

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD IZTAPALAPA.**

**EXPRESIÓN DE GENES EN MACRÓFAGOS
PERITONEALES DE RATÓN CON DIFERENTES DOSIS DE
INTERFERÓN GAMMA**

TESIS

**Que para obtener el grado de Maestra en Biología
Experimental.**

P R E S E N T A

MVZ. MARTHA LETICIA ALFARO LEÓN

Junio del 2001

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR DE TESIS

Ph.D. STEVEN H. ZUCKERMAN

CABEZA DE GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN INSUFICIENCIA CARDIACA. LILLY
RESEARCH LABS. INDIANAPOLIS IN. USA.
PROFESOR ASOCIADO ADJUNTO DE MICROBIOLOGÍA EN LA ESCUELA DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE INDIANA

ASESORA

Ph.D. M. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ

PROFESOR-INVESTIGADOR TITULAR "C"
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA- IZTAPALAPA

ASESORA

Ph.D. ANA MARÍA ROSALES TORRES

PROFESOR-INVESTIGADOR TITULAR "C"
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO

ASESORA

M. en C. MARCELA VERGARA O.

PROFESOR-INVESTIGADOR TITULAR "C"
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO

111

20/569 = 11

La Maestria en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), contando con apoyo del mismo Consejo, por medio del convenio número 309-0. Agradezco al CONACyT el apoyo que me brindó para poder realizar este proyecto con el número de registro 126430.

ACKNOWLEDGEMENTS

I have to give a special and very big thanks to Ph.D. Steven Zuckerman for allowing me to do my experimental work for this thesis in his laboratory and for his kindness, patience, and clear, distinct direction on this thesis in each step of development, from beginning to end.

To my fellow workers, Ph.D. Constantinos Panousis and Ph.D. Glenn F. Evans, for their very important help in every day laboratory work. Without their valuable help and patience, I could not have finished this project.

To Ph.D. Elcira Villarreal for her time that she dedicated checking the paper and her nice, interesting and diligent observations about it.

To Eli Lilly and Co. for permitting me to work in the company and for the use of their equipment.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras: Dra. Concepción Gutiérrez R., Dra. Ana María Rosales T. y M en C. Marcela Vergara, por haberme guiado en cada una de las etapas para realizar este trabajo con gran compañerismo, compromiso y cariño.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento de Producción Agrícola y Animal, por las facilidades que me brindaron para la realización de los estudios de maestría y la tesis.

A la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapala.

A Ana María Rosales Torres por su continua ayuda en la realización diaria de este trabajo, por su confianza y su gran cariño.

A Javier Olivares por su gran apoyo.

A Gabriel, Alejandra y Santiago, por su gran cariño, apoyo y tolerancia

A mis queridas Alicas

A la memoria de Don Fernando Salmerón

RESUMEN

El IFN- γ es una citocina que juega un importante papel como modulador en todas las fases de la respuesta inmunológica e inflamatoria y es producido principalmente por el subgrupo Th1 de los linfocitos derivados del timo (T) y células citotóxicas naturales (NK). Las actividades de IFN- γ están mediadas primariamente a través de la regulación de la transcripción de muchos genes efectores.

Los macrófagos son considerados como la primera línea de defensa de un organismo contra agentes extraños e infecciosos y son una población celular clave efectora en la respuesta inmune innata y adaptativa de la respuesta inmune.

Debido a la importancia de las funciones desempeñadas por los macrófagos en procesos inflamatorios dependientes o independientes de infección, y la estimulación que sobre ellos ejerce IFN γ , se llevó a cabo la identificación de cambios en la expresión de ARNm en macrófagos peritoneales de ratones tratados con dosis 50, 10 y 3 unidades de IFN γ /ml. Se realizó 1 microarreglo de cada tratamiento con sus respectivos controles con cADN marcado con P³², a partir de ARN total de cada una de las dosis. En cada una de las membranas de cADN, se puede obtener información diferencial de la expresión de alrededor de 600 ARNm en un solo experimento, garantizando la especificidad de la hibridación por el uso de una mezcla de cebadores para cada uno de los cADN contenidos en cada membrana, y porque también se incluyen en las membranas ADNs de bacteriófagos y plásmidos como controles negativos para confirmar la hibridación específica junto con algunos cADN constitutivos (housekeeping) como control positivo, para normalizar los ARNm abundantes en los macrófagos. Para normalizar los resultados se usaron los valores de tres genes constitutivos, hipoxantina, omitina y proteína S29 ribosomal 40S.

Los resultados obtenidos muestran un mayor número de genes regulados a la baja, aún en la dosis más baja, a diferencia de un pequeño número de genes regulados a la alta.

Los genes más sensibles a IFN γ fueron los que codifican las proteínas factor 1 regulado por interferón (IRF1) e integrina alfa L (LFA-1), los cuales tuvieron una expresión a la alta aun en la dosis más baja de 3 unidades de IFN γ / ml.

Dentro del grupo de genes regulados a la baja se encuentran un gran número de proteasas que desempeñan diferentes funciones en la respuesta inmune, un grupo de genes involucrados en la ruta de señalización de factor de crecimiento transformante (TGF β), y genes involucrados en la movilización y vesiculación en macrófagos.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Interferón Gamma.	1
1.2 Células Productoras de Interferón- γ	3
1.3 Actividades de Interferón- γ en Distintos Tipos Celulares.	4
1.3.1 Células presentadoras de antígeno	5
1.3.2 Células B	5
1.3.3 Células T	6
1.3.4 Células endoteliales	6
1.3.5 Células hematopoyéticas	6
1.3.6 Neutrófilos polimorfonucleares	7
1.3.7 Monocitos/ macrófagos	7
1.4 Ruta de Señalización	9
1.4.1 Receptor	9
1.4.2 La familia Janus Quinasa (JAKs)	10
1.4.3 Proteínas transductoras de señal y activadoras de transcripción (STATs)	11
1.4.4 Mecanismos de transducción de la Señal	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	16
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSIÓN	50
6. CONCLUSIONES	54
7. BIBLIOGRAFÍA	55

1. INTRODUCCIÓN

El Interferón gamma (IFN- γ) pertenece a una familia de proteínas relacionada por su habilidad para proteger a células de infecciones virales. Los interferones se han dividido principalmente en tres grandes grupos caracterizados sobre la base de propiedades antigénicas, biológicas y químicas: Interferón alfa (IFN α) o leucocito, porque es producido por células mononucleares en circulación periférica, el Interferón beta (IFN β), también originalmente llamado tipo I o IFN fibroblasto porque éstas células lo originan y finalmente, IFN- γ . Los tres son interferones clásicos inducidos en respuesta a infecciones virales en células. (Pestka y Langer, 1987)

Estos tres Interferones no solo presentan diferencias entre ellos en relación con las células que los producen, sino también en cuanto a sus actividades, sus genes, estructura y la cantidad que de ellos se requiere para codificar cada una de estas proteínas, así por ejemplo, para codificar IFN α existen 26 genes incluyendo algunos pseudogenes. Estos genes tienen estructuras comunes, como el carecer de intrones y derivar de un precursor ancestral común. Esta familia de genes codifica al menos para 22 proteínas distintas, las cuales son de cadena única de 165 a 166 aminoácidos con pesos moleculares aproximadamente de 20Kda. Este conjunto de genes se encuentra ubicado en el cromosoma 9 en el humano y 4 en el ratón. (Trent et al., 1982; Zoon et al., 1992; Farrar y Schreiber 1993). Para el IFN β existe sólo una proteína, que es codificada por un distinto gen localizado junto al locus del IFN α en el humano y en el ratón. Se piensa que estos dos IFNs, también llamados IFNs tipo I, han evolucionado de un precursor ancestral común. Aún cuando estas dos clases de IFNs se unen al mismo receptor de superficie en células dianas susceptibles, indicando en esta forma las regiones funcionalmente básicas de las moléculas que han sido conservadas, sólo comparten una limitada relación antigénica y las proteínas solo despliegan de un 15 a un 30% de secuencias de aminoácidos homólogas (Pestka y Langer, 1997; Farrar y Schreiber, 1993). El IFN- γ no está relacionado a los IFNs tipo I, tanto a nivel genético como de su proteína codificada. No obstante que el IFN- γ lleva a cabo la mayoría de las actividades atribuidas a los otros interferones, le corresponde a él de 10 a 100 veces menor actividad antiviral, que a los otros dos pero a diferencia tiene de 100 a 10,000 veces más actividad como inmunomodulador que IFN α e IFN β (Pace et al., 1985; Farrar y Schreiber, 1993) Estas observaciones permiten caracterizar a los interferones α y β primariamente como agentes antivirales; y al IFN- γ primariamente como un inmunomodulador, que también puede ejercer alguna actividad antiviral. (Farrar y Schreiber, 1993) Cuadro 1.

1.1 Interferón Gamma

El IFN- γ es codificado por un solo gen, siendo este gen más complejo que los que codifican los otros interferones. El gen de humanos, como de ratón tiene un tamaño de 6 Kb. Técnicas de hibridación *in situ* han demostrado que este gen se encuentra en el cromosoma 12 en el humano y en el 10 en el ratón (Trent et al., 1982; Naylor et al., 1983). La estructura del ADN genómico de este interferón es fuertemente conservada, constituido por cuatro exones y tres intrones.

Cuadro 1.

Propiedades de los interferones			
Propiedades	IFN Alfa	IFN Beta	IFN Gamma
Nomenclatura	Tipo 1	Tipo 1	Tipo II
Principal inductor	Leucocito Virus	Fibroblasto Virus LPS ARN de doble cadena	Inmune Antígenos Mitógenos
Propiedades físicas			
Peso molecular (kDa)			
Predecible/madura	20/20	20/20-25	17/34-50
Aminoácidos	165-166	166	143
Uniones N-glicosiladas	Algunas especies	Si	2 sitios
Composición de subunidades	Una cadena	Una cadena	monocovalente homodímero
Estabilidad pH	Estable	Estable	Lábil
Estructura del Gen			
Número de genes	26	1	1
Localización del Cromosoma			
Ratón	4	4	10
Humano	9	9	12
Presencia de Intrones	No	No	3
Células Productoras	Células T, B y macrófagos	Fibroblastos y células epiteliales	Células T y Asesinas naturales
Receptor Celular			
Peso molecular (kDa)			
Predecible/madura	60.5/95-100		52.6/85-95
Aminoácidos	530		472
Estructura del dominio			
Extracelular	409 aminoácidos		228 aminoácidos
Transmembrana	21 aminoácidos		23 aminoácidos
Intracelular	100 aminoácidos		221 aminoácidos
Sitios de glicosilación	12		5
Localización Cromosomal			
Ratón	16	16	10
Humano	21	21	6

Farrar y Schreiber, 1993

La activación de un gen humano genera un ARN mensajero (ARNm) de aproximadamente 1.2 kb que codifica una proteína de 166 aminoácidos (Derynk et al., 1982; Gray y Goeddel, 1983), de los cuales 23 representan una secuencia señal hidrofóbica, con dos sitios N - glicosilados en el humano, cuando esta secuencia señal es removida proteolíticamente resulta en una cadena madura de 143 residuos, cargados positivamente con una masa molecular 17 kDa (Rinderknecht et al., 1984). La asociación de dos polipéptidos forman un homodímero no covalente que alcanza un peso molecular aproximado de 34 kDa en su forma madura, la cual incluye los azúcares. Solo en forma dimérica el IFN- γ puede tener actividad biológica, posiblemente porque ésta es la forma molecular que promueve la dimerización del receptor de IFN- γ (Fountoulakis et al., 1992).

