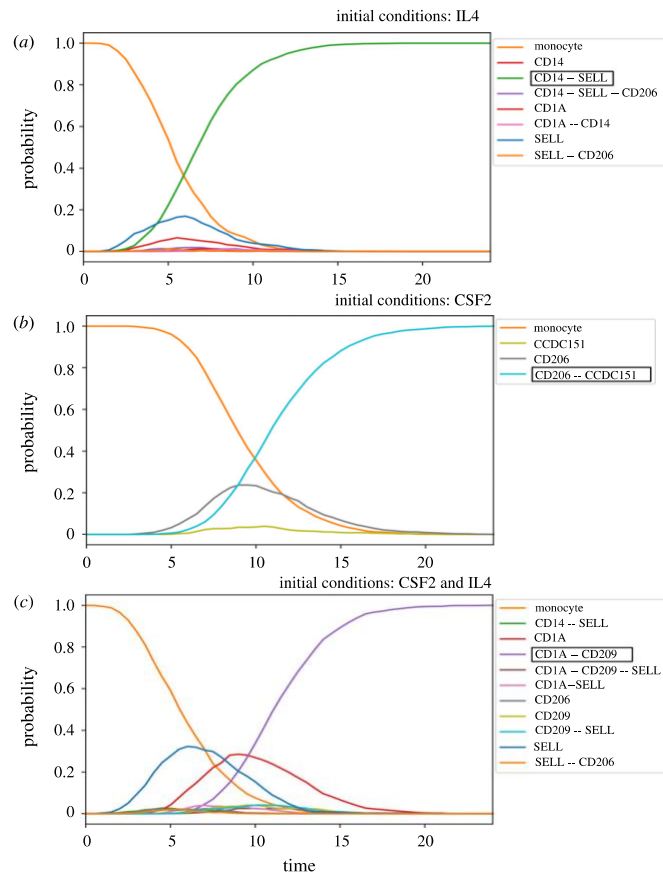


Figure 7. Probabilities of each combination of activated selected markers (among CD1A, CD14, CD206 CD209, SELL) (y-axis) over time (x-axis). Each curve represents mean values over 1000 stochastic simulations starting from a quiescent monocyte state (IRF8, FOS, AP1, CREB, ELK4 are ON, active): (a), (b) and (c) correspond to the scenarios where IL4, CSF2, and both CSF2 and IL4 are activated, each leading to one final activity pattern corresponding to stimulated monocytes, macrophages and moDCs, respectively.

component of the network, combining literals (i.e. regulatory variables with specific values) with the classical Boolean operators AND (&), OR (|) and NOT (!), thereby defining in which conditions each of these components can be activated or shut down. When considering novel predicted regulatory interactions, we started by setting a generic rule such which established that any activator component is sufficient to activate its target (OR), provided that all inhibitors are absent (AND, NOT). These rules were then refined to match the reported cell gene expression patterns.

4.2. ChIP-seq data analysis

Raw fastq files from ChIP-seq experiments were retrieved from the Blueprint Consortium [31] data access portal (<http://dcc.blueprint-epigenome.eu/#/datasets>) with dataset identifiers EGAD00001001552, EGAD00001002484, EGAD00001002485, EGAD00001001576 and EGAD00001002504. We processed datasets for six histone marks (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3, H3K9me3 and H3K27me3), in triplicates, from human monocytes, macrophages and moDCs. We performed quality control of read sequences with FastQC/0.11.3 tool [42], used Trimmomatic/0.33 [43] to improve their quality, and then

mapped them with bowtie 2-2.2.6 [44] to the human hg38 reference genome with default parameters (-sensitive -phred33). A second quality control was performed after alignment, using ENCODE QC (electronic supplementary material, table S4), which consists of three major tests: NRF (non-redundant fraction) > 0.5, PBC1 (PCR Bottleneck coefficient 1) > 0.5 and PBC2 (PCR Bottleneck coefficient 2) > 0.5 [45]. IDR analysis [45] was performed for replicate control with all replicates successfully passing this test.

4.3. Chromatin states definition

We used ChIP-seq data for six histone marks (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3, H3K9me3 and H3K27me3) for each cell type (monocytes, macrophages and moDCs), with their respective input control. Chromatin states were defined using ChromHMM [18] v. 1.12 [46] with the recommended parameters (BinarizeBed -b 200, assembly hg38), and specifying 10 hidden states for the hidden Markov model. Each chromatin state was annotated based on the probability of appearance of the different marks (e.g. H3K27ac-Enhancers, H3Kme1-Enhancers, H3K4me3-Promoters, H3K27me3-Repressive, H3K9me3-Repressive and H3K36me3-Transcribed [47]). We then assessed

the enrichment in different kinds of genome loci (CpGIsland, RefSeqExon, RefSeqGene, RefSeqTES, RefSeqTSS and RefSeq2kb) to the specific chromatin states. Integrating this information, we were able to assign a functional description to each state. Next, we focused on active TSS, repressed TSS, active gene/enhancer and poised regulation regions, based on RefSeqTSS annotations.

4.4. Search for transcription factor binding site using matrix-scan

Based on the literature, we identified 22 TFs participating in the differentiation of monocytes to macrophages or moDCs. We retrieved one Position-Specific Scoring Matrix (PSSM) for each of these 22 TFs (electronic supplementary material, table S5) from the JASPAR 2018 database human collection [19]. We performed pattern-matching searches for TF motif instances using the 22 PSSMs in the selected chromatin regulatory regions, active TSS, repressed TSS, active gene/enhancer and Poised regulation in the vicinity of the TSS annotated in RefSeqTSS (see ChromHMM analysis above). For this task, we used the tool *matrix-scan* [20] from the RSAT suite [23] with the following main parameters: background model of Markov order 1, and stringent thresholds of $p \leq 10^{-5}$, and score 1 (-markov 1 -lth score 1 -uth pval 1×10^{-5}). In order to assess our results regarding the number of predicted interactions discovered in figure 3a, we generated 100 groups of 20 randomly selected genes, selected their regulatory regions using ChromHMM, used *matrix-scan* (as described above) with the same collection of motifs and performed a hypergeometric test in the electronic supplementary material, figure S2.

4.5. RNA-seq analyses

Raw fastq files from RNA-seq experiments were retrieved from the Blueprint Consortium [40] data access portal (<http://dcc.blueprint-epigenome.eu/#/datasets>) with dataset identifiers: EGAD00001002308, EGAD00001001506, EGAD00001002526, EGAD00001002507 and EGAD00001001582. Blueprint monocytes samples were obtained from the same laboratory from healthy volunteers using positive selection, then the same samples were treated with CSF2 and IL4 for 6 days (monocyte purification: https://www.blueprint-epigenome.eu/UserFiles/File/Protocols/UCAM_BluePrint_Monocyte.pdf).

For this analysis, we used the methods described in Law *et al.* [48]. In brief, we performed quality control with FastQC/0.11.3 [49], pseudo-alignment and count determination with Kallisto 0.43.1 [50] using the release-90 from Ensembl (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-90/fasta/homo_sapiens/cdna/Homo_sapiens.GRCh38.cdna.all.fa.gz) to create our index with the following command: `kallisto index -i index_kallisto_hsap_90_cdna -make-unique Homo_sapiens.GRCh38.cdna.all.fa.gz`. Counts were assigned to genes using Tximport 1.14.0 [51] and were processed from raw-scale to counts per million (CPM), and then they were transformed to log-CPM. Genes with expression values below 1 were removed. Then we normalized raw library sizes using the *calcNormFactors* function from edgeR library in R. Afterwards, we performed a differential gene expression analysis with edgeR 3.28.0 [52]. Finally, we used heatmap.2 from the gplots library to plot the genes found in our model (figure 5).

References

1. Banchereau J, Steinman RM. 1998 Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252. (doi:10.1038/32588)
2. Segura E. 2016 Review of mouse and human dendritic cell subsets. *Methods Mol. Biol.* **1423**, 3–15. (doi:10.1007/978-1-4939-3606-9_1)
3. Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, Melero I, Krummel MF, Sancho D. 2019 Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat.*

4.6. Colomoto analysis

In order to foster reproducibility, we used the CoLoMoTo toolbox [18] that integrates several logical modelling tools, including GINsim, bioLQM, Pint and MaBoSS. We used GINsim to compute the stable states and bioLQM to identify trap-spaces approximating cyclic attractors. The computation of mean stochastic temporal trajectories was performed using MaBoSS [39]. The GINsim model and the CoLoMoTo notebook are available on the GINsim repository (<http://ginsim.org/model/monocytes-to-dc>), as well as a dedicated git repository (https://github.com/karenunez/moDC_model_differentiation). The results can be replicated with the CoLoMoTo Docker image following the instructions provided at <http://colomoto.org/notebook>.

4.7. Generation of the figures

Figure 1 and 4a were generated with the GINsim software. The plots in figures 2a, 3a,b and 4b were generated with the ggplot2 library from R. Figures 6 and 7 were extracted from the CoLoMoTo notebook developed for this study.

Data accessibility. Supplementary files, including the logical model of monocyte to DCs differentiation, are available at https://github.com/karenunez/moDC_model_differentiation.

Authors' contributions. K.J.N.R. carried out the manual literature curation, performed the CHIP-seq and RNA-seq data analysis, participated in the construction of the two model versions, notebook implementation, study design and drafted the manuscript; A.N. participated in the construction of the two model versions, notebook implementation and drafted the manuscript; A.S.J. participated in the manual curation of literature and drafted the manuscript; A.V.L.A. participated in the manual curation of literature, and drafted the manuscript; A.S. participated in the design of the study and drafted the manuscript; M.T.C. mentored the CHIP-seq, ChromHMM and *matrix-scan* analysis, participated in the design of the study and drafted the manuscript; D.T. participated in the construction of the two model versions, notebook implementation, study design and drafted the manuscript; A.M.R. mentored the CHIP-seq, ChromHMM and *matrix-scan* analysis, participated in the design of the study and drafted the manuscript.

Competing interests. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding. K.J.N.R. was supported received fellowship CVU/Becario: 634764/331823 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. This work was supported by CONACYT grant nos. 269449 and 1690; Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica–Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM) grant nos. IA206517-IA201119- and IA203021; and by a CONACYT FORDECYT-PRONACES grant no. [11311]. M.T.C., A.M.R., A.S. and D.T. further acknowledge SEP-CONACYT-ECOS-ANUIES (291235) support. M.T.C. is supported by the Institut Universitaire de France.

Acknowledgements. Karen Julia Nuñez Reza is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and was supported by a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico; CVU/Becario: 634764/331823). This work received support from Luis Aguilar, Alejandro León, and Jair García of the Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada. We thank Carina Uribe Díaz, and Alejandra Castillo Carbajal for their technical support. We want to thank Cei Abreu-Goodger, Claudine Liliane Irlles-Machuca, Marc Dalod, Thien Phong Vu Manh and Samuel Collombet for your valuable feedback on our model.