El gen de ratón transcribe un ARNm de 1.2 kb que codifica a su vez a un polipéptido maduro de 134 aminoácidos con una masa molecular predecible de 15.4 kDa (Gray y Goeddel, 1983). A diferencia del IFN- γ humano, el de ratón aparece solo como un homodímero no covalente. Entre el IFN- γ de ratón y humano, solo se comparte muy pocos fragmentos homólogos, el 60% de su cADN y el 40% de sus aminoácidos. Estos bajos niveles de homología, podrían explicar por qué las proteínas de estas dos especies tienen una estricta especificidad de especie, con respecto a la habilidad para unirse a una célula humana o de ratón activada.

Las cadenas individuales de las dos especies pueden tener los sitios de glicosilación en diferentes residuos, teniendo como consecuencia una reducción en los pesos moleculares cuando son tratadas con glucosidasas, pero sin mostrar ninguna consecuencia importante en la expresión de la actividad de IFN- γ , sin embargo, esta reducción o carencia de azúcares parece influir en la vida media de la molécula porque la hace más susceptible a degradación proteolítica. (Kelker et al., 1983)

En la actualidad se conocen las regiones de IFN- γ que son importantes en la funcionalidad de la molécula. Tanto la terminal amino como la carboxilo juegan un papel crítico en el mantenimiento de la conformación activa de la proteína. Cuando se bloquea la terminal amino con anticuerpos monoclonales en el IFN- γ humano y en el de ratón, se bloquea la unión del receptor celular para IFN- γ y neutraliza la habilidad de éste para inducir la actividad antiviral en fibroblastos y la actividad citotóxica no específica en macrófagos. En cuanto a la terminal carboxilo, dependiendo del número de aminoácidos eliminados, depende la pérdida de funciones; así se tiene que si se eliminan 9 aminoácidos del IFN- γ humano, resulta en una pequeña o ninguna pérdida de la actividad biológica, pero si se remueven los residuos del 129 al 143 de la proteína resulta en una reducción entre 10 y 100 veces de la actividad específica de IFN- γ (Farrar y Schreiber, 1993)

1.2 Células Productoras de Interferón- γ

El Interferón- γ es producido predominantemente por dos tipos de células; células derivadas del Timo (T) o células citotóxicas naturales (células NK). La población de células T está compuesta por células CD4+ (T auxiliares) y células CD8+ (T supresoras / citotóxicas). Estas poblaciones pueden además subdividirse en población de memoria, de acuerdo con la expresión del isotipo de la proteína de superficie celular CD45. Las células de memoria (CD45RO+) de ambas poblaciones (CD4+ y CD8+) pueden producir niveles sustanciales de la proteína de IFN- γ , sin embargo, en las células de memoria CD45RA+ obtenidas del cordón umbilical o células T en la circulación del adulto se ha demostrado que presentan un deterioro en la habilidad para producir IFN- γ . La población de las células T CD4+ también ha sido subdividida en los subgrupos Th1 y Th2. En el humano y el ratón el subgrupo Th1 ha sido identificado por su habilidad para producir exclusivamente IFN- γ , interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF). El subgrupo de células Th2 primariamente produce interleucina 4, 5 y 10 (IL-4, IL-5 y IL10) (Mosmann et al., 1986; Young and Hardy, 1995).

La otra población de células productoras de IFN- γ en circulación es la de linfocitos grandes granulares o células NK. Se piensa, que éstas células son una de las primeras líneas de defensa contra infecciones virales y bacterianas y posiblemente del cáncer. Hay dos diferentes tipos de éstas poblaciones celulares; las que expresan niveles muy altos de CD56, se piensa que son células inmaduras y generalmente producen niveles más bajos de IFN- γ que la población más madura con expresión de CD56 dim (Spits et al., 1995).

En células CD4+, el estímulo fisiológico más importante para la producción de IFN- γ es el antígeno en el contexto de clase II de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHCII), a diferencia de las células CD8+, que el principal estímulo es la presentación de antígenos clase I del MHC. En células NK existen dos agentes importantes en la inducción de

síntesis de IFN- γ , IL-2 e IL-12 producidas por células T. Estas linfoquinas pueden actuar independientemente o sinérgicamente para estimular la producción de IFN- γ (Handa et al., 1983; Young and Hardy, 1995).

Existen otras células capaces de sintetizar IFN- γ , entre ellas se encuentran linfocitos de bazo, timocitos, linfocitos periféricos y algunas líneas de linfocitos T transformados .

En general IFN- γ es liberado en respuesta a varios estímulos inflamatorios incluyendo fitohemaglutininas, concavalina A, mitógenos, lipopolisacárido bacteriano, ésteres de forbol, ionóforos de calcio y sobre todo IL2. La secreción de IFN- γ por linfocitos dependiente de mitógenos, depende de la presencia de macrófagos, y se ha sugerido, que esta dependencia está dada más por un contacto célula-célula, que por productos secretados por el macrófago (Williams et al., 1993).

1.3 Actividades de Interferón- γ en Distintos Tipos Celulares

El IFN- γ es una citocina que juega un importante papel como modulador en todas las fases de la respuesta inmunológica e inflamatoria (Farrar and Schreiber, 1993). Esta acción moduladora está dada a concentraciones muy bajas de la citocina, tan bajas como picogramos, son suficientes para producir respuestas biológicas, sugiriendo que el interferón actúa en primer lugar como una molécula efectora paracrina (mediador local). Esta habilidad de producir efectos biológicos a concentraciones muy pequeñas es una característica de agentes que actúan en sistemas de señales de transducción altamente especializados (Williams et al., 1993). Las funciones más importantes del IFN- γ se encuentran resumidas en el cuadro 2. El IFN- γ actúa sobre células que poseen el receptor para IFN- γ (IFN- γ R) induciendo la expresión de una serie de genes, el espectro de esta inducción depende del tipo de célula y de la presencia de otras citocinas que pueden sinergizar o antagonizar su actividad. El receptor para IFN- γ , virtualmente se encuentra en todas las células del cuerpo, por lo tanto, muchos órganos y sistemas pueden tener respuesta a la acción de IFN- γ (Billiau et al., 1998).

Cuadro2.

Actividades biológicas de IFN- γ
Antitumoral
Antiviral
Antimicrobial
Citostasis
Diferenciación dirigida de líneas celulares
Expresión de antígenos MHC
Expresión de receptores para fracción cristalizable Fc
Activación de macrófagos
Activación de poliformonucleares
Activación de células NK
Activación de linfocitos
Activación de células endoteliales

Williams et al., 1993

1.3.1 Células presentadoras de antígeno (APCs)

El IFN- γ es especialmente conocido por aumentar la actividad en células presentadoras de antígeno. Entre las llamadas APCs profesionales, se encuentran las células dendríticas, fagocitos mononucleares y linfocitos B, las cuales constitutivamente expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) Clase II, aumentando, por lo tanto la efectividad de la presentación de antígeno a células T CD4+. IFN- γ también puede aumentar moléculas de clase I en las células que presentan péptidos endógenos a células T citotóxicas CD8+ (York I. and Rock K., 1996)

La elevación de la expresión molecular de antígenos clase I y clase II sobre la superficie de las células después de la exposición a IFN- γ conlleva a la regulación a la alta de una gran variedad de genes, de los cuales, sus productos desempeñan distintos papeles en las rutas de presentación de antígenos. (Boehm et al., 1997).

IFN- γ , tiene una función importante en la modificación de proteosomas, modulando la expresión de enzimas y componentes no enzimáticos. El proteosoma es un complejo enzimático formado por varias subunidades que es responsable de la generación de todos los péptidos que se unen a las proteínas de MHC clase I. En células tratadas con IFN- γ existe un aumento en la inducción del proteosoma 20S y de la subunidad no enzimática PA28. Esta proteína es un componente no enzimático del proteosoma que se une a él, alterando con esta unión su especificidad (Boehm et al., 1997; Groettrup et al., 1996). Finalmente IFN- γ incrementa la expresión de los procesadores asociados con la presentación del antígeno (TAP) TAP 1 y TAP2, los cuales transfieren péptidos generados por el proteosoma en el citoplasma, hacia el retículo endoplásmico, en donde ellos se unen a cadenas nacientes de MHC clase I. De esta manera, IFN- γ aumenta la inmunogenicidad, incrementando el repertorio y la cantidad de péptidos desplegados en asociación con proteínas MHC clase I (Epperson et al., 1992).

1.3.2 Células B

Cuando un antígeno extraño reacciona con la inmunoglobulina complementaria de superficie celular, los linfocitos B proliferan y se diferencian en células plasmáticas y células de memoria. Las células plasmáticas son las responsables de la producción de anticuerpos y las células de memoria antígeno – específicas, son las responsables de diferenciarse en células plasmáticas en subsecuentes exposiciones al mismo antígeno para iniciar la respuesta secundaria de producción de anticuerpos. En general para que las células B se activen ante la exposición al antígeno, requieren de la cooperación de las células T ayudadoras.

La actividad de IFN- γ sobre éstas células se cree que depende del grado de diferenciación en que se encuentre la célula. Células B en reposo, no parecen ser afectadas por IFN- γ , sin embargo, cuando las células B se encuentran preactivadas son inhibidas para su nueva diferenciación, sobre todo la diferenciación requerida para la producción de Inmunoglobulina M (IgM). En poblaciones celulares maduras, IFN- γ tiene efectos antiapoptóticos (Abed, et al, 1994), a diferencia del efecto reportado en estudios *in vitro* con cultivos de líneas celulares normales preB de ratón y de humano, donde las células continúan hacia la apoptosis (Billiau et al., 1998).

Se ha visto que el papel de IFN- γ es disminuir la respuesta inmunológica secundaria, presumiblemente por un efecto en la función de las células de memoria (Williams et al., 1993).

También se ha encontrado que IFN- γ disminuye la síntesis de Inmunoglobulina 2A (Ig2A) cuando las células B son estimuladas con IL-2 o con lipopolisacárido (LPS). También tiene un efecto antagónico sobre la síntesis de Inmunoglobulina E (IgE) inducida por IL-4 (Stark et al., 1998). Debido a la actividad de IFN- γ , los linfocitos B son capaces de intercambiar cadenas pesadas de Ig, lo cual es muy importante, porque los diferentes isotipos de Ig, promueven distintas funciones efectoras en el huésped, es así como IFN- γ puede facilitar la interacción entre la respuesta inmune humoral y celular, incrementando la defensa del huésped contra

ciertas bacterias o virus (Snapper et al., 1988). Además, también se sabe que en células B, IFN- γ inhibe la expresión de MHC clase II, dependiente de IL-4 (Mond et al., 1986).

1.3.3 Células T

El IFN- γ juega un papel dual en el proceso de desarrollo y diferenciación de células T auxiliares CD4+. En primer lugar facilita la producción de Th1 promoviendo el aumento de IL-12 en células presentadoras de antígeno. IL-12 es el efector proximal que dirige la diferenciación a células Th1. Además, IFN- γ mantiene la expresión de la subunidad 2 β del receptor para IL-12 en las células T CD4+ que se están diferenciando, preservando su capacidad para responder a IL-12 (Szabo et al., 1997). En segundo lugar, IFN- γ bloquea la diferenciación de células Th2 inhibiendo la producción de IL-4, el cual es requerido para la formación de este tipo de células, suspendiendo así su proliferación. También IFN- γ es un activador o señalizador de muerte para clones de Th1, dependiendo del tipo de coestímulo que ocurre durante su activación (Gajewski and Fitch, 1988; Liu and Janeway, 1990;). Sin embargo, se ha reportado un efecto contrario de IFN- γ , sobre células T malignas de humanos y ratón, en las cuales se promueve la proliferación celular (Novelli et al., 1994)

IFN- γ , IL-1 e IL-2 están estrechamente relacionadas en la activación de células T. IFN- γ actúa indirectamente promoviendo la proliferación de células T por medio de la inducción en el macrófago de liberación de IL-1, la cual regula a la alta los receptores celulares para IL-2. IL-2, a su vez, estimula la proliferación e induce citotoxicidad a células T. (Williams, et al., 1993).