- Rev. Immunol.* **20**, 7–24. (doi:10.1038/s41577-019-0210-z)
4. Sallusto F, Lanzavecchia A. 1994 Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109–1118. (doi:10.1084/jem.179.4.1109)
 5. León B, López-Bravo M, Ardavin C. 2005 Monocyte-derived dendritic cells. *Semin. Immunol.* **17**, 313–318. (doi:10.1016/j.smim.2005.05.013)
 6. van de Laar L, Coffey PJ, Woltman AM. 2012 Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* **119**, 3383–3393. (doi:10.1182/blood-2011-11-370130)
 7. Vento-Tormo R *et al.* 2016 IL-4 orchestrates STAT6-mediated DNA demethylation leading to dendritic cell differentiation. *Genome Biol.* **17**, 1–18. (doi:10.1186/s13059-015-0863-z)
 8. Ranasinghe C, Trivedi S, Wijesundara DK, Jackson RJ. 2014 IL-4 and IL-13 receptors: Roles in immunity and powerful vaccine adjuvants. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 437–442. (doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.010)
 9. Sander J *et al.* 2017 Cellular differentiation of human monocytes is regulated by time-dependent interleukin-4 signaling and the transcriptional regulator NCOR2. *Cell Immunology* **47**, 1051–1066. (doi:10.1016/j.jimmuni.2017.11.024)
 10. Wang C, Ye Z, Kijlstra A, Zhou Y, Yang P. 2014 Activation of the aryl hydrocarbon receptor affects activation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* **177**, 521–530. (doi:10.1111/cei.12352)
 11. Goudot C *et al.* 2017 Aryl hydrocarbon receptor controls monocyte differentiation into dendritic cells versus macrophages. *Immunity* **47**, 582–596.e6. (doi:10.1016/j.jimmuni.2017.08.016)
 12. Le Novère N. 2015 Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 146–158. (doi:10.1038/nrg3885)
 13. Martínez-Méndez D, Villarreal C, Mendoza L, Huerta L. 2020 An integrative network modeling approach to T CD4 cell activation. *Front. Physiol.* **11**, 380. (doi:10.3389/fphys.2020.00380)
 14. Rodríguez-Jorge O *et al.* 2019 Cooperation between T cell receptor and toll-like receptor 5 signaling for CD4⁺ T cell activation. *Sci. Signal.* **12**, eaar3641. (doi:10.1126/scisignal.aar3641)
 15. Remy E, Rebouissou S, Chaouiya C, Zinovyev A, Radvanyi F, Calzone L. 2015 A modeling approach to explain mutually exclusive and co-occurring genetic alterations in bladder tumorigenesis. *Cancer Res.* **75**, 4042–4052. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0602)
 16. Naldi A, Hernandez C, Abou-Jaoudé W, Monteiro PT, Chaouiya C, Thieffry D. 2018 Logical modeling and analysis of cellular regulatory networks with GINsim 3.0. *Front. Physiol.* **9**, 1–16. (doi:10.3389/fphys.2018.00646)
 17. Collombet S, van Oevelen C, Ortega JL, Abou-Jaoudé W, Di Stefano B, Thomas-Chollier M, Graf T, Thieffry D. 2016 Logical modeling of lymphoid and myeloid cell specification and transdifferentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, 5792–5799. (doi:10.1073/pnas.1610622114)
 18. Naldi A *et al.* 2018 The CoLoMoTo interactive notebook: accessible and reproducible computational analyses for qualitative biological networks. *Front. Physiol.* **9**, 680. (doi:10.3389/fphys.2018.00680)
 19. Khan A *et al.* 2018 JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1284. (doi:10.1093/nar/gkx1188)
 20. Turatsinze J-V, Thomas-Chollier M, Defrance M, van Helden J. 2008 Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat. Protoc.* **3**, 1578. (doi:10.1038/nprot.2008.97)
 21. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010 Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–661. (doi:10.1126/science.1178331)
 22. Ernst J, Kellis M. 2012 ChromHMM: automating chromatin-state discovery and characterization. *Nat. Methods* **9**, 215–216. (doi:10.1038/nmeth.1906)
 23. Nguyen NTT *et al.* 2018 RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. *Nucleic Acids Res.* **46**, W209–W214. (doi:10.1093/nar/gky317)
 24. Radford KJ, Tullett KM, Lahoud MH. 2014 Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr. Opin Immunol.* **27**, 26–32. (doi:10.1016/j.coi.2014.01.005)
 25. Takeda Y, Azuma M, Funami K, Shime H, Matsumoto M, Seya T. 2018 Type I interferon-independent dendritic cell priming and antitumor t cell activation induced by a mycoplasma fermentans Lipopeptide. *Front. Immunol.* **9**, 496. (doi:10.3389/fimmu.2018.00496)
 26. Zarif JC, Hernandez JR, Verdona JE, Campbell SP, Charles G, Pienta KJ. 2016 A phased strategy to differentiate human CD14⁺ monocytes into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells. *Biotechniques* **61**, 33–41. (doi:10.2144/000114435)
 27. Tang-Huau T-L, Segura E. 2018 Human in vivo-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Seminars Cell Dev. Biol.* **86**, 44–49. (doi:10.1016/j.semdb.2018.02.018)
 28. Menetrier-Caux C, Thomachot MC, Alberti L, Montmain G, Blay JY. 2001 IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells. *Cancer Res.* **61**, 3096–3104.
 29. Yashiro T *et al.* 2017 The hematopoietic cell-specific transcription factor PU.1 is critical for expression of CD11c. *Int. Immunol.* **29**, 87–94. (doi:10.1093/intimm/dxx009)
 30. Aguilera-Montilla N *et al.* 2013 Aryl hydrocarbon receptor contributes to the MEK/ERK-dependent maintenance of the immature state of human dendritic cells. *Blood* **121**, e108–17. (doi:10.1182/blood-2012-07-445106)
 31. Feinberg MW *et al.* 2007 The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J.* **26**, 4138–4148. (doi:10.1038/sj.emboj.7601824)
 32. Cuevas VD *et al.* 2017 MAFB determines human macrophage anti-inflammatory polarization: relevance for the pathogenic mechanisms operating in multicentric carpal tunnel osteolysis. *J. Immunol.* **198**, 2070–2081. (doi:10.4049/jimmunol.1601667)
 33. McArdel SL, Terhorst C, Sharpe AH. 2016 Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin. Immunol.* **164**, 10–20. (doi:10.1016/j.clim.2016.01.008)
 34. Naldi A *et al.* 2015 Cooperative development of logical modelling standards and tools with CoLoMoTo. *Bioinformatics* **31**, 1154–1159. (doi:10.1093/bioinformatics/btv013)
 35. Naldi A. 2018 BioLQM: a Java toolkit for the manipulation and conversion of logical qualitative models of biological networks. *Front. Physiol.* **9**, 1605. (doi:10.3389/fphys.2018.01605)
 36. Bakri Y, Sarrazin S, Mayer UP, Tillmanns S, Nerlov C, Boned A, Sieweke MH. 2005 Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood* **105**, 2707–2716. (doi:10.1182/blood-2004-04-1448)
 37. Gutsch R, Kandemir JD, Pietsch D, Cappello C, Meyer J, Simanowski K, Huber R, Brand K. 2011 CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology. *J. Biol. Chem.* **286**, 22 716–22 729. (doi:10.1074/jbc.M110.152538)
 38. Paulevé L. 2017 Pint: a static analyzer for transient dynamics of qualitative networks with IPython interface. In *CMSB 2017 – 15th Conf. on Computational Methods for Systems Biology, Darmstadt, Germany*, pp. 309–316. New York, NY: Springer International Publishing. (doi:10.1007/978-3-319-67471-1_20)
 39. Stoll G, Caron B, Viara E, Dugourd A, Zinovyev A, Naldi A, Kroemer G, Barillot E, Wren J. 2017 MaBoSS 2.0: an environment for stochastic Boolean modeling. *Bioinformatics* **33**, 2226–2228. (doi:10.1093/bioinformatics/btx123)
 40. Stunnenberg HG *et al.* 2016 The international human epigenome consortium: a blueprint for scientific collaboration and discovery. *Cell* **167**, 1145–1149. (doi:10.1016/j.cell.2016.11.007)
 41. Gonzalez AG, Naldi A, Thieffry D, Chaouiya C. 2006 GINsim: a software suite for the qualitative modelling, simulation and analysis of regulatory networks. *Biosystems* **84**, 91–100. (doi:10.1016/j.biosystems.2005.10.003)
 42. Wingett SW, Andrews S. 2018 FastQ Screen: a tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res* **7**, 1338. (doi:10.12688/f1000research.15931.2)
 43. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014 Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120. (doi:10.1093/bioinformatics/btu170)
 44. Langdon WB. 2015 Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome

- comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min.* **8**, 1. (doi:10.1186/s13040-014-0034-0)
45. Landt S *et al.* 2012 ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome Res.* **22**, 1813–1831.
 46. Ernst J, Kellis M. 2017 Chromatin-state discovery and genome annotation with ChromHMM. *Nat. Protoc.* **12**, 2478–2492. (doi:10.1038/nprot.2017.124)
 47. Ernst J, Kellis M. 2010 Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat. Biotechnol.* **28**, 817–825. (doi:10.1038/nbt.1662)
 48. Law CW, Alhamdoosh M, Su S, Smyth GK, Ritchie ME. 2016 RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. *F1000Res* **5**, 1408. [cited 2019 Dec 11]. (doi:10.12688/f1000research.9005.2)
 49. Leggett RM, Ramirez-Gonzalez RH, Clavijo BJ, Waite D, Davey RP. 2013 Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. *Front. Genet.* **4**, 288. (doi:10.3389/fgene.2013.00288)
 50. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. 2016 Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **34**, 525–527. (doi:10.1038/nbt.3519)
 51. Sonesson C, Love MI, Robinson MD. 2016 Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* **4**, 1521. (doi:10.12688/f1000research.7563.2)
 52. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2009 edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140. (doi:10.1093/bioinformatics/btp616)

Análisis de propagación de valor en la suite de CoLoMoTo

Contexto

El modelo desarrollado sobre la diferenciación de monocitos a moDC y macrófagos tiene 98 nodos por lo cual analizarlo con métodos convencionales, como gráficas de transición jerárquicas, es complicado por el tiempo computacional para realizarlo. Se han desarrollado diversas herramientas para analizar el comportamiento de los modelos lógicos y para probarlos por medio de métodos especializados para eso. En esta sección analizamos el modelo que construimos de la diferenciación de los monocitos *in vitro* con un método llamado propagación de valor (*value propagation*), desarrollado por Hernandez, *et al* 2020. La propagación de valor permite el análisis computacional del impacto de una condición ambiental o genética específica y como afecta la dinámica de modelos complejos (Hernandez et al. 2020).

En el método de propagación de valor se fija el valor de nodos específicos (para determinar su impacto en el modelo) por lo que las reglas de los nodos subsecuentes se ven simplificadas y se consideran como constantes. Los valores se propagan hasta que no queden nodos por probar en el modelo. Nos permite conocer los cambios que ocurren con la fijación de cierto nodo de interés, nos muestra los elementos que se vuelven activos o inactivos en comparación con los nodos que parecen no ser afectados. Este análisis de método de propagación de valor facilita el cómputo de estados estables o estacionarios, al simplificar las reglas, al conservar los mismos estados estables.

Con el uso de la “propagación de valor” podemos comparar las vías de señalización que son activadas por cada uno de los receptores en nuestro modelo CSF2R e IL4R.

Métodos

En un esfuerzo por reunir en una sola plataforma diferentes herramientas para construir y analizar modelos lógicos se creó el consorcio CoLoMoTo y se desarrolló un notebook en *jupyter* que usa el lenguaje de programación de Python (Naldi, Hernandez, Levy, et al. 2018). Dentro de este notebook se han integrado nuevos análisis como es el caso de “*value propagation*”, el cual dado un arreglo de reglas lógicas y un contexto celular un algoritmo iterativo realiza el cómputo de las consecuencias dinámicas de todos los componentes del modelo.

Usamos el notebook que desarrollamos en el artículo “*Logical modeling of in vitro differentiation of human monocytes into dendritic cells unravels novel transcriptional regulatory interactions*”, definimos los valores para iniciar con la comprobación del modelo con el uso del módulo de *value propagation*. El notebook se encuentra en https://github.com/karenunez/moDC_model_differentiation y es posible visualizarlo sin ninguna instalación previa.

Resultados

Una vez que determinamos las funciones que colorean los nodos, visualizamos los nodos fijos que están en blanco (Figura 14).

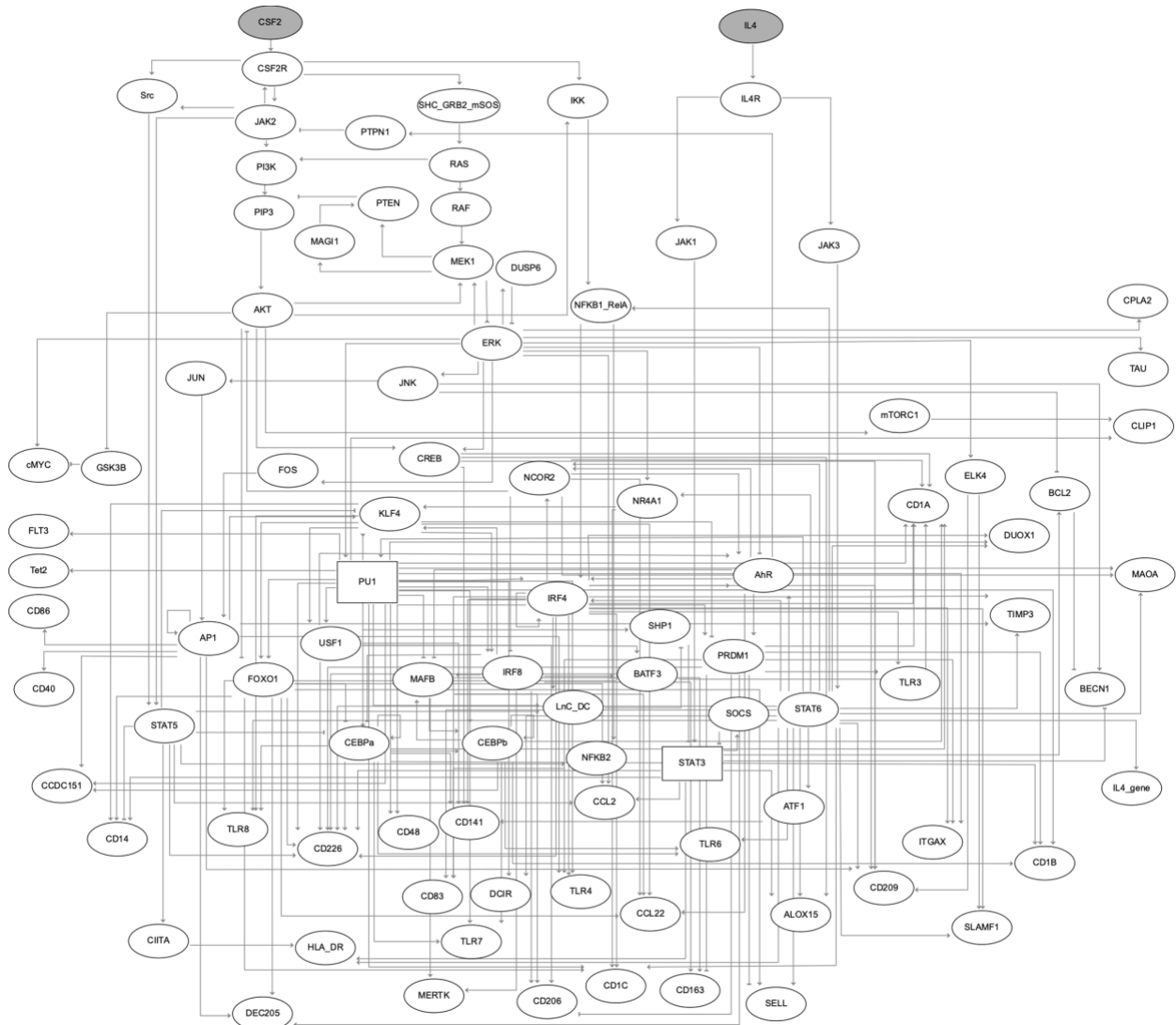


Figura 14. Estado inicial de los nodos sin ninguna restricción. Los nodos grises son las entradas del modelo (inputs), los nodos blancos representan los nodos fijos en condiciones iniciales.

Como prueba inicial fijamos el valor de CSF2R a cero y vimos cuáles eran los nodos que se apagaban o encendían en esta condición (Figura 15).

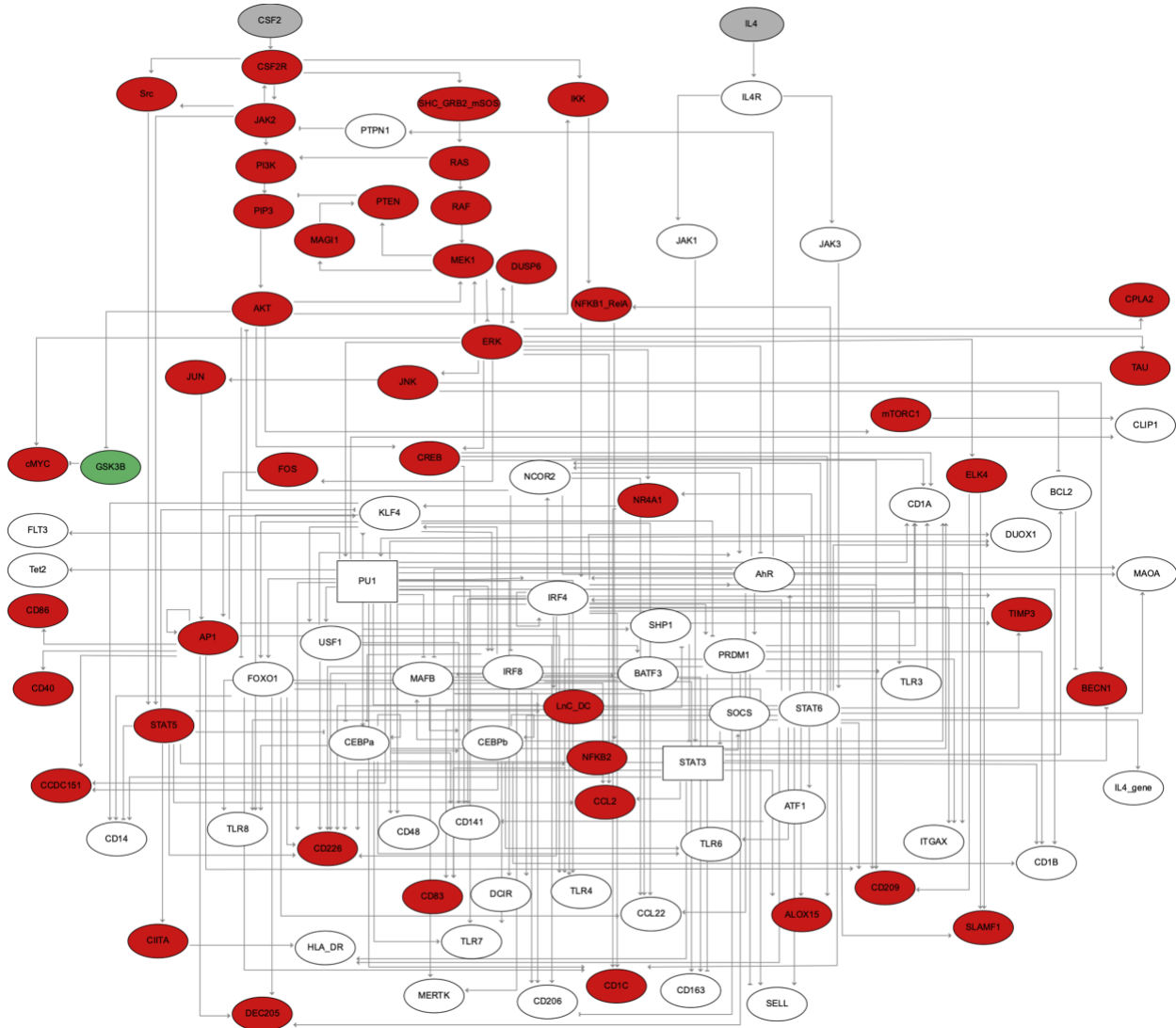


Figura 15. Comportamiento del modelo cuando CSF2R tiene un valor fijo de cero. Los nodos grises son las entradas (inputs), los nodos rojos son lo que adquieren un valor de cero bajo la condición estudiada, los nodos verdes tienen valor de 1 y los nodos blancos tienen un valor fijo.

Una vez que fijamos en valor de CSF2R a 1 obtenemos el siguiente comportamiento del modelo (Figura 16).

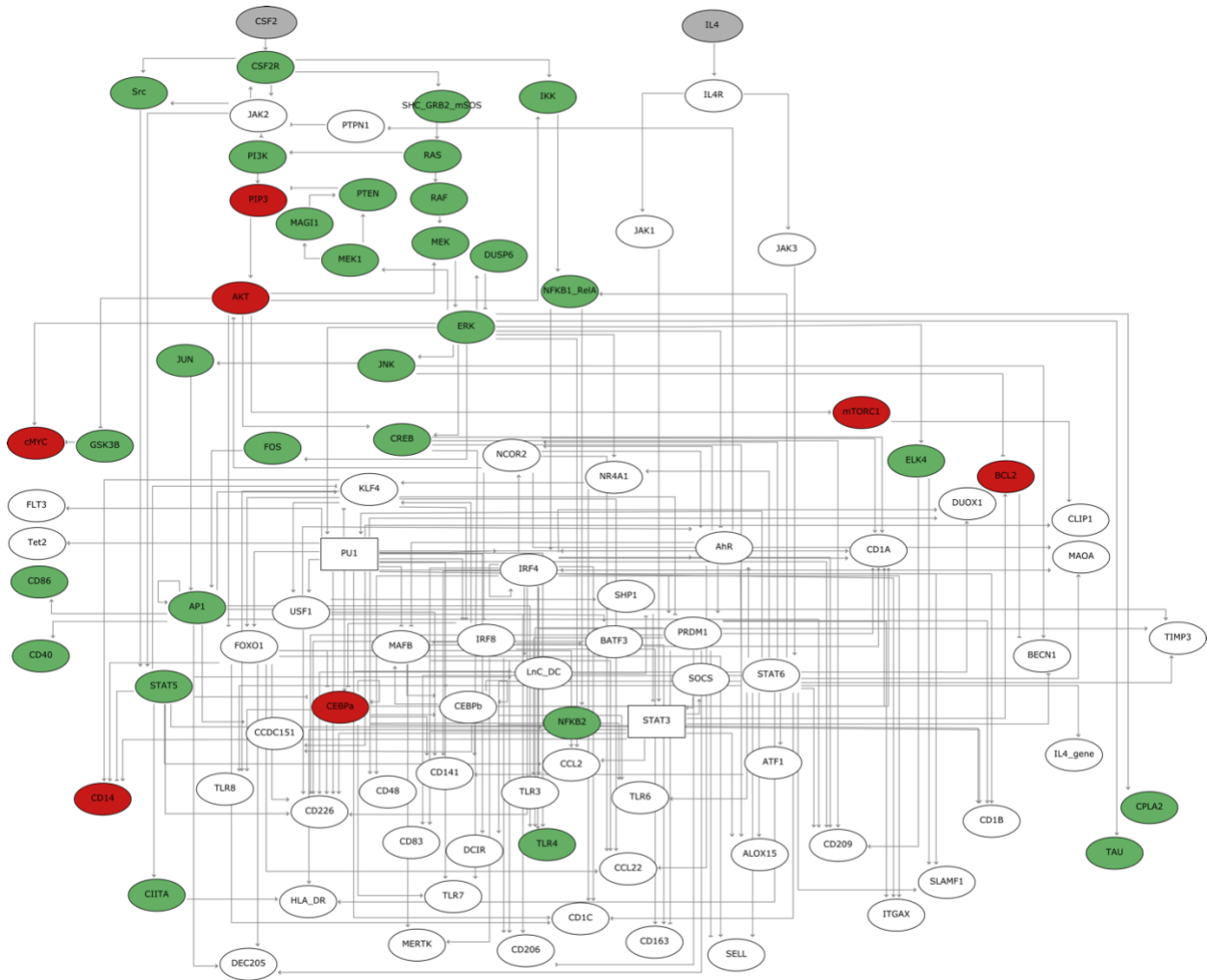


Figura 16. Comportamiento del modelo cuando CSF2R es fijado a uno. Una vez que CSF2R es fijado a uno observamos en verde los nodos que cambiaron de valor a 1 en verde y en rojo están los nodos que cambiaron su valor a cero. Como en las figuras anteriores las entradas son los nodos grises.

Realizamos el mismo procedimiento para el receptor de la interleucina 4, fijamos el valor de IL4R a cero, con el siguiente comportamiento (Figura 17).

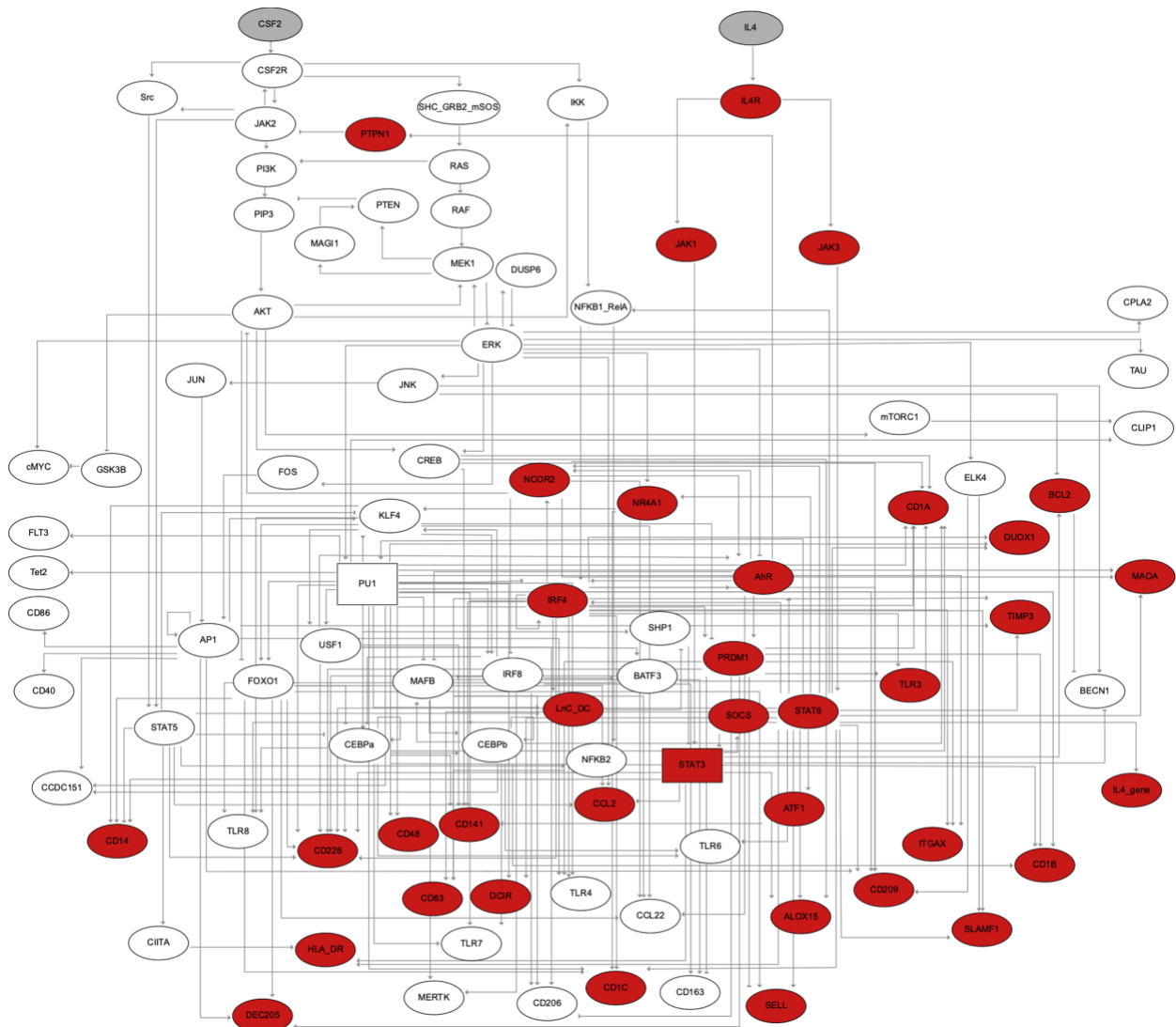


Figura 17. Comportamiento del modelo cuando IL4R es fijado a cero. En la imagen arriba vemos las entradas en nodos grises, los nodos rojos son los que cambiaron su valor a cero y en blanco están los nodos con valores que permaneces fijos.

Después fijamos el valor de IL4R a uno, con el siguiente comportamiento (Figura 18).

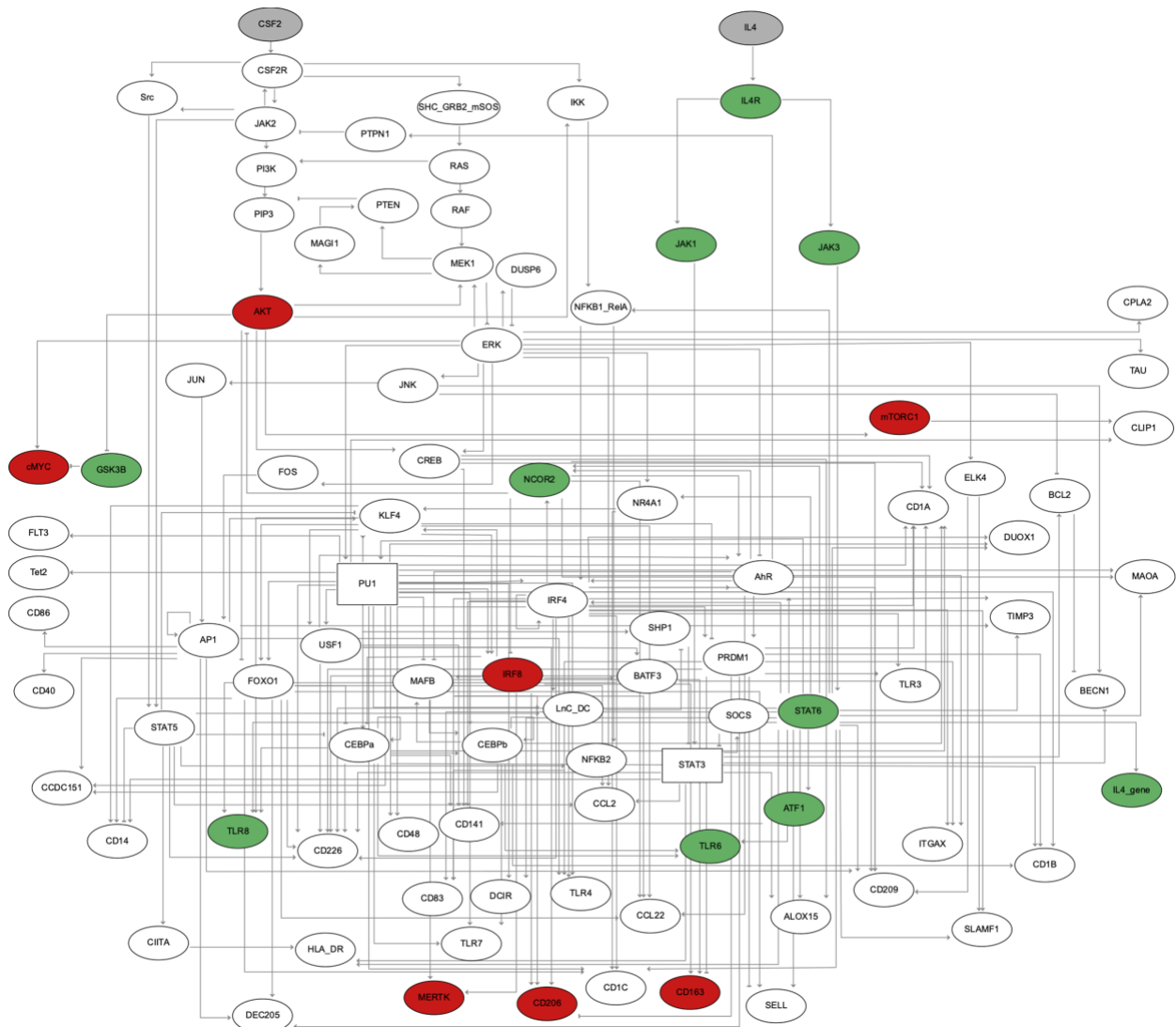


Figura 18. Comportamiento del modelo cuando el valor de IL4R es fijado a 1. Arriba en gris están los nodos que son las entradas del modelo, en verde tenemos los nodos que son encendidos y en rojo los nodos que pasaron a un valor de cero.

Por último, realizamos la comparación de las vías cuando fijamos los valores de ambos receptores a 1 (Figura 19).