1.3.4 Células endoteliales

Otro importante blanco de IFN- γ es la célula endotelial. IFN- γ está entre las citocinas que aumentan la expresión de Moléculas de Adhesión Intracelular 1 (ICAM-1) resultando en un incremento en la adhesividad por la expresión de leucocitos de la integrina LFA-1, esto puede significar que el IFN- γ producido tempranamente en una forma inflamatoria inespecífica (por ejemplo en células NK) es co-responsable para una adhesión firme de linfocitos a las células endoteliales en venas postcapilares, como un preludio a su esparcimiento y su posterior diapedésis (Billiau et al., 1998). ICAM-1 es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de genes de las inmunoglobulinas, sirve como un ligando específico para receptores expresados en los leucocitos; también juega un papel importante en la adhesión y trasmigración de leucocitos a sitios de inflamación, y regula a la alta la expresión de esta misma glucoproteína durante la respuesta inflamatoria aumentando por lo tanto, la migración de los leucocitos (Naik et al., 1997).

1.3.5 Células hematopoyéticas

En las células hematopoyéticas progenitoras, el IFN- γ generalmente desempeña una actividad supresora para este tipo de células en etapas de desarrollo temprano cuando actúa como un agente único, pero cuando está presente en la médula ósea junto con otras citocinas, incluyendo IL-3 y factor de célula madre (stem cell factor-SCF), puede actuar como amplificador del desarrollo de célula progenitora (Shiokara et al., 1993).

IFN- γ puede tener efectos opuestos sobre la población de células, dependiendo de la expresión que se dé de la citocina en un microambiente localizado. Por si misma, la presencia de IFN- γ inhibe la proliferación y muerte celular de células progenitoras muy primitivas y promueve la proliferación de células progenitoras más maduras, ésto puede suceder en situaciones que requieran de un aumento en la demanda de células sanguíneas, tales como infección o inflamación, en donde se estimula la expansión de células progenitoras comprometidas, su diferenciación y proliferación a células maduras, y al mismo tiempo reservarlas de los

compartimentos de células muy primitivas para reclutarlas y que permanezcan almacenadas para evitar que estos compartimentos se agoten (Snoeck et al., 1994).

1.3.6 Neutrófilos y polifomonucleares

IFN- γ es un potente activador de las funciones de leucocitos polimorfonucleares (PMN), promueve su acumulación en el sitio de inflamación, inhibiendo su salida después de que ellos han sido reclutados por quimioatrayentes, pero, aunque IFN- γ aumenta la adhesión endotelial, éste no incrementa la unión de PMN al endotelio. Esta activación puede depender en parte de la inducción de receptor de la fracción cristalizable (FcR), que es mediada a través de mecanismos que resultan en la supervivencia de PMN en un estado totalmente funcional (Williams, et al., 1993).

Uno de los mecanismos primarios de remoción de patógenos es la fagocitosis por PMN. La fagocitosis puede ser facilitada por la presencia de un anticuerpo unido a un antígeno extraño. La presencia de receptores para la fracción cristalizable (Fc) de los anticuerpos, aumenta la eficiencia de unión de los PMN a la partícula extraña, IFN- γ incrementa la expresión sobre PMN del receptor de alta afinidad para el Fc de la inmunoglobulina G (IgG), lo que repercute en un incremento en la unión e ingestión de partículas cubiertas con esta Ig (Young and Hardy, 1995). Además IFN- γ por si mismo tiene mínimos efectos sobre el metabolismo oxidativo y producción de anión superóxido, pero dramáticamente aumenta el anión superóxido en PMN con la presencia de un coestímulo, como es el caso de lipopolisacáridos, n-formil-metionina o esteres de forbol. Este efecto de imprimación puede ser abolido por inhibidores de síntesis de proteínas (Williams, et al., 1993).

1.3.7 Monocitos/ macrófagos.

Los macrófagos y los neutrófilos, que son las dos células fagocíticas especializadas, se originan en la médula ósea a partir de una célula progenitora común denominada célula progenitora de granulocitos y macrófagos (GM), debido a la actividad de diferentes citocinas o factores estimuladores de colonias (CFSs) los GM se diferencian formando colonias. La población más inmadura en la médula ósea que exhibe características de macrófagos está representada por monoblastos, éstas células dan lugar a promonocitos y monocitos en la misma médula ósea. De aquí, los monocitos entran a circulación y en respuesta a diferentes estímulos, como pueden ser, la presencia de linfocinas, cuerpos extraños o infección, migran hacia los órganos y tejidos, donde ellos se diferencian a macrófagos (Vermeulen et al., 1987). Una parte de estos macrófagos diferenciados da lugar a una extensa población de macrófagos inmóviles en piel, pulmones, hígado e intestino.

Los macrófagos funcionan como una población celular clave en la respuesta efectora innata y adaptativa de la respuesta inmune, además de ser considerada la primera línea de defensa de un organismo contra agentes infecciosos (Buchmeier and Schreiber, 1985). Para que el macrófago pueda desempeñar estas funciones, debe primero activarse, lo cual es un proceso reversible que involucra una serie de cambios bioquímicos y funcionales que les generan cambios importantes en su morfología, metabolismo y fisiología (Adams and Hamilton, 1984).

Ahora se sabe que IFN- γ , es uno de los principales factores de activación de macrófagos (MAF) que influye en la mayoría de las funciones de ésta célula, incluyendo procesamiento y presentación de antígeno, eliminación de antígenos intracelulares, citotoxicidad contra células tumorales y elaboración de citocinas, sin pasar por alto el reclutamiento de monocitos/macrófagos, promoviendo por lo tanto, su diferenciación mielóide (Williams, et al., 1993).

Probablemente lo más relevante en la presentación de antígeno, es la inducción de la expresión a la alta de los genes de MHC II y la expresión de las proteínas traducidas en la superficie del macrófago, siendo ésta, una respuesta a la actividad de IFN- γ . Ambos, macrófagos como línea

celular y como macrófago normal pueden ser inducidos a la expresión de MHC clase II (isotipos HLA-DR, DQ y DP en el humano y IE y IA en el ratón) por la acción de esta citosina. Un antígeno extraño puede ser reconocido por los linfocitos T, solo formando un complejo con los antígenos de MHC clase II de los macrófagos, dado que cuando un antígeno es detectado por un macrófago, o éste se encuentra ya en un proceso inflamatorio, su membrana, sufre dramáticos cambios y expresa en ella los antígenos MHC tipo II (Glimcher and Kara, 1992)

Otra de las rutas activadas por IFN- γ en el macrófago, es la síntesis de óxido nítrico (NO), en donde se involucran dos mecanismos muy importantes como la producción intermedia de nitrógeno y oxígeno reactivos. El oxígeno reactivo intermediario es generado como un resultado del ensamble de NADPH oxidasa, formada como resultado de una translocación inducida de dos subunidades enzimáticas citosólicas hacia la membrana plasmática, donde se combinan con el citocromo b558, un componente de la cadena de transporte de electrones asociado a la membrana. Esta enzima efectúa una transferencia de un electrón al oxígeno, produciendo un anión superóxido, el cual en su turno, es usado para generar más componentes oxígeno-tóxicos, como peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. El intermediario de nitrógeno reactivo, particularmente óxido nítrico (NO), son generados en macrófagos de ratones como resultado de una transcripción del gen que codifica la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) la cual es dependiente de IFN- γ , donde el factor1 regulado por IFN (IRF1) es indispensable para la inducción de iNOS (Kamijo et al., 1994). Esta enzima cataliza la formación de grandes cantidades de NO, el cual elimina a células blanco por uno de dos mecanismos. Primero, este puede formar un complejo nitrosil-hierro con los grupos Fe-S de aconitasa, complejo I y complejo II, inactivando así la cadena de transporte de electrones mitocondrial, provocando el aumento en la obtención de energía por la vía de la glucólisis, reduciendo la cantidad de ATP y decreciendo la síntesis proteica. Estas alteraciones metabólicas son similares a los efectos desencadenados por NO en células tumorales. Alternativamente, NO, puede reaccionar con el anión superóxido para formar peroxinitrito, el cual se descompone rápidamente a una forma altamente tóxica de radicales hidroxilo (MacMiking et al., 1997). Se ha encontrado que en algunas líneas celulares, los macrófagos son capaces de inducir muerte apoptótica en algunas células tumorales usando NO como efector citotóxico, sin necesidad del contacto íntimo entre las células (Albina and Reichner, 1998).

IFN- γ modula la expresión de otras moléculas de superficie incluyendo receptor FcR1 para IgG monomérica y ciertos antígenos asociados a tumor. Este receptor ayuda al reconocimiento, adherencia y activación de fagocitos, resultando en un aumento en la eliminación de bacterias y células tumorales.

Los macrófagos elaboran una gran variedad de mediadores inflamatorios, muchos de estos mediadores posteriormente modulan las funciones de los linfocitos. IFN- γ amplifica la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) y IL1, cuando el IFN- γ es acompañado de endotoxinas, la síntesis y de estas dos monocinas se aumenta significativamente (Williams et al., 1993).

Se ha visto también que en macrófagos humanos, IFN- γ estimula la síntesis y secreción de factores de complemento B y C2, esta respuesta es comparable con la obtenida en macrófagos de ratón en la síntesis y secreción también del componente C3 de complemento (Strunk et al., 1985).

1.4 Ruta de Señalización

Para que la señalización de IFN- γ se lleve a cabo, se requiere de la participación de los siguientes componentes: a) Un IFN- γ dimérico, b) 2 proteínas integrales de membrana tipo 1; IFN γ receptor1 (IFN γ R1) e IFN γ receptor2 (IFN γ R2), éstas proteínas constituyen las subunidades del receptor para IFN- γ , c) las proteínas Janus Quinasas 1 y 2 (JAK1, JAK2), y, d) Proteína transductora de señal y activadora de transcripción 1 (STAT1). Se piensa que la mayoría de los procesos biológicos generados por IFN- γ en vivo y en vitro se generan por esta vía. (Stark et al., 1998).

1.4.1 Receptor

El receptor para IFN- γ está conformado por dos subunidades, cada una de ellas constituida a la vez de dos cadenas polipeptídicas (Marster et al., 1995). Estas dos subunidades, pertenecen a la clase 2 de la familia de receptores de citocinas, caracterizados porque su dominio intracelular de cada subunidad, carece de actividad intrínseca de cinasa o fosfatasa (Bazan F. 1990). Este receptor, es expresado en todas las células (con la posible exclusión de los eritrocitos maduros) y cuya característica es que produce una alta especificidad de especie para unir IFN- γ debida a los dominios extracelulares (Bach et al., 1997).