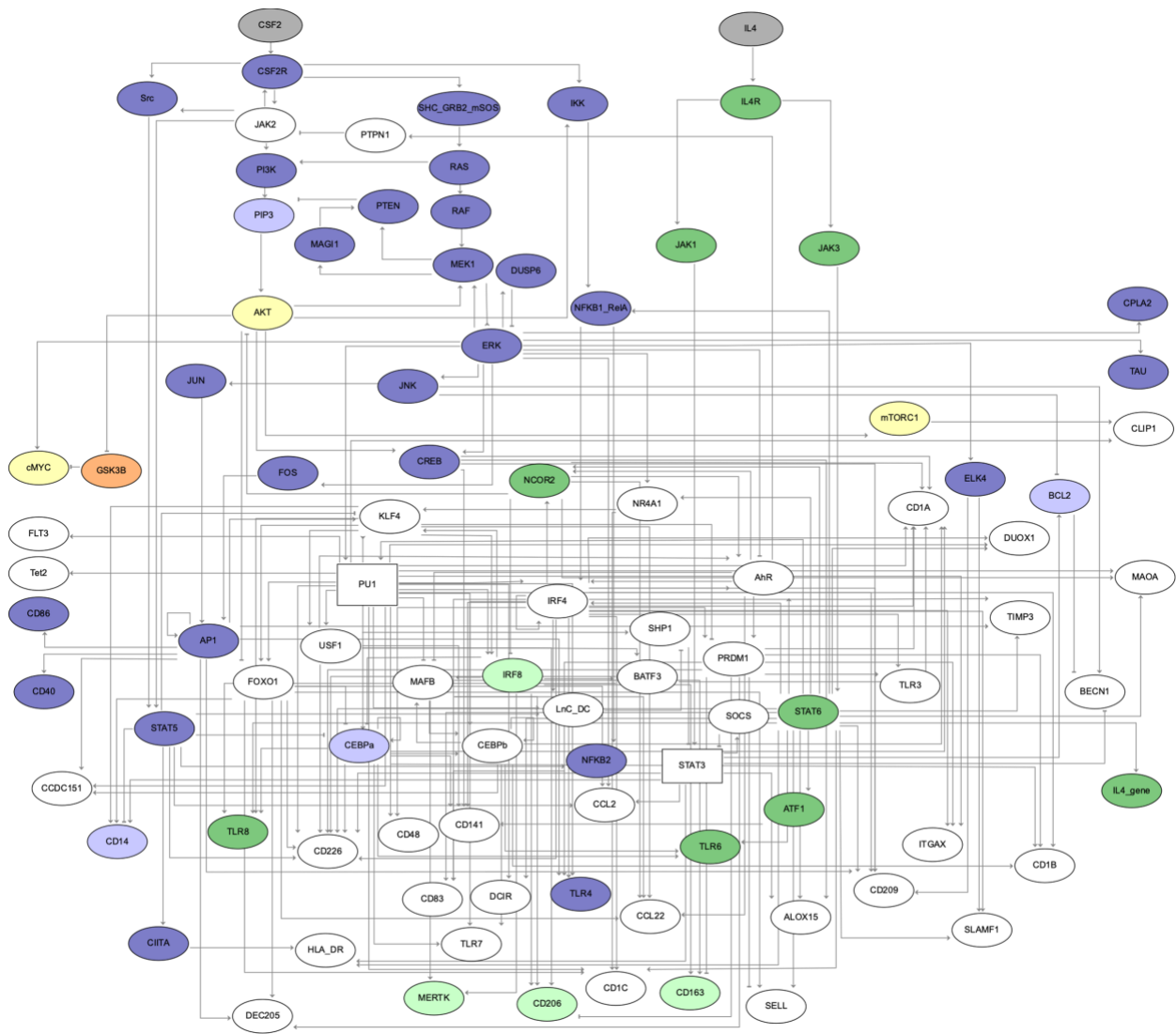


Figura 19. Comportamiento del modelo cuando fijamos los valores de ambos receptores, CSF2R e IRF4R, es fijado a 1. Los nodos amarillos están fijados a cero con CSF2R o IL4R activos, los nodos en naranja están fijados a uno con cualquier activación, los nodos en azul claro están fijados a cero solo con CSF2R activo, los nodos en azul oscuro están fijados a uno solo con CSF2R activo. Los nodos en verde claro están fijados a cero solo con IL4R activos, los nodos en verde oscuro están fijados a uno solo con IL4R activo. Los nodos en blanco permanecen libres en ambas condiciones.

Conclusiones

Los resultados obtenidos tras ejecutar el método *value propagation* permite observar detenidamente los nodos que son usados en cada uno de los estímulos los cuales difícilmente

pueden ser analizados tan detenidamente y de una forma tan rápida, computacionalmente hablando. Podemos concluir que mTORC1, cMYC, AKT y GSK3B no cambian independientemente del estímulo, pues presentaron actividad constitutiva. Correspondiente con la vía de CSF2 concluimos que los TF STAT5, AP1, CREB, JUN, FOS y NFkB permanecen activos cuando CSF2 esté activo independientemente de la actividad de IL4. TRL4 se encuentra activo cuando CSF2 está activo, independiente de la actividad de IL4 por lo tanto los tres tipos celulares expresaran el gen. Para el caso del comportamiento de los nodos cuando IL4 está activo concluimos que NCOR2 y STAT6 son los únicos TF que están activos. IRF4 y PU.1 son TF relevantes para la diferenciación a las moDC y no se encuentran activos en ninguna de las condiciones individuales lo que significa que es necesario la presencia de los dos estímulos para que la diferenciación a las moDC pueda realizarse.

Discusión global

La diferenciación de monocitos a moDC es un proceso que ocurre naturalmente en el cuerpo y que puede ser replicado en el laboratorio con expresión genética similar (Segura et al. 2013; Boltjes and van Wijk 2014). El objetivo de este trabajo fue tratar de entender el proceso de diferenciación en términos de la regulación genética, esto lo logramos al describir los cambios epigenéticos que suceden durante la diferenciación de monocitos a moDC o macrófagos.

La región de la cromatina llamada *enhancer* reprimido, que se caracteriza por tener marcas de activación y represión, esto facilita la respuesta inmune en células T (P. S. Lim et al. 2013), en nuestros resultados observamos esos cambios de *enhancer* reprimido a TSS activo en diferentes genes. Las regiones río arriba del TSS de los genes ALOX15, CD1A y CD141 en monocitos se clasificaron como *enhancer* reprimido, esta misma región pasa a TSS activo solo en moDC, ya son genes específicos de estas últimas (Hebenstreit et al. 2006). Esto concuerda con los resultados de expresión génica, en donde ALOX15, CD1A y CD141 se encuentran sobre-expresados solo en moDC, corroborando de esta manera el cambio del estado de la cromatina a través de la diferenciación de monocitos a moDC. Es posible hacer esta relación, ya que los monocitos iniciales y las moDC pertenecen al mismo donador en cada una de las réplicas biológicas.

IRF4 es otro ejemplo de un gen que pasa de *enhancer* reprimido en monocitos a TSS activo y que se sobre-expresa en moDC. Se sabe que IRF4 se sobre expresa durante la diferenciación a moDC, pero no se había descrito su papel sobre los genes que regula (Lehtonen et al. 2005). Con nuestros análisis encontramos que IRF4 probablemente esté regulando positivamente a una gran cantidad de genes (CD11c, CD141, CD1A, CD1B, CD1C, CD209, CD226, CD48, CD83, TLR3, 4 y 7, NCOR2) específicos de moDC. Mientras que en monocitos y macrófagos la región río arriba del TSS de IRF4 permanece como *enhancer* reprimido. Por lo tanto, el único tipo celular en donde está activo el gen IRF4 es en las moDC. Los cambios de un estado de represión a rápida activación también se conocen durante el proceso de maduración de las DC (Paul and Amit 2014).

De acuerdo a nuestros resultados de vías de señalización enriquecidas correspondiente a la vía de señalización activada por IL4 y CSF2 (Rutella et al. 2006), observamos que los genes específicos de moDC se encuentran sobre-expresados (CD1B, CD209, CCL22, IRF4, LY75, MAOA,

SLAMF1, entre otros) en moDC y sub-expresado en monocitos, esto nos permitió establecer los estados iniciales y finales de nuestro modelo de la diferenciación de monocitos a moDC y macrófagos.

La construcción de modelos lógicos permite describir y manipular un sistema desde formas sencillas hasta lo más complejo que necesitemos (Grieco et al. 2013; Collombet et al. 2016). En nuestro modelo lógico de la diferenciación de monocitos a moDC y macrófagos pudimos integrar los elementos de la regulación génica. Los cuales identificados con la búsqueda de sitios de unión a los TF en las regiones que catalogamos como de regulación. Dichas regiones pensamos están participando en el proceso de diferenciación y que es necesario comprobar experimentalmente.

En el caso de la regulación ejercida por IRF4 en el TSS del gen CD11c (ITGAX) fue corroborada en un estudio realizado por (Yashiro et al. 2017). Utilizando los datos de ChIP-seq de IRF4 en REMAP (Chèneby et al. 2020) en todos los tipos celulares disponibles pudimos encontrar 11 (CD11C, CD1B, CD1C, CD209, CD226, CD48, CD83, NCOR2, TLR3, 4 y 7) (Nuñez-Reza et al. 2021) de los 13 sitios encontrados con los datos de ChIP-seq de marcas de histonas provenientes del Blueprint (Stunnenberg et al. 2016). Lo cual refuerza la confianza de la regulación existente por IRF4 a estos genes, que aún debe ser probada experimentalmente.

Durante el análisis con *value propagation* NCOR2 es uno de los TF que se encuentra activo con ambos estímulos fijos. Esto es relevante, ya que cuando lo mutamos *in silico* en nuestro modelo existe una pérdida los marcadores de moDC. Concordando con lo descrito experimentalmente cuando se silenció NCOR2 en (Sander et al. 2017) donde observaron una sub-expresión de los genes relacionados con moDC.

STAT6 es otro de los TF que se mantiene encendido con ambos estímulos fijos y que cuando permanece encendido en las simulaciones no se alcanza el fenotipo de macrófagos, cambiando a un fenotipo muy parecido a las moDC. La activación de STAT6 impide la diferenciación hacia macrófagos, promoviendo la diferenciación a moDC (Vento-tormo et al. 2016).

El comprender mejor la regulación de la diferenciación de las moDC abre la puerta a nuevas líneas de investigación sobre las DC y su papel sobre la regulación de la respuesta inmune. No solo en condiciones de respuesta inflamatoria normal o en procesos de homeostasis, sino en procesos de salud-enfermedad. Nuestros resultados sobre la caracterización de los estados epigenéticos de las moDC puede ayudar a la mejora de terapias con agentes epigenéticos (Dunn and Rao 2017) y combinarlos con otro tipo de inmunoterapias para un mejor tratamiento.

Conclusión global

El estudio de la regulación génica en diferentes tipos celulares es de vital importancia para conocer el estado basal para poder compararlo con diversas patologías. Con la aproximación de caracterizar las regiones del genoma de acuerdo con su estado de la cromatina y enfocarnos en las regiones de regulación para la búsqueda de sitios de unión a TF, usada en este estudio, identificamos posibles nuevas regulaciones que participan en la diferenciación de monocitos a macrófagos y moDC.

La integración del conocimiento generado por científicos en todo el mundo y la complementación con datos genómicos provenientes de secuenciación masiva nos permitió construir un modelo lógico de la diferenciación de monocitos a macrófagos y moDC. Con el modelo lógico construido en este estudio identificamos nuevas posibles regulaciones de TF sobre genes específicos para la diferenciación. En el laboratorio ahora contamos con los protocolos establecidos para el cultivo celular, así como para la obtención de cromatina fragmentada para la realización de ensayos de ChIP-seq.

El modelo lógico es una herramienta que ayudará a la planeación de experimentos para corroborar las nuevas interacciones propuestas. De la misma forma el modelo construido, sienta las bases para el estudio integral del funcionamiento de las moDC, ya que juegan un papel primordial en la respuesta inmune. Recientemente las DC han cobrado relevancia para su uso en el tratamiento de cáncer, así como de enfermedades autoinmunes. Nuestro modelo puede ser tomado total o parcialmente para complementarlo con el sistema que se estudie, tenemos en él estados estables que corresponden a monocitos, macrófagos y moDC. Lo cual abre la posibilidad de estudiar también a los monocitos y a los macrófagos.

Bibliografía

- Abou-Jaoudé, Wassim, Pedro T. Monteiro, Aurélien Naldi, Maximilien Grandclaoudon, Vassili Soumelis, Claudine Chaouiya, and Denis Thieffry. 2015. “Model Checking to Assess T-Helper Cell Plasticity.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2 (January): 86.
- Abou-jaoudé, Wassim, Pauline Traynard, Pedro T. Monteiro, Julio Saez Rodriguez, Tomáš Helikar, Denis Thieffry, and Claudine Chaouiya. 2016. “Logical Modeling and Dynamical Analysis of Cellular Networks.” *Frontiers in Genetics* 7 (May): 1–20.
- Al Aboud, Nora M., Connor Tupper, and Ishwarlal Jialal. 2020. “Genetics, Epigenetic Mechanism.” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Bae, Sunhee, and Bluma J. Lesch. 2020. “H3K4me1 Distribution Predicts Transcription State and Poising at Promoters.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (May): 289.
- Bailey, Timothy, Pawel Krajewski, Istvan Ladunga, Celine Lefebvre, Qunhua Li, Tao Liu, Pedro Madrigal, Cenny Taslim, and Jie Zhang. 2013. “Practical Guidelines for the Comprehensive Analysis of ChIP-Seq Data.” *PLoS Computational Biology* 9 (11): 5–12.
- Bakri, Youssef, Sandrine Sarrazin, Ulrich P. Mayer, Silke Tillmanns, Claus Nerlov, Annie Boned, and Michael H. Sieweke. 2005. “Balance of MafB and PU.1 Specifies Alternative Macrophage or Dendritic Cell Fate.” *Blood* 105 (7): 2707–16.
- Bray, Nicolas L., Harold Pimentel, Páll Melsted, and Lior Pachter. 2016. “Near-Optimal Probabilistic RNA-Seq Quantification.” *Nature Biotechnology* 34 (5): 525–27.
- Briseño, Carlos G., Malay Haldar, Nicole M. Kretzer, Xiaodi Wu, Derek J. Theisen, K. C. Wumesh, Vivek Durai, Gary E. Grajales-reyes, Arifumi Iwata, and Prachi Bagadia. 2016. “Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical- and Monocyte-Derived Dendritic Cells” 15 (11): 2462–74.
- Chantalat, Sophie, Arnaud Depaux, Patrick Héry, Sophie Barral, Jean-Yves Thuret, Stefan Dimitrov, and Matthieu Gérard. 2011. “Histone H3 Trimethylation at Lysine 36 Is Associated with Constitutive and Facultative Heterochromatin.” *Genome Research* 21 (9): 1426–37.
- Collombet, Samuel, Chris Van Oevelen, Jose Luis, Sardina Ortega, Wassim Abou-jaoudé, and Bruno Di. 2016. “Logical Modeling of Lymphoid and Myeloid Cell Specification and Transdifferentiation.” <https://doi.org/10.1073/pnas.1610622114>.
- De Bleser, Pieter, Bart Hooghe, Dominique Vlieghe, and Frans van Roy. 2007. “A Distance Difference Matrix Approach to Identifying Transcription Factors That Regulate Differential Gene Expression.” *Genome Biology* 8 (5): R83.
- Ernst, Jason, and Manolis Kellis. 2012. “ChromHMM: Automating Chromatin-State Discovery and Characterization.” *Nature Methods* 9 (3): 215–16.
- Garber, Manuel, Nir Yosef, Alon Goren, Raktima Raychowdhury, Anne Thielke, Mitchell Guttman, James Robinson, et al. 2012. “A High-Throughput Chromatin Immunoprecipitation Approach Reveals Principles of Dynamic Gene Regulation in Mammals.” *Molecular Cell* 47 (5): 810–22.

- Goudot, Christel, Alice Coillard, Alexandra Chloé Villani, Paul Gueguen, Adeline Cros, Siranush Sarkizova, Tsing Lee Tang-Huau, et al. 2017. “Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages.” *Immunity* 47 (3): 582-596.e6.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. “Cross-Presentation in Viral Immunity and Self-Tolerance.” *Nature Reviews. Immunology* 1 (November): 126–34.
- Hernandez, Céline, Morgane Thomas-Chollier, Aurélien Naldi, and Denis Thieffry. 2020. “Computational Verification of Large Logical Models-Application to the Prediction of T Cell Response to Checkpoint Inhibitors.” *Frontiers in Physiology* 11 (September): 558606.
- Hordyjewska, Anna, Łukasz Popiołek, and Anna Horecka. 2015. “Characteristics of Hematopoietic Stem Cells of Umbilical Cord Blood.” *Cytotechnology* 67 (3): 387–96.
- Hsu, Amy T., Tanya J. Lupancu, Ming-Chin Lee, Andrew J. Fleetwood, Andrew D. Cook, John A. Hamilton, and Adrian Achuthan. 2018. “Epigenetic and Transcriptional Regulation of IL4-Induced CCL17 Production in Human Monocytes and Murine Macrophages.” *The Journal of Biological Chemistry* 293 (29): 11415–23.
- Kantoff, Philip W., Celestia Higano, Neal Shore, Roy Berger, Eric Small, David Person, Charles Redfern, et al. 2010. “Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 356 (5): 2301–3.
- Karlebach, Guy, and Ron Shamir. 2008. “Modelling and Analysis of Gene Regulatory Networks.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (10): 770–80.
- Khan, Aziz, Oriol Fornes, Arnaud Stigliani, Marius Gheorghe, Jaime A. Castro-Mondragon, Robin van der Lee, Adrien Bessy, et al. 2018. “JASPAR 2018: Update of the Open-Access Database of Transcription Factor Binding Profiles and Its Web Framework.” *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D1284.
- Kimura, Hiroshi. 2013. “Histone Modifications for Human Epigenome Analysis.” *Journal of Human Genetics* 58 (7): 439–45.
- Kitano, Hiroaki. 2002. “Systems Biology: A Brief Overview.” *Science (New York, N.Y.)* 295 (5560): 1662–64.
- Laar, Lianne van de, Paul J. Coffey, and Andrea M. Woltman. 2012. “Regulation of Dendritic Cell Development by GM-CSF: Molecular Control and Implications for Immune Homeostasis and Therapy.” *Blood* 119 (15): 3383–93.
- Lapko, Natalia, Mateusz Zawadka, Jacek Polosak, George S. Worthen, Gwenn Danet-Desnoyers, Monika Puzianowska-Kuźnicka, and Krzysztof Laudanski. 2017. “Long-Term Monocyte Dysfunction after Sepsis in Humanized Mice Is Related to Persisted Activation of Macrophage-Colony Stimulation Factor (M-CSF) and Demethylation of PU.1, and It Can Be Reversed by Blocking M-CSF In Vitro or by Transplanting Naïve Autologous Stem Cells In Vivo.” *Frontiers in Immunology* 8 (May): 401.

- Law, Charity W., Monther Alhamdoosh, Shian Su, Gordon K. Smyth, and Matthew E. Ritchie. 2016. "RNA-Seq Analysis Is Easy as 1-2-3 with Limma, Glimma and EdgeR." *F1000Research* 5 (1408): 1408.
- Lehtonen, Anne, Ville Veckman, Tuomas Nikula, Riitta Lahesmaa, Leena Kinnunen, Sampsa Matikainen, and Ilkka Julkunen. 2005. "Differential Expression of IFN Regulatory Factor 4 Gene in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and Macrophages." *Journal of Immunology* 175 (10): 6570–79.
- Li, Weilong, Dongzhou Liu, Fengping Zheng, Zhipeng Zeng, Wanxia Cai, Shaodong Luan, Xiaoping Hong, Donge Tang, Liang-Hong Yin, and Yong Dai. 2021. "Generation of Systemic Lupus Erythematosus Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells from Blood." *Stem Cells and Development* 30 (5): 227–33.
- Lim, Aeran, Sangsoo Lim, and Sun Kim. 2019. "Enhancer Prediction with Histone Modification Marks Using a Hybrid Neural Network Model." *Methods (San Diego, Calif.)* 166 (August): 48–56.
- Maston, Glenn A., Sara K. Evans, and Michael R. Green. 2006. "Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7 (1): 29–59.
- Moore, David F., Hong Li, Neal Jeffries, Violet Wright, Ronald A. Cooper Jr, Abdel Elkahoun, Monique P. Gelderman, et al. 2005. "Using Peripheral Blood Mononuclear Cells to Determine a Gene Expression Profile of Acute Ischemic Stroke: A Pilot Investigation." *Circulation* 111 (2): 212–21.
- Moore, Jill E., Michael J. Purcaro, Henry E. Pratt, Charles B. Epstein, Noam Shores, Jessika Adrian, Trupti Kawli, et al. 2020. "Expanded Encyclopaedias of DNA Elements in the Human and Mouse Genomes." *Nature* 583 (7818): 699–710.
- Naldi, Aurélien, Céline Hernandez, Wassim Abou-Jaoudé, Pedro T. Monteiro, Claudine Chaouiya, and Denis Thieffry. 2018. "Logical Modeling and Analysis of Cellular Regulatory Networks With GINsim 3.0." *Frontiers in Physiology* 9 (June): 1–16.
- Naldi, Aurélien, Céline Hernandez, Nicolas Levy, Gautier Stoll, Pedro T. Monteiro, Claudine Chaouiya, Tomáš Helikar, et al. 2018. "The CoLoMoTo Interactive Notebook: Accessible and Reproducible Computational Analyses for Qualitative Biological Networks." *Frontiers in Physiology* 9 (June): 680.
- Park, Peter J. 2009. "ChIP-Seq: Advantages and Challenges of a Maturing Technology." *Nature Reviews. Genetics* 10 (10): 669–80.
- Radford, Kristen J., Kirsteen M. Tullett, and Mireille H. Lahoud. 2014. "Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy." *Current Opinion in Immunology* 27 (1): 26–32.
- Ramírez, Carlos, and Luis Mendoza. 2018. "Phenotypic Stability and Plasticity in GMP-Derived Cells as Determined by Their Underlying Regulatory Network." *Bioinformatics* 34 (7): 1174–82.

- Ranasinghe, Charani, Shubhanshi Trivedi, Danushka K. Wijesundara, and Ronald J. Jackson. 2014. “IL-4 and IL-13 Receptors: Roles in Immunity and Powerful Vaccine Adjuvants.” *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25 (4): 437–42.
- Randolph, Gwendalyn J., Claudia Jakubzick, and Chunfeng Qu. 2009. “Antigen Presentation by Monocytes and Monocyte-Derived Cells.” *Current Opinion in Immunology* 20 (1): 52–60.
- Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, and Gordon K. Smyth. 2009. “EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data.” *Bioinformatics* 26 (1): 139–40.
- Rodríguez-Jorge, Otoniel, Linda A. Kempis-Calanis, Wassim Abou-Jaoudé, Darelly Y. Gutiérrez-Reyna, Céline Hernandez, Oscar Ramirez-Pliego, Morgane Thomas-Chollier, Salvatore Spicuglia, Maria A. Santana, and Denis Thieffry. 2019. “Cooperation between T Cell Receptor and Toll-like Receptor 5 Signaling for CD4+ T Cell Activation.” *Science Signaling* 12 (577). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar3641>.
- Sallusto, F., and Antonio Lanzavecchia. 1994. “Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor Alpha.” *The Journal of Experimental Medicine* 179 (4): 1109–18.
- Sander, Jil, Susanne V. Schmidt, Branko Cirovic, Naomi McGovern, Olympia Papantonopoulou, Anna-Lena Hardt, Anna C. Aschenbrenner, et al. 2017. “Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2.” *Cell Immunity* 47: 1051–66.
- Saxena, Mansi, and Nina Bhardwaj. 2018. “Re-Emergence of Dendritic Cell Vaccines for Cancer Treatment.” *Trends in Cancer* 4 (2): 119–37.
- Schraml, Barbara U., and Caetano Reis. 2015. “Defining Dendritic Cells.” *Current Opinion in Immunology* 32: 13–20.
- Schwab, Julian D., Silke D. Kühlwein, Nensi Ikonomi, Michael Köhl, and Hans A. Kestler. 2020. “Concepts in Boolean Network Modeling: What Do They All Mean?” *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18 (March): 571–82.
- Segura, Elodie, and Sebastian Amigorena. 2013. “Inflammatory Dendritic Cells in Mice and Humans” 34 (9): 9–14.
- Segura, Elodie, Maxime Touzot, Armelle Bohineust, Antonio Cappuccio, Gilles Chiochia, Anne Hosmalin, Marc Dalod, Vassili Soumelis, and Sebastian Amigorena. 2013. “Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation.” *Immunity* 38 (2): 336–48.
- Sen, Partho, Esko Kemppainen, and Matej Orešič. 2018. “Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells.” *Frontiers in Molecular Biosciences* 4 (January). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00096>.

- Soneson, Charlotte, Michael I. Love, and Mark D. Robinson. 2016. "Differential Analyses for RNA-Seq: Transcript-Level Estimates Improve Gene-Level Inferences." *F1000Research* 4 (2): 1521.
- Sprangers, Sara, Teun J. de Vries, and Vincent Everts. 2016. "Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells." *Journal of Immunology Research* 2016 (July): 1475435.
- Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. "Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 137: 1142–62.
- Stunnenberg, Hendrik G., Sergio Abrignani, David Adams, Melanie de Almeida, Lucia Altucci, Viren Amin, Ido Amit, et al. 2016. "The International Human Epigenome Consortium: A Blueprint for Scientific Collaboration and Discovery." *Cell* 167 (5): 1145–49.
- Su, Shian, Charity W. Law, Casey Ah-Cann, Marie-Liesse Asselin-Labat, Marnie E. Blewitt, and Matthew E. Ritchie. 2017. "Glimma: Interactive Graphics for Gene Expression Analysis." *Bioinformatics (Oxford, England)* 33 (13): 2050–52.
- Tang-Huau, Tsing-Lee, and Elodie Segura. 2018. "Human in Vivo-Differentiated Monocyte-Derived Dendritic Cells." *Seminars in Cell and Developmental Biology* YSCDB-2528. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.02.018>.
- Terfve, Camille, and Julio Saez-Rodriguez. 2012. "Modeling Signaling Networks Using High-Throughput Phospho-Proteomics." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 736: 19–57.
- Thomas-Chollier, Morgane, Carl Herrmann, Matthieu Defrance, Olivier Sand, Denis Thieffry, and Jacques Van Helden. 2012. "RSAT Peak-Motifs: Motif Analysis in Full-Size ChIP-Seq Datasets." *Nucleic Acids Research* 40 (4). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1104>.
- Trewavas, Anthony. 2006. "A Brief History of Systems Biology. 'Every Object That Biology Studies Is a System of Systems.' Francois Jacob (1974)." *The Plant Cell* 18 (10): 2420–30.
- Turatsinze, Jean-Valery, Morgane Thomas-Chollier, Matthieu Defrance, and Jacques van Helden. 2008. "Using RSAT to Scan Genome Sequences for Transcription Factor Binding Sites and Cis-Regulatory Modules." *Nature Protocols* 3 (September): 1578.
- Ul-haq, Zaheer, Sehrish Naz, and M. Ahmed Mesaik. 2016. "Interleukin-4 Receptor Signaling and Its Binding Mechanism : A Therapeutic Insight from Inhibitors Tool Box." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 32: 3–15.
- Vaquerizas, Juan M., Sarah K. Kummerfeld, Sarah A. Teichmann, and Nicholas M. Luscombe. 2009. "A Census of Human Transcription Factors: Function, Expression and Evolution." *Nature Reviews. Genetics* 10 (4): 252–63.
- Vento-tormo, Roser, Carlos Company, Javier Rodríguez-ubreva, Lorenzo De Rica, José M. Urquiza, Biola M. Javierre, Radhakrishnan Sabarinathan, et al. 2016. "IL-4 Orchestrates STAT6-Mediated DNA Demethylation Leading to Dendritic Cell Differentiation," 1–18.
- Villar, Javiera, and Elodie Segura. 2020. "Recent Advances towards Deciphering Human Dendritic Cell Development." *Molecular Immunology* 122 (April): 109–15.

- Wittkopp, Patricia J., and Gizem Kalay. 2011. "Cis-Regulatory Elements: Molecular Mechanisms and Evolutionary Processes Underlying Divergence." *Nature Reviews. Genetics* 13 (1): 59–69.
- Xie, Xiaowei, Xuelian Cheng, Gaoxiang Wang, Biao Zhang, Mengyao Liu, Liting Chen, Hui Cheng, et al. 2021. "Single-Cell Transcriptomes of Peripheral Blood Cells Indicate and Elucidate Severity of COVID-19." *Science China. Life Sciences*, February. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1880-y>.
- Zhang, Min, and Bing Huang. 2012. "The Multi-Differentiation Potential of Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Stem Cell Research & Therapy* 3 (6): 48.

Anexo 1. Referencias usadas para la construcción del modelo.