La subunidad IFN γ R1, (llamadas anteriormente las cadenas α o CD19w), está codificada por un gen de 30 Kb, localizado en el brazo largo del cromosoma 6 en el humano (Aguet et al., 1988, su homólogo de ratón es un gen de 22 Kb, presente en el cromosoma 10 (Hemmi et al., 1994). Ambos genes (ratón y humano) están formados por 7 exones, de los cuales, del exón 1 al 5 codifica el dominio extracelular del receptor, el exón 6 codifica una pequeña porción del dominio extracelular y el dominio transmembrana completo, y el exón 7 codifica el dominio intracelular del receptor. Este gen no es regulado por estímulos externos. La transcripción de este gen en humano y ratón, da como resultado un ARNm transcrito de 2.3 Kb. El receptor es sintetizado en el retículo endoplásmico, de donde viaja hacia el aparato de Golgi, en este trayecto, es modificado por adición de N-glicosilaciones (carbohidratos unidos en sitios N) (Hersey and Schreiber, 1989; Fischer et al., 1990). En el dominio extracelular se han identificado secuencias importantes relacionadas a la especificidad de especie del proceso de unión ligando-receptor. A diferencia del dominio intracelular, donde se encuentran dos distintas regiones involucradas en la señalización y transducción (Farrar et al., 1993; Hemmi et al., 1994; Schindler and Darnell, 1995;).

El IFN γ R2, llamado anteriormente cadena β o factor 1 accesorio, está codificado por un gen localizado en el cromosoma 21q22.1 en el humano, y en el ratón se encuentra en el cromosoma 16, éste gen consta de 17 Kb y está formado por 7 exones. La transcripción de este gen, genera un ARNm de 1.8 Kb en el humano y de 2 Kb en el ratón(Farrar MA y Schreiber RD., 1993; Bach et al., 1997).

En esta subunidad IFN γ R2, se ha encontrado también, un dominio intracelular muy importante para la ruta de señalización, ya que interviene en la estabilización del complejo formado entre el ligando y el IFN γ R1 (Marsters et al., 1995).

En un estudio realizado con ratones mutados para el gen que codifica IFN γ R2, se encontró, que estos ratones despliegan grandes defectos en las respuestas a IFN- γ . Las diferencias observadas fueron primero una falla en la inducción de la expresión de genes, al parecer dada por una deficiencia en la activación de STAT 1. Los linfocitos B, también se ven afectados por la disfunción de IFN γ R2, los cuales no pueden llevar a cabo las funciones desencadenadas por IFN- γ inhibiendo el intercambio de cadenas pesadas de Ig; producción de Ig2, sin olvidar la inhibición el intercambio de IgE e IgG1. También se encontró alteraciones en la diferenciación de células Th1 y en la inmunidad celular. Con todos estos cambios en diferentes tipos celulares

a causa de la disfunción de INFGR2, se ha demostrado el papel esencial que tiene IFNGR2 en la respuesta inmune mediada por IFN- γ , activando la ruta JAK -y STAT (Lu et al., 1998). Las propiedades de cada una de estas subunidades del receptor para interferón- γ , se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3.

Propiedades de las subunidades INFgR1 e IFNGR2 del receptor para IFN- γ					
Propiedades	INFgR1			IFNGR2	
	Humano		Ratón	Humano	Ratón
Secuencia primaria					
Péptido señal	17 aa		26 aa	21 aa	18 aa
Forma madura	472 aa		451 aa	316 aa	314 aa
Homología		52%		58%	
Localización en el cromosoma	6		10	21	16
Estructura del dominio					
Extracelular	228 aa		288 aa	226 aa	224 aa
Transmembrana	23 aa		23 aa	24 aa	24 aa
Intracelular	221 aa		200 aa	66 aa	66 aa
Sitios potenciales N-glicosilados	5		5	5	6
Peso molecular (kDa)	52.5		49.8	34.8	35.6
Tirosinas intracelulares conservadas		5		3	

Bach et al., 1997

1.4.2 La familia Janus Quinasa (JAKs)

Esta familia representa a distintas tirosinas quinasa solubles, que han sido implicadas en la transducción de señales de muchos miembros de la familia de citocinas. En mamíferos los Jaks que han sido identificados son JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2.

Aunque hay discusión en cuanto a los substratos de JAKs, las tirosinas fosforiladas de los receptores, forman sitios desembarcadero para proteínas con dominios de fosfotirosina unidos, los cuales en su momento, también son substratos para JAK. La familia de factores de transcripción STAT, es un ejemplo.

En humanos el gen para JAK1 reside en el cromosoma 1p31.3 y JAK2 en el 9p24, en el ratón los genes se encuentran localizados en el cromosoma 4 y 19, respectivamente (Leonard y O'Shea, 1998).

Las características que distinguen a la familia Jak de la familia proteínas Tirosina Quinasa (PTK), es la existencia en el genoma de dominios de pseudoquinasa, junto con dominios catalíticos auténticos (tandem de dominios de pseudoquinasa y quinasa). También se han

detectado 7 segmentos de homología (JH) del JH1 al JH7, siendo importante puntualizar, que a excepción de JH1 o dominio catalítico, las demás regiones permanecen poco estudiadas. El dominio JH1 tiene la característica de un dominio típico de tirosina quinasa, en donde los residuos de tirosina, juegan un papel importante en la regulación de la actividad catalítica (Leonard y O'Shea, 1998).

El dominio JH2 o pseudoquinasa, podría tener la función de sitio desembarcadero para otras moléculas de señalización. Este dominio también se asocia con los STATs.

En cuanto a la terminal N (amino) de la molécula de JAKs, se le ha comprobado la habilidad para unir la citosina al receptor.

Sólo JAK1 y JAK2 participan en la ruta de señalización de IFN- γ y se caracterizan por ser largas proteínas de aproximadamente 1150 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 120 - 135 kDa. El ARN transcrito presenta un rango de 4.4 a 5.4 kb de largo, y JAK2 presenta dos transcritos. Estas quinastas, son expresadas en muchas células de diferentes tejidos, lo cual es explicable por la amplia distribución de la actividad de las citocinas en diferentes órganos (Schindler y Darnell J.1995).

En la ruta de señalización desencadenada por la unión de IFN- γ con su receptor, IFN γ R1 se asocia con JAK1 e IFN γ R2 se asocia con JAK2.

Por lo tanto, JAKs satisfacen dos criterios claves que podrían ser básicos en la unidad de la transducción de señal usada por receptores de citocinas: la primera, la asociación física con subunidades del receptor, y la segunda, que ellos son componentes esenciales de la propia señalización (Leonard y O'Shea, 1998).

1.4.3 Proteínas transductoras de señal y activadoras de transcripción (STATs)

STATs, pertenecen a una familia de proteínas latentes en el citoplasma que son activadas para participar en el control de genes cuando la célula se encuentra con uno o varios polipéptidos extracelulares. Estudios bioquímicos y de genética molecular, las han definido como moléculas dimericas con un sitio de fosforilación de tirosina, un dominio de unión 2 fosfotirosina (SH2), con secuencia homóloga a Src (proteína quinasa asociada a membrana que fosforila proteínas diana sobre residuos de tirosina), un dominio de interacción con ADN y varios dominios de interacción proteína-proteína.

En general, la ruta que estas proteínas recorren desde su activación hasta la regulación de la transcripción de algunos genes, se lleva a cabo de la siguiente manera: Cuando un polipéptido extracelular interactúa con su respectivo receptor de superficie, desencadena la activación de factores de transcripción que se encuentran latentes en el citoplasma, los STATs. Estas proteínas activadas se fosforilan en la tirosina, posteriormente se dimerizan por interacción recíproca de su fosfotirosina SH2 y entran al núcleo para regular la transcripción de varios genes (Darnell J., 1977).

En mamíferos se conocen 7 de estas proteínas: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT5b y STAT6. (Leonard y Lin, 2000). En general estas proteínas constan de 750 a 800 aminoácidos, con la probable excepción de STAT2 y STAT6, las cuales constan aproximadamente de 850 aminoácidos.

Las proteínas STAT desempeñan 6 funciones esenciales; a) unir tirosinas fosforiladas, b) fosforilar ellas mismas sus tirosinas, c) dimerizarse, d) translocarse hacia el núcleo, e) unirse al ADN, y f) modular la expresión de genes (Kasuroni I. y Leonard J.,2000).

STAT1, es la única proteína de este grupo que se activa por medio de IFN- γ , los genes que la codifican se encuentran como agregación (grupo) cromosomal sobre el cromosoma 1 en el ratón (Bach et al., 1997; Leonard y O'Shea, 1998) y que en el cromosoma humano equivale a 2, banda q12 a q3 (Schindler y Darnell J.1995; Darnell J Jr., 1997)

STAT1 α fue la primera proteína descrita en dos formas; como una proteína constituida por 750 aminoácidos, y también como una proteína con su terminal carboxil -COOH en el aminoácido

712, la cual se conoce como STAT1 β . Estas dos proteínas tienen funciones distintas, y se cree que estas diferencias son debidas al proceso de maduración del ARNm (Schindler y Darnell, 1995).

1.4.4 Mecanismo de transducción de la señal.

El conocimiento de la ruta de señalización es el resultado de un largo proceso de experimentación conducidos a la par con estudios de caracterización del receptor de IFN- γ , los cuales, identificaron dos clases de proteínas involucradas en la respuesta celular mediada por IFN- γ . La primera clase, llamada proteínas STAT, y la segunda que consiste en un grupo poco usual de proteínas tirosina quinasas, llamada JAKs, ambas descritas anteriormente. La combinación de éstos dos hallazgos, permitieron la definición de una nueva ruta de transducción de señales, actualmente conocida como la ruta JAK-STAT, que es la responsable de la mediación de la activación, si no de todos, de la mayoría de los genes inducibles por IFN- γ (Schindler y Darnell, 1995; Heim M., 1999).

El IFNgR1 presenta dos regiones distintas muy importantes en la señalización y transducción en el dominio intracelular. La primera, proximal a la región transmembrana, con la secuencia en las posiciones 266-269 Leu-Pro- Lys- Ser (LPKS), teniendo un papel funcionalmente dominante la prolina en la posición 267 tanto para la internalización del receptor-ligando, como en la respuesta biológica (es donde se une con JAK1). La segunda región, cerca de la terminal carboxil, con la secuencia Tyr-Asp-Lys-Pro-His (YDKPH) en las posiciones 440-444, siendo especialmente importante Tyr-440 (Y-440) y secundariamente, Asp-441 (D-441) y His-444, los cuales son requeridos para la respuesta biológica, (es donde se une con STAT1) (Bach et al., 1995; Kaplan et al., 1996).

En la subunidad del receptor, IFNGR2 ha mostrado un dominio intracelular muy importante para la señalización, que se encuentra en la región proximal a la membrana constituido por 66 aminoácidos, con dos secuencias espaciadas (263-PPSIP-267 y 270-IEEYYL-274), éstas secuencias tienen un papel obligado en la inducción de la respuesta (donde se une con JAK2) (Bach et al., 1997)

Se han realizado estudios con mutantes de IFN- γ , que se unen solo a una cadena de la molécula de IFNGR1, para determinar si este Interferón- γ monovalente (molécula diseñada), que solo activa una cadena del receptor, es decir, que puede unirse con la mitad del complejo receptor (a una cadena de IFNgR1 y a una cadena de IFNgR2), puede activar la señal de transducción, y conocer, si esta señal de transducción es suficiente para tener completa la bioactividad del IFN- γ . Los resultados obtenidos demuestran que esta activación de la mitad de 4 cadenas del complejo receptor, es suficiente para la activación de STAT1 α , inducción del antígeno de superficie CMH clase I, y actividades antiproliferativas y antivirales. Sin embargo, la interacción del ligando con ambas subunidades del complejo del receptor es requerida para una alta afinidad de la actividad de IFN- γ y una máxima activación eficiente del complejo receptor IFN- γ (Krause et al., 2000)

En células no estimuladas, las subunidades del receptor para IFN- γ , no se preasocian fuertemente, pero cuando el ligando se une a su receptor, induce el ensamble de un complejo receptor activado para IFN- γ que consiste en dos cadenas de IFNgR1 y dos cadenas de IFNgR2. En estudios realizados en el sistema de transducción de señal mediada por el sistema receptor de IL-6, (gp 130), se revelaron dos secuencias importantes en el dominio intracelular proximal a la membrana de este receptor que se conservaron entre los miembros de la superfamilia de receptores para citocinas. Estas secuencias fueron llamadas caja 1 y caja 2 (Murakami et al., 1991). Posteriormente se demostró, que estas cajas son importantes en la mediación de la interacción entre ciertos dominios citoplasmáticos del receptor de citocinas y JAKs (Tanner et al., 1995).