- Abou-Jaoudé, Wassim, Pedro T. Monteiro, Aurélien Naldi, Maximilien Grandclaoudon, Vassili Soumelis, Claudine Chaouiya, and Denis Thieffry. 2015. “Model Checking to Assess T-Helper Cell Plasticity.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2 (January): 86.
- Abou-jaoudé, Wassim, Pauline Traynard, Pedro T. Monteiro, Julio Saez Rodriguez, Tomáš Helikar, Denis Thieffry, and Claudine Chaouiya. 2016. “Logical Modeling and Dynamical Analysis of Cellular Networks.” *Frontiers in Genetics* 7 (May): 1–20.
- Al Aboud, Nora M., Connor Tupper, and Ishwarlal Jialal. 2020. “Genetics, Epigenetic Mechanism.” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Bae, Sunhee, and Bluma J. Lesch. 2020. “H3K4me1 Distribution Predicts Transcription State and Poising at Promoters.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (May): 289.
- Bailey, Timothy, Pawel Krajewski, Istvan Ladunga, Celine Lefebvre, Qunhua Li, Tao Liu, Pedro Madrigal, Cenny Taslim, and Jie Zhang. 2013. “Practical Guidelines for the Comprehensive Analysis of CHIP-Seq Data.” *PLoS Computational Biology* 9 (11): 5–12.
- Bakri, Youssef, Sandrine Sarrazin, Ulrich P. Mayer, Silke Tillmanns, Claus Nerlov, Annie Boned, and Michael H. Sieweke. 2005. “Balance of MafB and PU.1 Specifies Alternative Macrophage or Dendritic Cell Fate.” *Blood* 105 (7): 2707–16.
- Boltjes, Arjan, and Femke van Wijk. 2014. “Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation.” *Frontiers in Immunology* 5 (April): 131.
- Bray, Nicolas L., Harold Pimentel, Páll Melsted, and Lior Pachter. 2016. “Near-Optimal Probabilistic RNA-Seq Quantification.” *Nature Biotechnology* 34 (5): 525–27.
- Briseño, Carlos G., Malay Haldar, Nicole M. Kretzer, Xiaodi Wu, Derek J. Theisen, K. C. Wumesh, Vivek Durai, Gary E. Grajales-reyes, Arifumi Iwata, and Prachi Bagadia. 2016. “Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical- and Monocyte-Derived Dendritic Cells” 15 (11): 2462–74.
- Chantalat, Sophie, Arnaud Depaux, Patrick Héry, Sophie Barral, Jean-Yves Thuret, Stefan Dimitrov, and Matthieu Gérard. 2011. “Histone H3 Trimethylation at Lysine 36 Is Associated with Constitutive and Facultative Heterochromatin.” *Genome Research* 21 (9): 1426–37.
- Chèneby, Jeanne, Zacharie Ménétrier, Martin Mestdagh, Thomas Rosnet, Allyssa Douida, Wassim Rhalloussi, Aurélie Bergon, Fabrice Lopez, and Benoit Ballester. 2020. “ReMap 2020: A Database of Regulatory Regions from an Integrative Analysis of Human and Arabidopsis DNA-Binding Sequencing Experiments.” *Nucleic Acids Research* 48 (D1): D180–88.
- Collombet, Samuel, Chris Van Oevelen, Jose Luis, Sardina Ortega, Wassim Abou-jaoudé, and Bruno Di. 2016. “Logical Modeling of Lymphoid and Myeloid Cell Specification and Transdifferentiation.” <https://doi.org/10.1073/pnas.1610622114>.
- Consortium, Roadmap Epigenomics, Anshul Kundaje, Wouter Meuleman, Jason Ernst, Misha Bilenky, Angela Yen, Alireza Heravi-Moussavi, et al. 2015. “Integrative Analysis of 111 Reference Human Epigenomes.” *Nature* 518 (7539): 317–30.
- De Bleser, Pieter, Bart Hooghe, Dominique Vlieghe, and Frans van Roy. 2007. “A Distance Difference Matrix Approach to Identifying Transcription Factors That Regulate Differential Gene Expression.” *Genome Biology* 8 (5): R83.
- Dunn, Jennifer, and Sudha Rao. 2017. “Epigenetics and Immunotherapy: The Current State of Play.” *Molecular Immunology* 87 (April): 227–39.

- ENCODE Project Consortium. 2012. “An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome.” *Nature* 489 (7414): 57–74.
- Ernst, Jason, and Manolis Kellis. 2012. “ChromHMM: Automating Chromatin-State Discovery and Characterization.” *Nature Methods* 9 (3): 215–16.
- Garber, Manuel, Nir Yosef, Alon Goren, Raktima Raychowdhury, Anne Thielke, Mitchell Guttman, James Robinson, et al. 2012. “A High-Throughput Chromatin Immunoprecipitation Approach Reveals Principles of Dynamic Gene Regulation in Mammals.” *Molecular Cell* 47 (5): 810–22.
- Goudot, Christel, Alice Coillard, Alexandra Chloé Villani, Paul Gueguen, Adeline Cros, Siranush Sarkizova, Tsing Lee Tang-Huau, et al. 2017. “Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages.” *Immunity* 47 (3): 582-596.e6.
- Grieco, Luca, Laurence Calzone, Isabelle Bernard-Pierrot, François Radvanyi, Brigitte Kahn-Perlès, and Denis Thieffry. 2013. “Integrative Modelling of the Influence of MAPK Network on Cancer Cell Fate Decision.” Edited by Satoru Miyano. *PLoS Computational Biology* 9 (10): e1003286.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. “Cross-Presentation in Viral Immunity and Self-Tolerance.” *Nature Reviews. Immunology* 1 (November): 126–34.
- Hebenstreit, Daniel, Gerald Wirnsberger, Jutta Horejs-hoeck, and Albert Duschl. 2006. “Signaling Mechanisms , Interaction Partners , and Target Genes of STAT6” 17: 173–88.
- Hernandez, Céline, Morgane Thomas-Chollier, Aurélien Naldi, and Denis Thieffry. 2020. “Computational Verification of Large Logical Models-Application to the Prediction of T Cell Response to Checkpoint Inhibitors.” *Frontiers in Physiology* 11 (September): 558606.
- Hordyjewska, Anna, Łukasz Popiołek, and Anna Horecka. 2015. “Characteristics of Hematopoietic Stem Cells of Umbilical Cord Blood.” *Cytotechnology* 67 (3): 387–96.
- Hsu, Amy T., Tanya J. Lupancu, Ming-Chin Lee, Andrew J. Fleetwood, Andrew D. Cook, John A. Hamilton, and Adrian Achuthan. 2018. “Epigenetic and Transcriptional Regulation of IL4-Induced CCL17 Production in Human Monocytes and Murine Macrophages.” *The Journal of Biological Chemistry* 293 (29): 11415–23.
- Kantoff, Philip W., Celestia Higano, Neal Shore, Roy Berger, Eric Small, David Person, Charles Redfern, et al. 2010. “Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 356 (5): 2301–3.
- Karlebach, Guy, and Ron Shamir. 2008. “Modelling and Analysis of Gene Regulatory Networks.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (10): 770–80.
- Khan, Aziz, Oriol Fornes, Arnaud Stigliani, Marius Gheorghe, Jaime A. Castro-Mondragon, Robin van der Lee, Adrien Bessy, et al. 2018. “JASPAR 2018: Update of the Open-Access Database of Transcription Factor Binding Profiles and Its Web Framework.” *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D1284.
- Kimura, Hiroshi. 2013. “Histone Modifications for Human Epigenome Analysis.” *Journal of Human Genetics* 58 (7): 439–45.
- Kitano, Hiroaki. 2002. “Systems Biology: A Brief Overview.” *Science (New York, N.Y.)* 295 (5560): 1662–64.
- Laar, Lianne van de, Paul J. Coffey, and Andrea M. Woltman. 2012. “Regulation of Dendritic Cell Development by GM-CSF: Molecular Control and Implications for Immune Homeostasis and Therapy.” *Blood* 119 (15): 3383–93.

- Lapko, Natalia, Mateusz Zawadka, Jacek Polosak, George S. Worthen, Gwenn Danet-Desnoyers, Monika Puzianowska-Kuźnicka, and Krzysztof Laudanski. 2017. “Long-Term Monocyte Dysfunction after Sepsis in Humanized Mice Is Related to Persisted Activation of Macrophage-Colony Stimulation Factor (M-CSF) and Demethylation of PU.1, and It Can Be Reversed by Blocking M-CSF In Vitro or by Transplanting Naïve Autologous Stem Cells In Vivo.” *Frontiers in Immunology* 8 (May): 401.
- Law, Charity W., Monther Alhamdoosh, Shian Su, Gordon K. Smyth, and Matthew E. Ritchie. 2016. “RNA-Seq Analysis Is Easy as 1-2-3 with Limma, Glimma and EdgeR.” *F1000Research* 5 (1408): 1408.
- Lehtonen, Anne, Ville Veckman, Tuomas Nikula, Riitta Lahesmaa, Leena Kinnunen, Sampsa Matikainen, and Ilkka Julkunen. 2005. “Differential Expression of IFN Regulatory Factor 4 Gene in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and Macrophages.” *Journal of Immunology* 175 (10): 6570–79.
- Li, Weilong, Dongzhou Liu, Fengping Zheng, Zhipeng Zeng, Wanxia Cai, Shaodong Luan, Xiaoping Hong, Donge Tang, Liang-Hong Yin, and Yong Dai. 2021. “Generation of Systemic Lupus Erythematosus Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells from Blood.” *Stem Cells and Development* 30 (5): 227–33.
- Lim, Aeran, Sangsoo Lim, and Sun Kim. 2019. “Enhancer Prediction with Histone Modification Marks Using a Hybrid Neural Network Model.” *Methods (San Diego, Calif.)* 166 (August): 48–56.
- Lim, Pek Siew, Jasmine Li, Adele F. Holloway, and Sudha Rao. 2013. “Epigenetic Regulation of Inducible Gene Expression in the Immune System.” *Immunology* 139 (3): 285–93.
- Lizio, Marina, Jayson Harshbarger, Hisashi Shimoji, Jessica Severin, Takeya Kasukawa, Serkan Sahin, Imad Abugessaisa, et al. 2015. “Gateways to the FANTOM5 Promoter Level Mammalian Expression Atlas.” *Genome Biology* 16 (1): 22.
- Maston, Glenn A., Sara K. Evans, and Michael R. Green. 2006. “Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome.” *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7 (1): 29–59.
- Moore, David F., Hong Li, Neal Jeffries, Violet Wright, Ronald A. Cooper Jr, Abdel Elkhoulou, Monique P. Gelderman, et al. 2005. “Using Peripheral Blood Mononuclear Cells to Determine a Gene Expression Profile of Acute Ischemic Stroke: A Pilot Investigation.” *Circulation* 111 (2): 212–21.
- Moore, Jill E., Michael J. Purcaro, Henry E. Pratt, Charles B. Epstein, Noam Shores, Jessika Adrian, Trupti Kawli, et al. 2020. “Expanded Encyclopaedias of DNA Elements in the Human and Mouse Genomes.” *Nature* 583 (7818): 699–710.
- Naldi, Aurélien, Céline Hernandez, Wassim Abou-Jaoudé, Pedro T. Monteiro, Claudine Chaouiya, and Denis Thieffry. 2018. “Logical Modeling and Analysis of Cellular Regulatory Networks With GINsim 3.0.” *Frontiers in Physiology* 9 (June): 1–16.
- Naldi, Aurélien, Céline Hernandez, Nicolas Levy, Gautier Stoll, Pedro T. Monteiro, Claudine Chaouiya, Tomáš Helikar, et al. 2018. “The CoLoMoTo Interactive Notebook: Accessible and Reproducible Computational Analyses for Qualitative Biological Networks.” *Frontiers in Physiology* 9 (June): 680.
- Núñez-Reza, Karen J., Aurélien Naldi, Arantza Sánchez-Jiménez, Ana V. Leon-Apodaca, M. Angélica Santana, Morgane Thomas-Chollier, Denis Thieffry, and Alejandra Medina-Rivera. 2021. “Logical Modelling of in Vitro Differentiation of Human Monocytes into

- Dendritic Cells Unravels Novel Transcriptional Regulatory Interactions.” *Interface Focus* 11 (4): 20200061.
- Park, Peter J. 2009. “ChIP-Seq: Advantages and Challenges of a Maturing Technology.” *Nature Reviews. Genetics* 10 (10): 669–80.
- Paul, Franziska, and Ido Amit. 2014. “Plasticity in the Transcriptional and Epigenetic Circuits Regulating Dendritic Cell Lineage Specification and Function.” *Current Opinion in Immunology* 30 (October): 1–8.
- Radford, Kristen J., Kirsteen M. Tullett, and Mireille H. Lahoud. 2014. “Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy.” *Current Opinion in Immunology* 27 (1): 26–32.
- Ramírez, Carlos, and Luis Mendoza. 2018. “Phenotypic Stability and Plasticity in GMP-Derived Cells as Determined by Their Underlying Regulatory Network.” *Bioinformatics* 34 (7): 1174–82.
- Ranasinghe, Charani, Shubhanshi Trivedi, Danushka K. Wijesundara, and Ronald J. Jackson. 2014. “IL-4 and IL-13 Receptors: Roles in Immunity and Powerful Vaccine Adjuvants.” *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25 (4): 437–42.
- Randolph, Gwendalyn J., Claudia Jakubzick, and Chunfeng Qu. 2009. “Antigen Presentation by Monocytes and Monocyte-Derived Cells.” *Current Opinion in Immunology* 20 (1): 52–60.
- Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, and Gordon K. Smyth. 2009. “EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data.” *Bioinformatics* 26 (1): 139–40.
- Rodríguez-Jorge, Otoniel, Linda A. Kempis-Calanis, Wassim Abou-Jaoudé, Darelly Y. Gutiérrez-Reyna, Céline Hernandez, Oscar Ramirez-Pliego, Morgane Thomas-Chollier, Salvatore Spicuglia, Maria A. Santana, and Denis Thieffry. 2019. “Cooperation between T Cell Receptor and Toll-like Receptor 5 Signaling for CD4+ T Cell Activation.” *Science Signaling* 12 (577). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar3641>.
- Rutella, Sergio, Giuseppina Bonanno, Annabella Procoli, Andrea Mariotti, Daniela G. de Ritis, Antonio Curti, Silvio Danese, et al. 2006. “Hepatocyte Growth Factor Favors Monocyte Differentiation into Regulatory Interleukin (IL)-10++IL-12low/Neg Accessory Cells with Dendritic-Cell Features.” *Blood* 108 (1): 218–27.
- Sallusto, F., and Antonio Lanzavecchia. 1994. “Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor Alpha.” *The Journal of Experimental Medicine* 179 (4): 1109–18.
- Sander, Jil, Susanne V. Schmidt, Branko Cirovic, Naomi McGovern, Olympia Papantonopoulou, Anna-Lena Hardt, Anna C. Aschenbrenner, et al. 2017. “Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2.” *Cell Immunity* 47: 1051–66.
- Saxena, Mansi, and Nina Bhardwaj. 2018. “Re-Emergence of Dendritic Cell Vaccines for Cancer Treatment.” *Trends in Cancer* 4 (2): 119–37.
- Schraml, Barbara U., and Caetano Reis. 2015. “Defining Dendritic Cells.” *Current Opinion in Immunology* 32: 13–20.
- Schwab, Julian D., Silke D. Kühlwein, Nensi Ikononi, Michael Kühl, and Hans A. Kestler. 2020. “Concepts in Boolean Network Modeling: What Do They All Mean?” *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18 (March): 571–82.