Esta información fue de mucha ayuda en la definición de la interacción de las subunidades del receptor para IFN- γ con miembros específicos de la familia de JAK. Para saber, si secuencias similares encontradas en las subunidades IFNgR1 e IFNgR2 del receptor de IFN- γ , tenían la misma función que las secuencias encontradas en el sistema gp130, se llevaron a cabo estudios de coprecipitación en células tratadas con IFN- γ y las células control. En las células control, el IFNgR1 se asoció con una forma inactiva de JAK1, siendo esta asociación específica, porque siempre ésta subunidad se asoció a JAK1. A diferencia de las células tratadas con IFN- γ , las moléculas JAK1, asociadas al IFNgR1, se activaron a través de la fosforilación de la tirosina (Igarashi et al., 1994). En estudios posteriores, usando el método de mutagénesis de barrido de alanina, se encontró que JAK1 se une al dominio intracelular de IFNGR1, a través de la secuencia de 4 residuos –²⁶⁶LPKS²⁶⁹, siendo esta activación dependiente del ligando (Kaplan et al., 1996). Estudios similares, y con otras técnicas, han demostrado que el dominio citoplasmático de IFNgR2, se asocia con JAK2 en forma constitutiva y de manera específica, por medio de una secuencia de 12 residuos similar a la caja 1 y 2 rica en prolina -²⁶³PPSIPLQIEEYL²⁷⁴, localizada a 13 aminoácidos de la membrana (Kotenko et al., 1995; Sakatsume et al., 1995; Kaplan et al., 1996). Mutaciones hechas en esta región, no permitieron la interacción entre IFNgR2 y JAK2, inhibiendo totalmente, la respuesta biológica inducida por IFN- γ (Bach et al., 1996).

Estudios posteriores han determinado una única función obligada del dominio intracelular de IFNgR2, que es la de servir de chaperona a JAK2 dentro del complejo ligando-receptor activado, al mismo tiempo se ha sugerido que JAKs pueden desplegar un cierto nivel de especificidad de sustrato que obliga a su participación en la ruta JAK-STAT, y que no puede ser reemplazado por otras clases de proteínas tirosina quinasas (Bach et al., 1996). Se ha sugerido, por lo tanto, que la especificidad desplegada por la familia JAK, reside en el nivel de la asociación receptor-enzima (Kotenko et al., 1995), pudiendo concluir que JAKs son muy importantes para la activación de la ruta JAK-STAT, pero no son una fuente de especificidad para la misma ruta (Bach et al., 1997).

La activación de JAK2 ocurre primero y es necesaria para la subsecuente activación de JAK1, el cual desempeña un papel como enzima, además de su papel estructural. (Briscoe et al., 1996) (Fig.1)

El sitio de tirosina fosforilado de JAK, sobre la cola intracelular del receptor sirve como sitio desembarcadero para los dominios SH2 de STAT1, entonces, 2 moléculas de STAT1 latentes se unen a estos sitios, sobre su tirosina 701 cercana al C terminal (Darnell J Jr., 1997; Stark et al., 1998). Una vez efectuada ésta fosforilación, STAT1, se disocia del receptor y se divide en moléculas homodímeras, que son competentes para translocarse y unirse al ADN. Es importante señalar en este punto, que monómeros de STAT1, son incapaces de lograr la unión con el ADN (David et al., 1995; Wen et al., 1995). La translocación se efectúa por medio de un mecanismo dependiente de la actividad como GTPasa de Ran/TC4 como GTPasa (Stark et al., 1998).

Las células estimuladas con IFN- γ requieren al menos, de los 38 aminoácidos terminales y la propia terminal COOH- de STAT1 para una completa activación de genes.

STATs interactúan con un gran número de proteínas que sirven como puente entre los factores de transcripción y la ARN polimerasa II, entre ellas se encuentran dos largas proteínas nucleares con secuencias similares llamadas p300 (~ 2500 residuos) y proteína unida a CREB (CBP CREB binding protein). Estas proteínas se unen a los factores de transcripción por medio de la serina fosforilada, similar a la unión que lleva a cabo CREB. La función de estas proteínas parece estar relacionada con la relajación de la cromatina cerca del sitio de inicio de la

Respuesta celular a $\text{INF}\gamma$

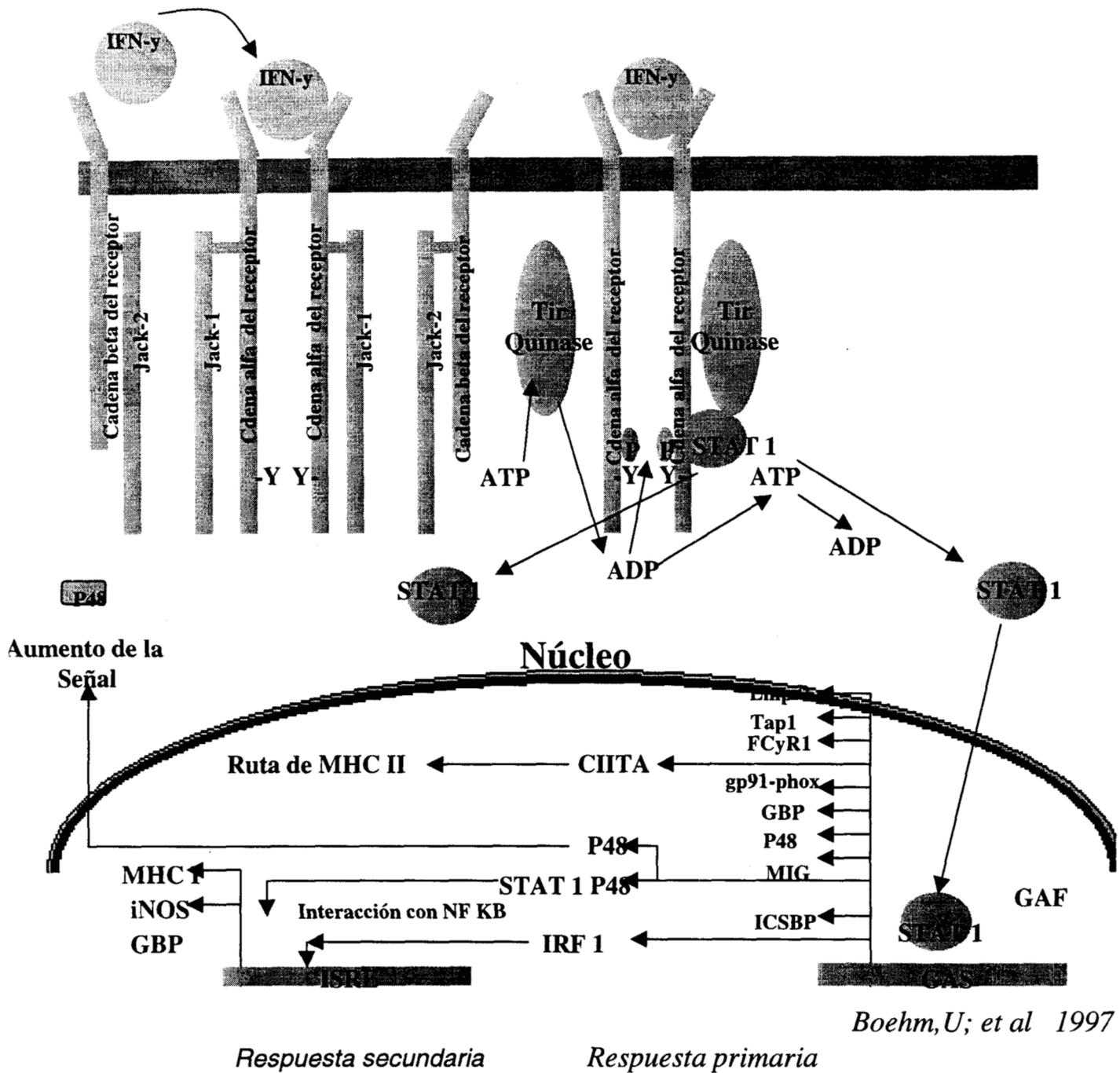


Fig. 1. Los componentes claves de la ruta de señalización de $\text{INF}\gamma$ son los receptores de $\text{INF}\gamma$ cadenas α ($\text{INF}\gamma\text{R1}$) y β ($\text{INF}\gamma\text{R2}$), JAK quinasa 1 y 2 (JAK1, JAK2) y transductor de señal y activador de transcripción 1 (STAT1). Cuando el receptor se une a su ligando se induce el ensamble dos cadenas de $\text{INF}\gamma\text{R1}$ con JAK1 permitiendo la dimerización de $\text{INF}\gamma\text{R2}$ con su respectivo JAK2, los sitios de JAK1 fosforilados forman sitios desembarcadero para STAT1 que se encuentra en el citoplasma, el cual se fosforila y se disocia del receptor dividiéndose en dos moléculas, las cuales son translocadas al núcleo como homodímeros transcripcionalmente activos (GAF), los cuales se unen a los sitios activados por gamma interferón (GAS) de los promotores de los genes de respuesta primaria a $\text{INF}\gamma$, algunos de los cuales actúan también como activadores de transcripción cuando se unen a elementos de respuesta estimulados por $\text{INF}\gamma$ (ISRE) de los promotores de genes que responden secundariamente a $\text{INF}\gamma$.

transcripción. STAT 1 interactúa con CBP y p300 en al menos dos diferentes sitios en cada molécula (Damell J Jr., 1998).

Ya en el núcleo los homodímeros activados de STAT1 se unen a las regiones promotoras de los sitios activados por interferón gamma (GAS), promoviendo la transcripción de los genes inducidos por IFN- γ (Horvai et al., 1997).

Esta activación transcripcional dirigida, podría ser la respuesta primaria a IFN γ , porque para esto no se requiere de la síntesis de nuevos factores de transcripción. Algunos genes de la respuesta primaria, son ellos mismos factores de transcripción y son requeridos para la inducción de una siguiente respuesta secundaria a Interferón.

El nivel de STAT1 α fosforilado es regulado negativamente por la ruta de ubiquitina-proteosoma, decreciendo después de un pico a los 15 – 30 min. hasta niveles bajos en 1-2 hr. (Kim y Maniatis, 1996). Después de la señalización, el complejo IFN γ -IFN γ R1 es entonces internalizado y disociado. En la mayoría de las células, la cadena α desacoplada, es reciclada a la superficie celular (Kim y Maniatis, 1996).

IFN- γ eleva la expresión de STAT1 y p48, los cuales se unen a sitios específicos de unión del ADN, llamados elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE), activándose de esta forma la respuesta secundaria iniciada por IFN- γ . (Bohem et al., 1997; Contursi et al., 2000), así son activados para su transcripción, ya sea, primaria o secundariamente los genes estimulados por IFN- γ (ISGs).