- Segura, Elodie, and Sebastian Amigorena. 2013. "Inflammatory Dendritic Cells in Mice and Humans" 34 (9): 9–14.
- Segura, Elodie, Maxime Touzot, Armelle Bohineust, Antonio Cappuccio, Gilles Chiochia, Anne Hosmalin, Marc Dalod, Vassili Soumelis, and Sebastian Amigorena. 2013. "Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation." *Immunity* 38 (2): 336–48.
- Sen, Partho, Esko Kemppainen, and Matej Orešič. 2018. "Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Frontiers in Molecular Biosciences* 4 (January). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00096>.
- Soneson, Charlotte, Michael I. Love, and Mark D. Robinson. 2016. "Differential Analyses for RNA-Seq: Transcript-Level Estimates Improve Gene-Level Inferences." *F1000Research* 4 (2): 1521.
- Sprangers, Sara, Teun J. de Vries, and Vincent Everts. 2016. "Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells." *Journal of Immunology Research* 2016 (July): 1475435.
- Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. "Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 137: 1142–62.
- Stunnenberg, Hendrik G., Sergio Abrignani, David Adams, Melanie de Almeida, Lucia Altucci, Viren Amin, Ido Amit, et al. 2016. "The International Human Epigenome Consortium: A Blueprint for Scientific Collaboration and Discovery." *Cell* 167 (5): 1145–49.
- Su, Shian, Charity W. Law, Casey Ah-Cann, Marie-Liesse Asselin-Labat, Marnie E. Blewitt, and Matthew E. Ritchie. 2017. "Glimma: Interactive Graphics for Gene Expression Analysis." *Bioinformatics (Oxford, England)* 33 (13): 2050–52.
- Tang-Huau, Tsing-Lee, and Elodie Segura. 2018. "Human in Vivo-Differentiated Monocyte-Derived Dendritic Cells." *Seminars in Cell and Developmental Biology* YSCDB-2528. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.02.018>.
- Terfve, Camille, and Julio Saez-Rodriguez. 2012. "Modeling Signaling Networks Using High-Throughput Phospho-Proteomics." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 736: 19–57.
- Thomas-Chollier, Morgane, Carl Herrmann, Matthieu Defrance, Olivier Sand, Denis Thieffry, and Jacques Van Helden. 2012. "RSAT Peak-Motifs: Motif Analysis in Full-Size ChIP-Seq Datasets." *Nucleic Acids Research* 40 (4). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1104>.
- Trewavas, Anthony. 2006. "A Brief History of Systems Biology. 'Every Object That Biology Studies Is a System of Systems.' Francois Jacob (1974)." *The Plant Cell* 18 (10): 2420–30.
- Turatsinze, Jean-Valery, Morgane Thomas-Chollier, Matthieu Defrance, and Jacques van Helden. 2008. "Using RSAT to Scan Genome Sequences for Transcription Factor Binding Sites and Cis-Regulatory Modules." *Nature Protocols* 3 (September): 1578.
- Ul-haq, Zaheer, Sehrish Naz, and M. Ahmed Mesaik. 2016. "Interleukin-4 Receptor Signaling and Its Binding Mechanism : A Therapeutic Insight from Inhibitors Tool Box." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 32: 3–15.
- Vaquerizas, Juan M., Sarah K. Kummerfeld, Sarah A. Teichmann, and Nicholas M. Luscombe. 2009. "A Census of Human Transcription Factors: Function, Expression and Evolution." *Nature Reviews. Genetics* 10 (4): 252–63.

- Vento-tormo, Roser, Carlos Company, Javier Rodríguez-ubreva, Lorenzo De Rica, José M. Urquiza, Biola M. Javierre, Radhakrishnan Sabarinathan, et al. 2016. "IL-4 Orchestrates STAT6-Mediated DNA Demethylation Leading to Dendritic Cell Differentiation," 1–18.
- Villar, Javiera, and Elodie Segura. 2020. "Recent Advances towards Deciphering Human Dendritic Cell Development." *Molecular Immunology* 122 (April): 109–15.
- Wittkopp, Patricia J., and Gizem Kalay. 2011. "Cis-Regulatory Elements: Molecular Mechanisms and Evolutionary Processes Underlying Divergence." *Nature Reviews. Genetics* 13 (1): 59–69.
- Xie, Xiaowei, Xuelian Cheng, Gaoxiang Wang, Biao Zhang, Mengyao Liu, Liting Chen, Hui Cheng, et al. 2021. "Single-Cell Transcriptomes of Peripheral Blood Cells Indicate and Elucidate Severity of COVID-19." *Science China. Life Sciences*, February. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1880-y>.
- Yashiro, Takuya, Kazumi Kasakura, Yoshihito Oda, Nao Kitamura, Akihito Inoue, Shusuke Nakamura, Hokuto Yokoyama, et al. 2017. "The Hematopoietic Cell-Specific Transcription Factor PU.1 Is Critical for Expression of CD11c." *International Immunology* 29 (2): 87–94.
- Zhang, Min, and Bing Huang. 2012. "The Multi-Differentiation Potential of Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Stem Cell Research & Therapy* 3 (6): 48.

Anexo 2. Reglas lógicas del modelo de la diferenciación de monocitos a moDC.

Nodos	Valor	Regla lógica
CSF2		Input node
IL4		Input node
CSF2R	1	CSF2
IL4R	1	IL4
AhR	1	(NCOR2 & USF1 & STAT6) (IRF4 & STAT6 & !ERK)
CEBPa	1	PU1 & !FOXO1 & !IRF8 & !STAT5
FOS	1	ERK
cMYC	1	ERK & !GSK3B
CREB	1	AKT ERK
FOXO1	1	(PU1 KLF4) & !AKT
IRF4	1	AhR (PU1 & STAT6 & NFKB1_RelA & IRF4)
NFKB1_RelA	1	IKK
NFKB2	1	NFKB1_RelA STAT5
NR4A1	1	ERK & STAT6
PU1	1	(ERK STAT6) & !(ERK & STAT6)
	1	ERK & STAT6
STAT3	1	JAK1 & SHP1
	2	JAK1 & !SHP1
STAT5	1	Src JAK2
STAT6	1	JAK3
JAK2	1	CSF2R & !PTPN1
Src	1	CSF2R:1 JAK2
PI3K	1	RAS JAK2
PIP3	1	PI3K & !PTEN
AKT	1	PIP3 & !NCOR2
PTEN	1	MAGI1 & MEK1
MEK1	1	RAF
MAGI1	1	MEK1
CLIP1	1	mTORC1 PU1
mTORC1	1	AKT
SHC_GRB2_mSOS	1	CSF2R
RAS	1	SHC_GRB2_mSOS
RAF	1	RAS
ERK	1	MEK1
TAU	1	ERK
CPLA2	1	ERK
FLT3	1	PU1
GSK3B	1	!AKT
IKK	1	CSF2R AKT
JAK3	1	IL4R
JAK1	1	IL4R
SHP1	1	USF1:1 & !LnC_DC
CIITA	1	STAT5

ITGAX	1	IRF4 & PU1 & PRDM1
LnC_DC	1	PU1 & IRF4 & STAT5
IL4_gene	1	STAT6
DUOX1	1	STAT6 & IRF4 & PU1
SLAMF1	1	STAT6 & IRF4 & ELK4
MAOA	1	STAT6 & NCOR2 & PU1
HLA_DR	1	STAT3 (STAT6 & CIITA)
ALOX15	1	CREB & STAT6 & STAT3
TIMP3	1	STAT6 & AP1 & IRF4
DUSP6	1	ERK
Tet2	1	PU1
PTPN1	1	AhR
SOCS	1	STAT3

Anexo 3. Identificadores de los TF en la base de datos Jaspar 2018 (Khan et al. 2018)

TF	JASPAR ID
AHR	MA0006.1
AP1	MA0940.1
ATF1	MA0604.1
BATF3	MA0835.1
CEBPA	MA0102.3
CEBPB	MA0466.2
CREB1	MA0018.3
ELK4	MA0076.1
FOXO1	MA0480.1
IRF4	MA1419.1
IRF8	MA0652.1
KLF4	MA0039.2
MAFB	MA0117.2
NFKB1	MA0105.4
NFKB2	MA0778.1
NR4A1	MA1112.1
SPI1	MA0080.4
STAT3	MA0144.2
STAT5	MA0519.1
STAT6	MA0520.1
USF1	MA0093.3
PRDM1	MA0508.3

Anexo 4. [Purificación de CBMC, CD34+, PBMC y monocitos](#)

Contexto

La obtención de células y su cultivo en un laboratorio de reciente creación es un reto indispensable para la generación de nuevos datos de secuenciación masiva. En el Laboratorio de Genómica Regulatoria y Bioinformática nos enfocamos en la obtención de células mononucleares del cordón umbilical (CBMC, por sus siglas en inglés), así en la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y sus derivados.

La obtención de CBMC nos permite obtención de progenitores hematopoyéticos como lo son las células CD34+ que son células multipotentes con la capacidad de dar lugar a los precursores mieloides (eritrocitos, glóbulos blancos y plaquetas) y linfoides (linfocitos, células NK). Los valores de CD34+ presentes en la sangre de cordón umbilical van del 0.02% al 1.43%, en médula ósea los valores van de 0.5% al 5% y en sangre periférica los valores son menores a 0.01% (Hordyjewska, Popiołek, and Horecka 2015).

Las células PBMC han sido empleadas por un largo tiempo para estudiar todo tipo de enfermedades, desde enfermedades autoinmunes (Li et al. 2021), infecciones (Xie et al. 2021), diversas patologías como infartos isquémicos cerebrales (D. F. Moore et al. 2005), se han usado para la obtención de células progenitoras (Zhang and Huang 2012) entre otros usos. Las células PBMC se componen por linfocitos T en aproximadamente 45-70%, linfocitos B en aproximadamente 5-15%, monocitos de 10 al 30%, células dendríticas aproximadamente 1-2% y natural killers en 5-10% y células progenitoras de 0.1-0.2% (Sen, Kempainen, and Orešič 2018).

Los monocitos son células leucocitarias que participan en la regulación homeostática celular y reguladores inmunitarios. Se desarrollan en la médula ósea para pasar al torrente circulatorio. En sangre periférica se han identificado tres grandes grupos de monocitos, de acuerdo con la expresión de marcadores de membrana externa CD14 y CD16. El grupo más estudiado es el que expresa altos niveles de CD14 y no expresa CD16, llamados monocitos clásicos (Sprangers, de Vries, and Everts 2016).

Métodos

Obtención de sangre de cordón umbilical y purificación de CBMC

La toma de muestra de la sangre del cordón umbilical se realizó después de la firma del consentimiento informado (Anexo 6) proveniente de un parto por cesárea, justo antes de retirar la placenta de la madre. La muestra se obtuvo con una jeringa de 20 ml que tomó el médico cirujano responsable de la cesárea. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de INB con el número 051.H. El procedimiento no implica ningún riesgo ni para la madre ni para el bebé. El volumen de la muestra oscilaba entre 10 y 20 ml en promedio. La sangre de cordón fue vertida a un tubo falcón de 50 ml con 500 µl de EDTA 0.5 M. Fue transportada en hielera a temperatura ambiente en un lapso no mayor a una hora para su tratamiento y la obtención de CBMC.

Las células mononucleares de cordón umbilical (CBMC, por sus siglas en inglés) fueron purificadas por gradiente se usó *lymphoprep* (Cat 07801/07811), la sangre fue diluida con PBS 1x (buffer de salino de fosfatos, por sus siglas en inglés) (Sigma Cat:P5493-1L) con un volumen igual al de la sangre, la dilución de sangre con PBS fue vertida en un tubo con 10 ml de *lymphoprep* y se formó un gradiente, abajo el *lymphoprep* y encima la dilución de sangre de cordón. Después fue centrifugada 1,400 g por 30 min con desaceleración de 0 a 22° C. Se recuperaron las CBMC con cuidado para no llevar *lymphoprep* y se lavaron dos veces con PBS 1x, después se cultivaron con medio RPMI suplementado con suero al 5%, L-glutamina, estreptomina y penicilina (sigma G6784-100ml).

Purificación de células CD34+

La purificación de células CD34+, se realizó con el kit de selección positiva de *STEMCELL Easysep* a la sangre de cordón umbilical se le agrega la cantidad proporcional de *RosetteSep*. Se incubó en agitación 20 min, después se agregó PBS 1x hasta alcanzar 30 ml de volumen final, se realizó la formación del gradiente con *lymphoprep*, se centrifugó 1,200 g por 20 min con desaceleración 0, se recuperaron las células blancas, se lavó con el medio recomendado (PBS 1x, SFB 1%, 1mM EDTA) por centrifugación 300 g por 10 min, aceleración 7 y desaceleración 4. Se resuspendió en 500 µl de medio recomendado.

Se procedió a iniciar el protocolo para la selección de las células CD34+, se agregaron 100 µl de cocktail de selección positiva y se incubó a temperatura ambiente por 10 min, se agitaron las perlas magnéticas con el agitador tipo vórtex por 30 segundos, se agregaron 50 µl a la mezcla y se incubó

1 min a temperatura ambiente, se llevó a un volumen de 2.5 ml con el medio recomendado, se colocó el tubo en el magneto y se incubó por 3 min, como es selección positiva las células de interés se adherieron a la pared del tubo debido a las perlas magnéticas, por lo tanto se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado más con medio recomendado, después se centrifugaron las células adheridas a las perlas magnéticas y estaban listas para su cultivo posterior.

Estandarización de la expansión de células CD34+

La expansión de las células CD34+ purificadas se realizó a partir de 50 mil células CD34, en el medio *StemSpan* 1x diluido en medio RPMI, esto para que las células iniciaran la división celular. La expansión se realizó por dos semanas, con cambio de medio cada 2 días.

Obtención de PBMC a partir de buffy coat

Las células PBMC fueron purificadas a partir de paquete celular de *buffycoat* pertenecientes al banco de sangre Santiago de Querétaro con quien contamos con una colaboración respaldada por el proyecto aceptado por el comité de ética del Instituto de Neurobiología con el número 086.H (Anexo 7). Se tomaron 20 ml de sangre (proveniente de *buffycoat*) se depositó en un tubo falcón estéril, se agregaron 15 ml de PBS 1X y se mezcló por inversión. En otro tubo estéril se agregaron 10 ml de *lymphoprep*, se vertió lentamente la mezcla de sangre-PBS 1x, sin romper el gradiente formado. Se centrifugó a 20° C por 30 min a 1,400 g sin desaceleración. Se extrajo toda la interfase blanca (entre el *lymphoprep* y el plasma) con ayuda de una pipeta. Se realizó un lavado con 40 ml de PBS 1x. Se centrifugó a 20° C por 10 min a 1,400 g. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en seco. Se resuspendió las células en medio RPMI suplementado en 1 o 2 ml para contarlas. Para cultivar las células PBMC se sembraron de 80 M a 100 M en una caja con 10 ml de medio RPMI suplementado y se incubaron a 37° C con 5% de CO₂.

Purificación de monocitos a partir de PBMC

Las células PBMC se pusieron en un tubo un máximo de 50 M de PBMC en un volumen máximo de 1 ml. Se añadió 50 µl de *Isolation Cocktail* más 50 µl de *Platelet Removal Cocktail*. Se mezcló muy bien y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se agitaron las partículas magnéticas con el agitador tipo vórtex por 30 seg, para añadir 50 µl de partículas magnéticas a la mezcla anterior, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se añadió 2 ml de medio remendado

(PBS 1x, EDTA 1 mM, SFB 2%), se mezcló gentilmente con la pipeta de 2 o 3 veces. Se colocó el tubo sin tapa en la gradilla magnética y se incubó por 3 min. Se recuperó los monocitos al verter el sobrenadante en un tubo nuevo con un solo movimiento. Se realizó el conteo celular. Se centrifugó y se resuspendió en medio RPMI con o sin citocinas para ser incubadas a 37° C con 5% de CO₂.

Resultados

Purificación de CBMC y expansión de células CD34+

Resultado de la purificación de CBMC de sangre de cordón umbilical en colaboración con la clínica Cer. Obtuvimos diferentes cantidades de células también dependiente de la cantidad de sangre recuperada en cada cordón. Las cantidades en promedio de CBMC por 20 ml de sangre recolectada fueron de alrededor 90 M de células.

El no. de células de CD34+ vario de 50 mil a 200 mil relacionado con el volumen de la muestra de sangre de cordón. La expansión se realizó durante dos semanas en donde la expansión varió bastante, por ejemplo, los datos observados en la tabla 8. Una vez terminada la expansión las células CD34+ pueden ser usadas para diferenciarlas o utilizarlas para realizar RNA-seq, ChIP-seq o ATAC-seq.

Tabla 8. Número de células finales obtenidos después de la expansión celular con el medio *Stemspan*

Inicio	Termino
CD34 niña 50 mil células 1 ml de medio <i>Stemspan</i>	4 M de células
CD34 niño 10 50 mil células 1 ml de medio <i>Stemspan</i>	140 mil células
CD34 niño 50 mil 1 ml de medio <i>Stemspan</i>	3 M de células
CD34 Niña 1 50 mil	240 mil células

1ml de medio <i>Stemspan</i>	
CD34 Niña 2 50 mil 1 ml de medio <i>Stemspan</i>	150 mil células

Purificación de PBMC y monocitos

Las células PBMC fueron purificadas a partir de paquete celular de *buffycoat* pertenecientes al banco de sangre Santiago de Querétaro. En promedio a partir de 20 ml de sangre del *buffycoat* de adulto obtuvimos en promedio 300 M de células PBMC, a partir de las mismas procedimos a la purificación de monocitos, de acuerdo con el kit partíamos de 50 M para obtener en promedio 15 M de monocitos para poder diferenciarlos a células dendríticas. Medimos la pureza de los monocitos purificados con el citómetro de flujo (*Attune NxT*, de *Life technologies*) con CD14 y CD16 como marcadores, positivo y negativo respectivamente, en los primeros intentos se obtuvo aproximadamente 60% de pureza y en las últimas pruebas el 90%.

Conclusiones

El cultivo celular, así como la purificación de tipos celulares específicos es de vital importancia para cualquier laboratorio que desee generar sus propios datos de secuenciación masiva. El cultivo celular exitoso se logró al corroborar que todos los equipos de nueva adquisición funcionan correctamente y han recibido mantenimiento adecuado, no sufrimos contaminación y los medios poseen el pH adecuado y mantienen vivas a las células por periodos prolongados. La purificación de PBMC y CBMC se logró con éxito al tener recuentos elevados de los mismos. En cuanto a la purificación de monocitos pudimos mejorar el porcentaje de pureza obtenida.

Hemos podido estandarizar la purificación y el cultivo de células de la sangre en el Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma Humano, lo cual nos permitirá generar nuevos grupos de datos de secuenciación masiva en población mexicana para ayudar en el estudio de la diversidad génica.

Anexo 5. Estandarización de la técnica de sonicación en el Laboratorio de Genómica Regulatoria y Bioinformática dentro del LIIGH-UNAM

El uso de la técnica de ChIP-seq permite el estudio del cambio en la dinámica de la cromatina, conocer la transición entre cromatina que es transcripcionalmente activa o cuando esa región del genoma se encuentra inactiva. Cada tejido tiene expresión génica específica que es determinada por los estados en la cromatina y que pueden ayudar a entender el funcionamiento normal y las alteraciones que ocurren en patologías específicas (Garber et al. 2012).

Existen diversos consorcios que se han encargado de generar gran cantidad de datos de secuenciación masiva que sirven como base para el entendimiento de la dinámica que ocurre en el núcleo para expresión específica de genes de acuerdo con el tipo celular (J. E. Moore et al. 2020; Stunnenberg et al. 2016). Todavía es necesario el generar nuevos datos debido a las diferencias que ocurren entre poblaciones que todavía no han sido representadas equitativamente, como poblaciones con amplia diversidad genética como es el caso de los mexicanos. También es necesario obtener datos de enfermedades que aún no han sido estudiadas, por lo tanto, el generar datos de secuenciación masiva todavía es relevante.

Contexto

En el laboratorio de Genómica Regulatoria y Bioinformática, de reciente creación, iniciamos con la obtención de cromatina fragmentada para realizar ensayos de ChIP-seq. La inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación (ChIP-seq, por sus siglas en inglés) se utiliza para saber el lugar en donde diferentes proteínas se unen al DNA, las proteínas pueden ser histonas, TF, enzimas con unión al DNA, chaperonas, o nucleosomas. ChIP-seq consiste en realizar la fijación del DNA con las proteínas que se encuentran cercanas o unidas, el siguiente paso es fragmentar la cromatina en fragmentos de alrededor de 300 pb, después se usa un anticuerpo que reconozca a la proteína de interés, y se recuperan los fragmentos de DNA unidos a dicha proteína, con el DNA recuperado se realizan la librería para su secuenciación (Bailey et al. 2013).

Métodos

Fijación de la cromatina (Cross-link)

La obtención de células para sonicar la realizamos con la recuperación las células PBMC de las cajas de 10 ml. Se lavó la caja con el mismo medio RPMI suplementado (SBF 5%), se bañó el

fondo para despegar las células. Se colocaron en un tubo falcón para centrifugar a 1,300 rpm por 10 min aceleración y desaceleración 9, se descarta el sobrenadante. Se resuspendieron las células en tubos de 100 M con 36 ml de medio RPMI sin/SFB a 20° C. Se añadió 0.99 ml de formaldehído al 37%, se incubó las células a exactamente 20° C por 10 min. Se agregan 2.5 M de glicina para una concentración final de 250 mM/ml. Se centrifugó 5 min a 1,600 rpm a 4° C, se centrifuga a velocidad máxima por 30 seg, se descarta sobrenadante, se resuspende en seco, se lava dos veces con PBS 1x frío. Se resuspende en seco, y se agregan 10 ml de PBS 1x, se realiza el conteo celular y se dividen las células con una concentración de 15 M/ml en tubos *eppendorf* de 1.5 ml.

Sonicación

Con las células previamente fijadas se centrifugaron a 2,000 rpm por 5 min a 4° C, se removió el sobrenadante y se agregó 500 µl de CLB buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.2% NP40, 10 mM butirato de sodio, 50 µg/ml PMSF, 1 µg/ml leupeptina), se resuspendieron las células con la pipeta y se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó 2,500 rpm por 5 min a 4° C. Se removió el sobrenadante y se resuspendieron los núcleos en 600 µl del buffer de lisis nuclear (NLB, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS, 10 mM butirato de sodio, 50 µg/ml PMSF, 1 µg/ml leupeptina) + 360 µl de IPDB buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0.01% SDS, 10 mM butirato de sodio, 50 µg/ml PMSF, 1 µg/ml leupeptina) y se incubó por 10 min. Se repartieron los núcleos en 5 tubos de 200 µl, se sonicaron por 5, 6, 7, 8, 9 y 10 ciclos. La sonicación se realizó en el *Bioruptor Pico* con ciclos de 30 seg ON y 30 seg OFF. Para realizar la purificación del DNA y remover las proteínas: tomamos 100 µl de cada tubo, en 200 µl de *elution buffer* más 8 µl de 5 M NaCl más 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Cat. EO0492) por una hora a 65° C a 1,400 rpm. La purificación del DNA se realizó con el kit de Qiagen (Cat. 28106), seguimos el protocolo del kit, a los 300 µl añadí 1,500 µl de buffer QB, se eluyó en 30 µl de buffer EB. Se cargó el gel de agarosa al 1% 10 µl de muestra más 2 µl de xilencianol 5x, con el marcador de peso molecular la escalera de 100 pb de ThermoFisher (Cat 15628019). Se corrió el gel agarosa por 50 min a 110 V y se fotodocumentó al final de la corrida.

Resultados

Finalmente obtuvimos fragmentos mayoritariamente de entre 100 y 200 pb (Figura 19), de acuerdo con el marcador de peso molecular utilizado, desde los 5 ciclos de sonicación. Después de realizar diversas pruebas con diferentes buffers de lisis, así como diferentes ciclos de sonicación. El

protocolo final usado fue el que realice en el curso en el *Wellcome Trust Sanger Institute*, descrito en materiales y métodos de esta sección.

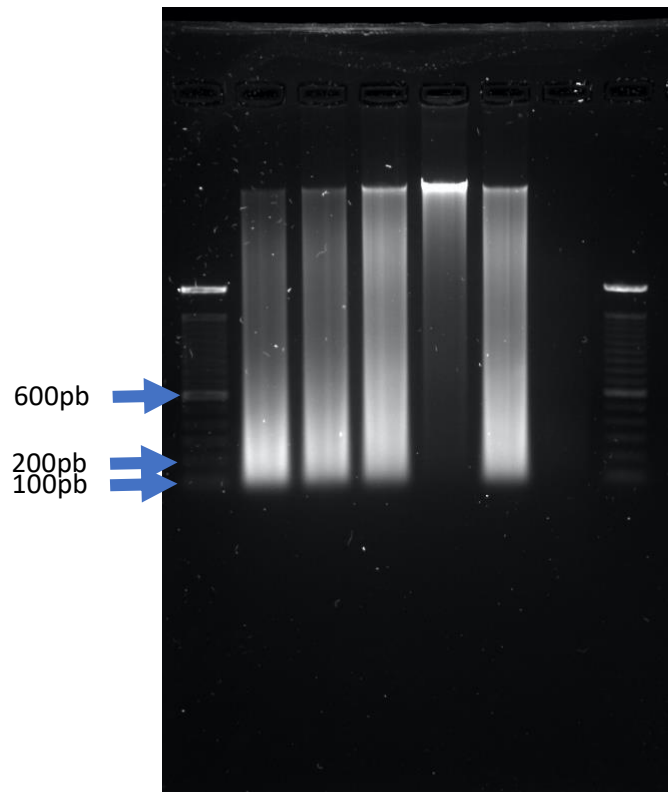


Figura 19. Corrimiento electroforético de los fragmentos de DNA obtenidos por sonicación. En el primer carril y en el último tenemos marcador de peso molecular para identificar el tamaño de los fragmentos. En el segundo carril está la muestra de 5 ciclos, tercer carril muestra de 6 ciclos, cuarto carril muestra de 7 ciclos, quinto carril muestra de 8 ciclos, sexto carril muestra de 9 ciclos, séptimo carril muestra de 10 ciclos.

Conclusión

La generación de nuevos datos de secuenciación masiva no es trivial, hoy más que nunca es de vital importancia el aumento de datos en poblaciones que no han sido estudiadas con tanta profundidad como es el caso de la población mexicana.

Encontramos algunos tropiezos para la obtención de la cromatina fragmentada, pero logramos superarlos y estandarizamos con éxito la obtención de fragmentos de la cromatina de células PBMC, los cuales pueden ser empleados para realizar ensayos de ChIP-seq.

Anexo 6. Consentimiento informado para la toma de sangre de cordón umbilical.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Placenta Muestra No. _____
Sangre de cordón umbilical Muestra No. _____

Protocolo de Investigación:
Análisis de la carga mutacional en el genoma mitocondrial humano

Yo, _____ dono voluntariamente al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México las muestras biológicas indicadas arriba, obtenidas por mi médico tratante para su uso en proyectos de investigación científica bajo los lineamientos del comité de ética del mismo. Entiendo que esta donación se hace de manera anónima y que mi identidad no será conocida por los investigadores. Asimismo, confirmo que la obtención de las muestras se hizo bajo recomendación de mi médico tratante y que el procedimiento para obtenerlas no fue más allá de lo indicado clínicamente.

Lugar _____

Fecha _____

Firma Donante _____

Nombre y firma Testigo 1 _____

Nombre y firma Testigo 2 _____

Anexo 7. Aprobación por el comité de ética para la recolección de *buffycoat* en el banco de sangre.



INEU/SA/CB/302/2019

A quien corresponda

Presente

Por medio de la presente les informo que la propuesta de investigación “**MECANISMOS MOLECULARES EN LA DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS**”, cuyo responsable es la **DRA. CARMEN ACEVES VELASCO**, ha sido evaluado y aprobado el día 22 de octubre de 2019, con número de proyecto **086.H** por el Comité de Ética en Investigación del INB y como resultado se encuentra que cumple con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, vigente a partir del 01/07/1984, así como de la última reforma DOF 02-04-2014. Para la evaluación de dicho proyecto este comité también tomó en consideración los criterios de organismos internacionales incluyendo el Código de Núremberg, la declaración de Helsinki y el Informe Belmont de la Comisión Nacional para la Protección de los Sujetos Humanos ante la Investigación Biomédica, así como del Comportamiento del Departamento de Salud, Educación y Bienestar de los Estados Unidos del 18 de abril de 1979.

Asimismo, el laboratorio en el que se realiza este proyecto de investigación cumple con los requisitos mínimos y con la normatividad universitaria en términos de bioseguridad.

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”

Campus Juriquilla, Qro, 22 de Octubre de 2019

DR. ATAULFO MARTÍNEZ TORRES
Presidente del Comité de Ética en Investigación
Instituto de Neurobiología, UNAM

ccp.-Dra. Carmen Aceves Velasco