Hasta ahora se cuenta con estudios que identifican algunos genes expresados a partir de la unión de IFN- γ con su respectivo receptor, la mayoría de ellos activados por la ruta JAK-STAT (Bohem, 1997; Der, et al., 1998; Roy, et al., 2000). Estos estudio se han realizado con dosis muy variadas de IFN- γ , y utilizando diversos tipos y líneas celulares.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IFN γ pertenece a la familia de inmunomoduladores que influye profundamente en las funciones de los macrófagos, desde su activación, hasta los efectos finales como aumento de citotoxicidad, presentación de antígeno, fagocitosis y producción de citocinas, entre las más importantes, las cuales modulan su actividad en los procesos infecciosos e inflamatorios. El proceso inflamatorio, está involucrado en una gran variedad de enfermedades, pudiendo ser éstas de orígenes diversos (infecciosas, metabólicas, inmunológicas). (Lucas et al., 1998; Billiau et al, 1998)

Debido a la importancia de las funciones desempeñadas por los macrófagos y la estimulación que en ellos ejerce IFN γ , es importante profundizar más acerca de los genes que son estimulados con este inmunomodulador y determinar si esta expresión difiere, dependiendo de la dosis usada. Esto sería un primer paso en la exploración de los mecanismos de señalización, o tal vez en un futuro, estos genes que muestran cambios importantes a dosis muy bajas de IFN γ , se pueden utilizar como indicadores de la actividad de los macrófagos en un proceso inicial de enfermedades caracterizadas por inflamación crónica, como en el caso de la aterogénesis. (Koening, 1999).

El objetivo de este trabajo es identificar el comportamiento en expresión de genes en macrófagos peritoneales de ratón, con tres concentraciones distintas de interferón- γ , determinando de esta manera, cuales son los genes más sensibles a dicha estimulación. Para poder monitorear la expresión de genes, se utilizaron microarreglos para expresión de cADN (ADN complementario). Con el uso de estos microarreglos, se puede obtener información diferencial de la expresión de cerca de 600 ARNm (Atlas TM Mouse cDNA Expression Arreglos),

en un solo experimento. Esta técnica está basada en el uso de cientos de cADN puestos sobre una membrana de nylon cargada positivamente, que se hibridizan con los cADNs sintetizados a partir de los ARNm problemas marcados radiactivamente. Estos microarreglos de cADN tienen dos características importantes, primero que la hibridación es específica debido al uso de cebadores específicos para cada uno de cADN contenidos en cada membrana, y segundo que incluyen ADN de bacteriófagos y plásmidos como controles negativos para confirmar la hibridación específica junto con algunos cADN constitutivos como control positivo, para normalizar los ARNm abundantes. Los resultados obtenidos muestran un mayor número de genes reprimidos, más que inducidos, en macrófagos, aún en la menor concentración usada de IFN γ ; regulación a la baja de genes asociados con la ruta de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF β), y finalmente, la identificación de factor 1 regulado por interferón (IRF1) e integrina alfa-L (LFA-1 α), como los indicadores más sensibles de la activación que IFN γ ejerce sobre los macrófagos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de macrófagos y aislamiento de ARN para microarreglos

Se usaron ratones C3H/Hej, hembras de 45 días de edad de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME) mantenidos en cajas con filtro en las tapas, alimentados con alimento estándar y agua ácida ad libitum. Se escogió esta cepa de ratón porque son altamente refractarios a la estimulación por endotoxinas y lipopolisacáridos (Pace et al., 1985).

A los ratones se les inyectó 2ml de tioglicolato intraperitonealmente para promover la diferenciación y movilización de macrófagos hacia el peritoneo. Estos ratones fueron sacrificados a las 72 hr. con Bióxido de Carbono, para la obtención inmediata de los macrófagos por medio de lavado peritoneal con 10 ml de medio RPMI 1640 (Gibco BRL, New York, USA) suplementado con 2% de suero fetal bovino (Hyclone Laboratories, Logan, UT. USA), sin exponer peritoneo.

La cuenta celular se realizó por medio de una cámara Neubauer 1/400 s.q.mm y 1/100 mm de profundo (Levy Ultra Plane. C.A. Hausser & Son. Phila. USA). Los macrófagos se sembraron en frascos de 150 cm² con ventilación en la tapa con una densidad de 2.6×10^7 células/ frasco, en un medio RPMI 1640 suplementado con 2% de suero fetal bovino e incubados por 24 hr. a 37⁰ C, también se sembró una placa de 24 celdas con una densidad de 350 000 células/ ml/celda, para comparar los resultados de producción de óxido nítrico en los frascos control y con tratamiento, como un indicador de actividad celular en los macrófagos (Shimizu et al., 1997).

A las 24 hr. de incubación, las células recibieron 50, 10 y 3 unidades de IFN γ /ml (IFN- γ recombinante murino Biosource Intl. Camarillo, CA), dejando igual número de frascos como control.

Después de 48 hr. de incubación, se procedió al aislamiento del ARN total. La purificación de ARN total se llevó a cabo usando Maxi "estuche" comercial Qiagen ARN/ADN (Qiagen INC. Valencia, CA). Las células contenidas en un frasco se lisaron inicialmente en 4 ml de QRL1-1% 2-Mercaptoetanol 98% (Aldrich Chemical Cia. IW. USA), transferidas posteriormente a un tubo para ser homogenizadas, pasando el lisado 10 veces, a través de una aguja de calibre 21 (21G 1^{1/2}), utilizando para ello una jeringa de 10 ml. Para diluir se le adicionó 4 ml de QRV1 y se recolectaron en un tubo Nalgene para ser centrifugado 20 min. a 13, 000 rpm en un rotor SW28 y en una centrifuga fría (j2-21 centrifuge Beckman). El sobrenadante fue transferido a un tubo de 30 ml libre de ARNs y se le adicionó 0.8 vol de isopropanol, se incubo en hielo por 5 min. y fue después centrifugado por 30 min. a 13,000 rpm en un rotor SW28. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue redissuelto en 2.5 ml de QRL1-1% 2-Mercaptoetanol 98% (Aldrich Chemical Cia. IW. USA), calentándolo por 3 min. a 65 °C y agitando en vortex. Ya

resuspendida la muestra, se le agregó 22.5 ml de QRV2 y fue mezclado y centrifugado a 5,000rpm en un rotor SW28 por 5 min., para posteriormente ser vaciado a una columna QIAGEN, la que fue primero equilibrada con 10 ml de QRE. Ya que toda la muestra pasó por la columna, ésta se lavó con 28 ml de QRW y el ARN total unido a la resina de la columna, fue separado por medio de buffer QRU precalentado a 45 °C y colectado en un tubo de 30 ml libre de ARNsa. Finalmente se le agregó 15 ml de isopropanol, se incubó 10 min. en hielo y se centrifugó por 30 min. a 13,000 rpm en un rotor SW28. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó 2 veces con 1 ml de etanol al 70%, y se dejó escurrir para remover el líquido residual. Se resuspendieron en 500 µl de agua libre de ARNsa y se cuantificaron por medio de espectrofotometría (Beckman).

Para eliminar los restos de ADN que pudieran haber permanecido en la muestra, 500 µl de ARN total se mezclaron e incubaron a 37 °C por 30 min. con 100 µl de buffer 10X ADNsa, 50 µl de enzima ADNsa 1 (1 unidad/µl) y 350 µl de H₂O desionizada (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Posterior a la incubación se le agregó 100 µl de mezcla de terminación (0.1M EDTA[pH 8.0]) 1 mg/ml de glicógeno, se divide en dos partes, y cada una de ellas se vertió en un tubo de 1.5ml para microcentrifuga. Dos veces, se le agregó 550 µl de cloroformo: isoamil alcohol (25:24:1), se mezcló y centrifugó a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge) durante 10 min. para separar fases. Se transfirió la parte superior acuosa a otro tubo de 1.5 ml para microcentrifuga. Se le agregó 550 µl de cloroformo isoamil alcohol (24:1) a la última capa acuosa obtenida, se mezcló en vortex y centrifugó por 10 min. a 14,000 rpm. Se removió nuevamente la capa superior acuosa, y se vertió en un tubo para microcentrifuga de 2 ml, se le adicionó 100 µl de 7.5 M NH₄ OAc y 1.5 ml de etanol al 95%, se mezcló y centrifugó a 14,000 rpm (Beckman Microfuge™12) durante 20 min., se removió el sobrenadante y el precipitado se cubrió cuidadosamente con 100 µl de etanol al 80%, se centrifuga a 14,000 rpm (Beckman Microfuge™12) por 10 min. y finalmente se quitó el sobrenadante cuidadosamente y se dejó secar el precipitado para que se evaporara el etanol residual.

Preparación de cADN

A partir del ARN total libre de ADN, se sintetizó la sonda de cADN. Con el "estuche" comercial SuperScript™ Preamplification System (Gibco BRL New York, USA). Para esto se utilizó una mezcla de cebadores para síntesis de cADN, CDS, primer mix (Clontech Palo Alto, CA, USA) (CDS, son primera específicos para cada uno de los genes que se encuentran en el microarreglo). Inicialmente se incuban a 70 °C por 30 min. la mezcla con 15 µl de ARN total con 2 µl de CDS primers mix, 6 µl de dATP marcados con fósforo 32 [α -³²P] y la cantidad restante con agua) para un volumen total de 22 ml, después se incubaba a 4 °C por 2 min., se le agrega una mezcla hecha con 4 µl de buffer PCR, 4 µl de 25 mM MgCl₂, 4 µl de mix 10X dNTP y 4 µl de 0.1M de DTT y se incubaba a 50 °C por 5 min., se le adiciona 2 µl de enzima transcriptasa inversa y se incubaba por 50 min. a 50 °C, se detiene la reacción con una incubación por 15 min. a 70 °C y se enfría a 4 °C. Toda la incubación se llevó a cabo en un termociclador (Minicycler™ MJ Research).

Los cADN se purificaron por medio de una columna de cromatografía -CHROMA SPIN-200 DEPC-H₂O- (Clontech Palo Alto, CA, USA) para eliminar los dATPs marcados que no fueron incorporados en la sonda y pequeños fragmentos de entre 15 y 1,000pb. El procedimiento es como sigue: Se vertió la reacción anterior en la columna, se lavó la columna en dos series, la primera con 40µl de agua y la segunda con 200 µl de agua. Se separan las sondas recolectando 6 fracciones de 100 µl de agua. Generalmente en la segunda y tercera fracción se encuentran las sondas.

Se verificó la radioactividad en las fracciones obtenidas mediante contador de centelleo (Beckman) con 2 µl de cada fracción y 5 ml de líquido para centelleo (Ready Protein+ Beckman Coulter, USA), en frascos especiales para centelleo (Fig.2).

Diagrama General

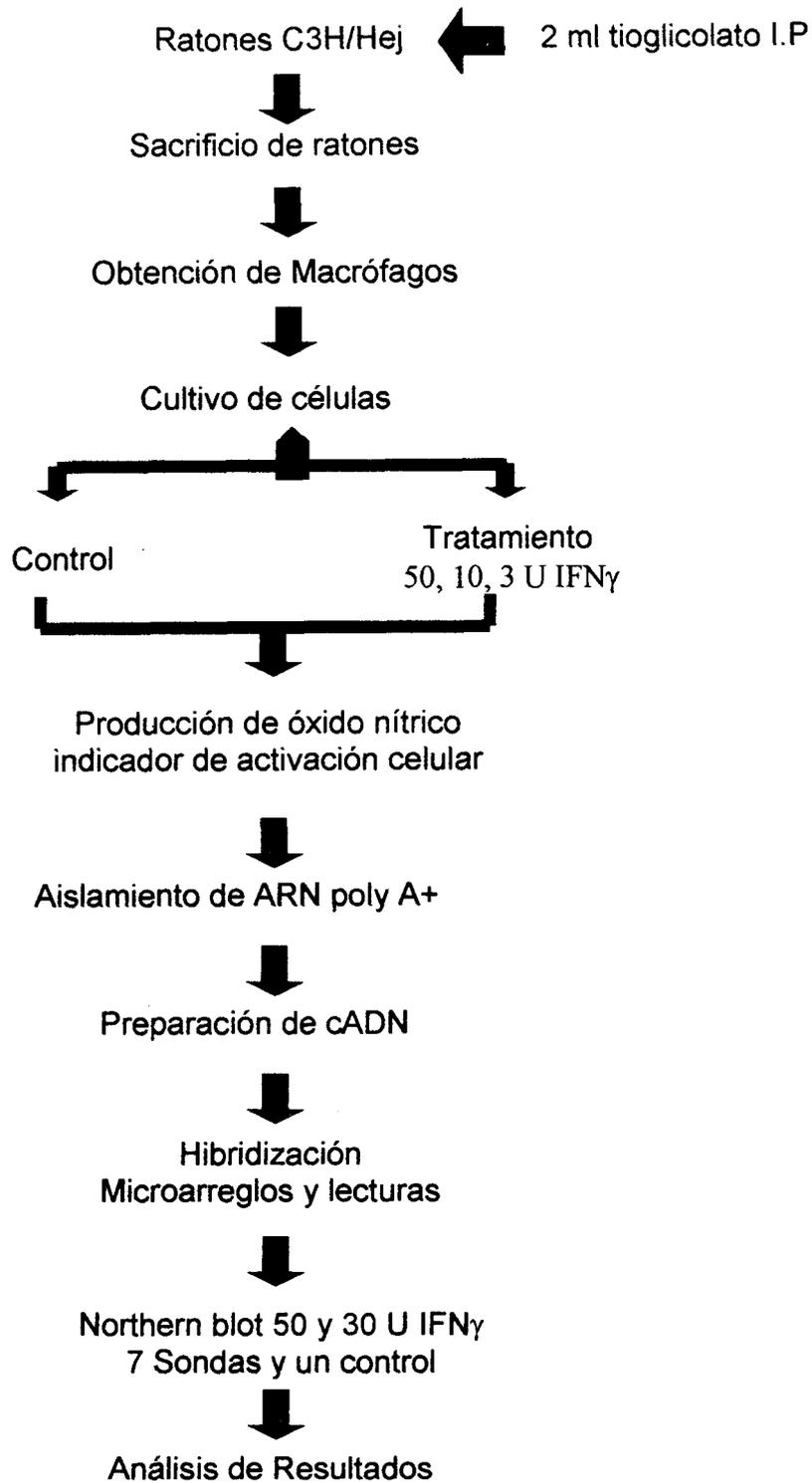


Fig.2 Diagrama general de la metodología utilizada, desde la inyección de los animales para la obtención de macrófagos hasta la última fase de comprobación de los resultados de los microarreglos por medio de Northern blot.

Las membranas utilizadas fueron Atlas™ Mouse cADN Expression Arreglos (Clontech Palo Alto, CA, USA), las cuales se prehibridizaron a 65°C por 30 min. en un incubador con frascos rotativos (Personal HYB™, Stratagene) con 5 mL de solución ExpressHyb (Clontech Palo Alto, CA, USA) preparada con 0.1mg/mL de ADN de esperma de salmón (Gibco BRL New York, USA) que es usado como un agente bloqueador para reducir las uniones no específicas del cADN problema sobre la superficie del filtro.

2X10⁷ cpm de la sonda marcada se fragmentó por medio 10X de solución desnaturalizadora (1mM NaOH, 10mM EDTA) y C₀t-1ADN (Clontech Palo Alto, CA, USA) a 65°C por 30 min.

Se hibridizó cada una de las membranas de microarreglo, tratamiento y control y se incubó por toda la noche a 65°C. Posteriormente se efectuaron seis lavados de 30 min. cada uno, a 65°C en constante rotación en 150 ml de soluciones precalentadas, cuatro con 2XSSC, 1% SDS, y dos con 0.1 XSSC, 0.5% y finalmente un lavado por 5 min. con 150 ml de solución 2XSSC con continua rotación a temperatura ambiente. (SDS y 20 XSSC de Gibco BRL New York, USA).

Lectura y análisis de las membranas.

Cada una de las membranas fue expuesta en una pantalla para fósforo, (storage phosphor screen Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA) y cuantificada por medio de un analizador de fósforo (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA)

Los resultados se analizaron usando el paquete (software) AtlasImage™, CLONTECH's software for analyzing Atlas™ Arrays, (Clontech Palo Alto, CA, USA) comparando la intensidad de cada una de las manchas de la membrana hibridizada problema contra la membrana control.

Se usaron los valores de tres genes constitutivos, hipoxantina, ornitina y proteína S29 ribosomal 40S para normalizar los resultados.

Los resultados se vaciaron a una hoja de cálculo Excel, en donde se genera un reporte comparando los resultados del segundo arreglo (tratamiento) con los resultados del primer arreglo (control) con los siguientes datos :

Intensidad : Es calculada como la totalidad de la señal registrada en cada una de las manchas que representa cada gen. Como es por duplicado, se toma un promedio de las dos lecturas.

El valor de fondo (background): es el valor que se le da a la lectura de la membrana sin ninguna mancha y es para todos los genes la misma.

Coefficiente de normalización: Se calcula con los valores de la señal de los genes seleccionados para este fin y se calcula dividiendo el valor del gen del arreglo 1 entre el valor del mismo gen del otro arreglo.

Intensidad ajustada: Es el resultado de la intensidad menos el valor de fondo multiplicado por el coeficiente de normalización.

Radio: Es la señal del arreglo 2 entre la señal del arreglo 1 tomando como valor el de la intensidad ajustada.

Diferencia. Es la resta de la intensidad ajustada del arreglo 2 menos la intensidad ajustada del arreglo 1.

Los microarreglos, solo se realizaron una vez para cada dosis con su correspondiente control.

Todo este procedimiento se repitió tres veces, una por cada dosis distinta de IFN γ y su correspondiente control.

Transferencia Northern (Northern Blot)

Se seleccionó un subgrupo de 7 genes, para demostrar con un procedimiento independiente, Transferencia Northern, la veracidad de los resultados obtenidos en los microarreglos.

Para los Northern Blot, los macrófagos se obtuvieron con la misma técnica que para los microarreglos, y los tratamientos también fueron los mismos, pero a diferencia del anterior experimento, ahora solo se usaron dos tratamientos el de 50 y 3 unidades de IFN γ /mL.

El aislamiento de ARN total se llevó a cabo con el procedimiento anteriormente descrito y para la purificación del ARN total se utilizó el "estuche" comercial Oligotex (Qiagen INC. Valencia,

CA). 500 µl de ARN total fueron combinados con 500 µl de buffer OBB y 40 µl de cuentas de oligotex e incubada la mezcla por 3 min. a 70 °C y posteriormente 10 min. a temperatura ambiente para permitir la unión de las cuentas a la cola de poli A. Se centrifugó por 2 min. a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge) y el precipitado fue resuspendido en 400 µl de Buffer de lavado, ésta solución se vierte en la columna y se centrifuga por dos min. a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge), las cuentas con el poli A se van a quedar suspendidos en el filtro de la columna. Posteriormente se resuspendieron con 400 µl de buffer de lavado y se volvió a centrifugar por 2 min. a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge), se le agregó a la columna, 50 µl de buffer de separación precalentado a 70 °C y se incubó por 3 min. a la misma temperatura, para finalmente centrifugar por 1 minuto a 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge). Se cuantifica el ARN poli A+, que debe ser cerca de 1% del ARN total en macrófagos.

Electroforesis y transferencia Northern

El ARN enriquecido con Poly A fue desnaturalizado por 3 min. a 65 °C y separado por medio de un gel de formaldehído-agarosa, utilizando 1.0 ug de ARN poli A por línea mezclado con 5 µl de buffer 5X marcado con bromuro de etidio y marcadores standards para ARN (0.24–9.5 Kb ARN Ladder Gibco BRL New York, USA). Se corrió el gel por aproximadamente dos hr. a 100 voltios en 1XFA buffer(buffer 10xFA, formaldehído 37% y agua libre de ARNsa). Después de la electroforesis se tomó una fotografía para verificar la calidad del ARN y posteriormente se transfirió a una membrana de nylon Nitran, usando el sistema Turboblotter (Scheicher & Schuell, Keene N.H. USA) y buffer 20X SSC (Gibco BRL New York, USA) durante una noche.

Amplificación de Cebadores

Las sondas de los ADNs utilizados, fueron inicialmente amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el “estuche” comercial Advantage cADN polimerasa Mix (Clontech Palo Alto, CA, USA), usando los siguientes cebadores para cada uno de los genes escogidos:

Cebadores

	NOMBRE	CEBADORES	TAMAÑO (pb)
1	Receptor1 del Factor de Crecimiento Transformante-β -TGFβ R1	5'- TGGCAAAGGTCGGTTTGGAGAAGT-3' 3'- CCCAGAACACTAAGCCCATTGCATAGA-5'	3000
2	Factor de Crecimiento transformante-β -TGF-β	5' -TCTCCCTCAACCTCAAATTATTCA -3' 3' -GAATGTCTGACGTATTGAAGAACA -5'	1579
3	Proto oncogen 1 relacionado con ets - Fli 1	5'-TCT,GTC,TGT,GGT,GAG,TGA,CGA,TCA -3' 3'-TGT,GTT,ATA,GGC,CAG,CAG,TGA,ACT -5'	1729
4	Proteína de unión a GTP, G25K - CDC42	5'-TTA,TGA,TTG,GTG,GAG,AGC,CAT,ACA-3' 3'-ACT,AAT,GGG,CCT,TGT,CTC,ACA,TGA-5'	2063
5	Receptor 2 (cadena β) del receptor para IFN-γ -IFN-γRII	5'-GGA,GCC,GTC,ACC,TTC,CAG,CAA,TGA-3' 3'-TCA,GGC,CGA,GCA,GCA,ATG,CGA,AGA-5'	1283
6	Proteína 1 Transductora de Señal y Activadora de Transcripción -STAT1	5'-AGA,ACT,TCA,CTC,TCT,TAG,CTT,TGA-3' 3'-TGG,TCG,TTC,CTC,CCA,TGT,GAA,TGT-5'	2277
7	Factor 1 regulado por IFN -IRF1	5'-TAAGCACGGCTGGGACATCAACAA-3' 3'-CCCAGGTAGCCCTGAGTCGTGTAA-5'	2072
8	Proteína ribosomal S29	5'-TCTGAAGGCAAGATGGGTCACCA-3' 3'-TAGTACGATCAGAAACATGTGTTT-5'	271

Los cebadores amplificados se separaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa, con bromuro de etidio, utilizando todo el ADN amplificado con 8 µl de buffer para separar (Blue juice gel loading buffer Gibco BRL New York, USA) y marcador de 72 a1353 pb (X174 RF ADN/Hae III Fragments Gibco BRL New York, USA). Se corrió la electroforesis con Buffer 1X TAE (Tris-acetato EDTA) con Bromuro de etidio a 100 voltios aproximadamente una hora. Se fotografió el gel para verificar la calidad y tamaño de los ADNs y con luz ultravioleta se identificaron y

cortaron los ADN del gel y se pusieron en tubos eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se extrajeron los ADN del gel utilizando el "estuche" comercial QIAquick (Qiagen INC. Valencia, CA), el cual tiene como principio, la adsorción del ADN a la membrana de silica gel, mientras que los contaminantes, pasan a través del filtro, para finalmente obtener el ADN libre de impurezas por medio de agua o por medio de un buffer de tris. Inicialmente se pesó cada uno de los geles que contenían los ADN y se le adicionó tres veces su peso de buffer QC, se incubó a 50 °C, hasta que el gel estuvo líquido, se le adicionó una vez su peso de isopropanol y se vertió la mezcla en el filtro y poniendo el filtro en la aspiradora (Vacuum Manifold, Pomega), hasta que pasó toda la muestra, se enjuagó el filtro con 0.75 ml de buffer PE y se le aplicó vacío, se transfirió el filtro a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó 1 minuto para remover el etanol excedente, se cambió nuevamente de tubo y, para separar el ADN que se encontraba unido en el filtro, se adicionaron 50 µl de buffer EB o H₂O en el centro de la membrana (filtro) y se centrifugó por 1 minuto y cuantificó por medio del espectrofotómetro.

Sonda de ADN

Ya el ADN purificado y cuantificado se marcó con fósforo 32 [α -³²P] dATP usando para ello, el "estuche" comercial Random Primers ADN labeling System (Gibco BRL New York, USA), para esto se hirvió un total de 23 µl, compuestos por 100 ng de ADN y H₂O por 3 min. y se congeló rápidamente en hielo seco. Por separado se mezclaron 2 µl de dCTP, dGTP y dTTP con 15 µl de buffer para mezclar y 5 µl de 32 [α -³²P] dATP y 1 µl de Klenow, esta mezcla se usó para disolver la muestra congelada anteriormente y todo se incubó a 25 °C por 1.5 hr.

Después del marcaje, la sonda se purificó usando una columna de cromatografía -CHROMA SPIN-200 DEPC-H₂O- (Clontech Palo Alto, CA, USA) para eliminar los dATPs marcados que no fueron incorporados en la sonda y pequeños fragmentos de entre 15 y 1,000pb. El procedimiento es como sigue: Se vertió la reacción anterior en la columna, y ya que pasó a través de ella, se le adicionó a la columna, primero 40 µl y posteriormente 200 µl de agua. Las sondas son separadas, adicionando y colectando fracciones de 100 µl de agua, 6 veces, cambiando de tubo cada una de ellas. Normalmente la sonda se encuentra separada entre la segunda y tercera fracción.

Se verificó la radioactividad en las fracciones obtenidas mediante contador de centelleo (Beckman) en 2 µl de cada fracción y 5 ml de líquido para centelleo (Ready Protein+ Beckman Coulter, USA), en frascos especiales para centelleo.

Hibridación

La membrana fue prehibridizada con 10 ml de buffer para hibridación que contiene NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, Na₄P₂O₇·10H₂O, solución de Denhardt, SDS, fragmentos de ADN de testículos de salmón y formamida (Soares et al., 1994) por dos hr. a 42 °C. Se hirvieron 10 millones de cpm de la sonda y se congeló rápidamente en hielo seco. Se disolvió la sonda congelada con 10 ml de buffer para hibridizar, previamente calentado a 42 °C y con esta última mezcla se hibridizó la membrana durante toda la noche, en incubación a 42 °C en constante agitación. Posterior a la hibridación, se lavaron las membranas tres veces con 100 ml de la solución 1XSSC 1% SDS (SDS y 20 XSSC de Gibco BRL New York, USA), cada uno de ellos de 40 min. a 42 °C, en agitación.

Lectura y análisis de las membranas.

Cada una de las membranas fue expuesta en una pantalla para fósforo, (storage phosphor screen Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA). Y cuantificada por medio de un analizador de fósforo (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA) y el software Imagen Quant 5.2 (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA).

Este primer bloque de transferencias Northern se realizaron tres veces para cada uno de los genes escogidos.

Como una última comprobación se hizo un experimento también con transferencia Northern, escogiendo un grupo de 4 genes, dos expresados a la alta: STAT1 y IRF1, y dos genes expresados a la baja: CDC42 y TGF β R1. En este experimento se usó el bloqueador de la ruta JAK-STAT tirfostin AG-490 (N-Benzil-3,4-dihidroxibencilidenecianoacetamida BIOMOL Research Laboratories, Inc, PA. USA) a una concentración 40 μ M, esperando tener el mismo resultado tanto en el control, como en el tratado con IFN γ + AG490.

Se usó la misma cepa de ratón y el mismo procedimiento para la obtención y cultivo de macrófagos. El mismo número de frascos fue designado para cada tratamiento, teniendo tres diferentes tratamientos; control, IFN γ 50 unidades/ml e IFN γ 50 unidades/ml más AG-490 40 μ M. Tanto los materiales como los métodos utilizados en este experimento fueron los mismos descritos en las transferencias Northern anteriores.

Este segundo bloque de transferencias Northern también se repitió tres veces.

Determinación de Oxido Nítrico. Los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos, tanto los controles como los tratados con las diferentes dosis de IFN- γ , se les determinó siempre a las 48 hr. los niveles de Oxido nítrico, para tener la certeza de que los macrófagos con tratamiento estaban activados. Para esta determinación se utilizó la reacción de Griess. Describiendo brevemente; alícuotas de 100 μ L de sobrenadante se mezclan con 100 μ L del reactivo de Griess conteniendo 1% de sulfanilamida, 0.1% diclorato de naftilen diamina y 2% de ácido fosfórico. La densidad óptica cambia a 10 min. y es medida a 550nm y convertida a concentraciones μ M de nitritos basándose sobre la curva estándar de nitrito de sodio.

Análisis estadístico

El estadístico que se uso fue t de Student de dos colas apareada. El límite de confianza fue de 95% ($P < 0.05$) se tomó como significativo. Esta prueba solo se realizó con los resultados de producción de óxido nítrico en cada experimento para tener la certeza de que los macrófagos con tratamiento estaban realmente activados.

4. RESULTADOS

Para identificar cambios en la expresión de ARNm en macrófagos peritoneales de ratones tratados con dosis 50, 10 y 3 unidades de IFN γ /ml, se realizó 1 microarreglo de cada tratamiento con sus respectivos controles con cADN marcado con P³², a partir de ARN total de cada una de las dosis. Para éste fin se usaron Atlas™ Mouse cADN Expression Arrays (Clontech Palo Alto, CA, USA). En cada una de las membranas se puede obtener información diferencial de la expresión de alrededor de 600 ARNm en un solo experimento, garantizando la especificidad de la hibridación por el uso de una mezcla de cebadores para cada uno de los cADN contenidos en cada membrana, y porque también se incluyen en las membranas ADNs de bacteriófagos y plásmidos como controles negativos para confirmar la hibridación específica junto con algunos cADN constitutivos como control positivo, para normalizar los ARNm abundantes en los macrófagos.

Para normalizar los resultados se usaron los valores de tres genes constitutivos, hipoxantina, ornitina y Proteína S29 ribosomal 40S.

Los resultados se analizaron usando el paquete (software) AtlasImage™, CLONTECH's software for analyzing Atlas™ Arrays, (Clontech Palo Alto, CA, USA) comparando la intensidad de cada una de las manchas de la membrana hibridada problema contra la membrana hibridada control. Estos resultados se vaciaron a una hoja de cálculo Excel, en donde se generó un reporte comparando los resultados del microarreglo del experimento con los resultados del microarreglo control.

Los resultados de las transferencias Northern mostraron la misma tendencia en las tres repeticiones, solo que las cifras no, por lo que los resultados se presentaron de acuerdo a estas tendencias que en los tres experimentos mostraron.

Las membranas de microarreglos Atlas™ Mouse cADN Expression Arrays (Clontech Palo Alto, CA, USA), tienen una distribución específica para cada uno de los cADNs (figura 3.) los cuales se presentan por pares. La membrana está dividida en 6 cuadros denominados alfabéticamente comenzando por la izquierda, de tal manera que se encuentran los cuadros A, B y C en la parte superior y en la parte inferior los cuadros D, E Y F, en cada uno de estos cuadros se encuentran agrupados genes con actividades similares, así se tiene que en el cuadro A se encuentran agrupados oncogenes, supresores de tumor y reguladores de ciclo celular, en el cuadro B se encuentran agrupados genes de respuesta a stress, canales iónicos y transportadores y transductores celular, efectores y moduladores. En el cuadro C se encuentran genes relacionados con apoptosis, recombinantes, síntesis y reparadores de ADN, en el cuadro D, se encuentran agrupados los genes que codifican proteínas relacionadas con factores de transcripción y proteínas de unión de ADN, en el cuadro E se encuentran agrupados los genes que codifican proteínas con función de receptores, antígenos de superficie celular y proteínas que participan en la adhesión celular y, por último en el cuadro F se encuentran los genes que codifican proteínas relacionadas con comunicación célula-célula, relacionadas con el citoesqueleto y movilidad celular, y, por último proteínas convertidoras. Cada uno de estos cuadros se divide a su vez en líneas y columnas, las líneas están designadas de la "a" a la "n", y las columnas del 1 al 7, ambas ascendentemente. La localización del gen, entonces está determinada primero por la letra mayúscula que indica el cuadro y posteriormente por el cruce de la letra de la línea y la letra de la columna. En la columna de la extrema derecha y la línea en la parte inferior de la membrana que ambas no pertenecen a ningún cuadro, se encuentran manchas de ADNs genómicos, las cuales sirven como marcas de orientación para ayudar a determinar la coordenada de la señal de hibridación.

En el extremo inferior se encuentra la línea G, la cual está numerada de izquierda a derecha del 1 al 21, en esta línea G se encuentran genes constitutivos, los cuales ayudarán a normalizar las membranas con ARNs abundantes.

El primer reporte generado, fue el del experimento con la dosis de 50 unidades de IFN γ / ml y se muestra en el cuadro 4. La primera columna "loc. gen" corresponde a la localización del gen en la membrana de microarreglo.

La segunda columna, "intensi. control", indica el valor de la señal o mancha registrada de cada uno de los genes en el microarreglo control.

La tercera columna "fondo" representa el valor de fondo en el microarreglo control, éste, es el valor que se le da a la lectura de la membrana sin ninguna mancha y es el mismo valor para todos los genes.

La cuarta columna "intensi. Ajust. control" contiene la intensidad ajustada del control, calculada por la substracción del valor de fondo al valor original de la señal y multiplicado por el coeficiente de normalización.

El coeficiente de normalización se calculó dividiendo el valor de la señal de los genes constitutivos hipoxantina, ornitina descarboxilasa, y proteína S29 ribosomal 40S de la membrana control entre los mismos datos generados en la membrana con tratamiento.

Las columnas quinta, sexta y séptima representan los mismos datos que las columnas 2,3 y 4, solo que de la membrana con tratamiento.

La octava columna "radio", contiene el radio calculado, dividiendo la intensidad ajustada de la señal de la membrana con tratamiento entre la señal de la membrana control. Cuando la cifra que se encuentra en esta columna es entera con o sin decimales, quiere decir que el gen está regulado a la alta.

Descripción del microarray

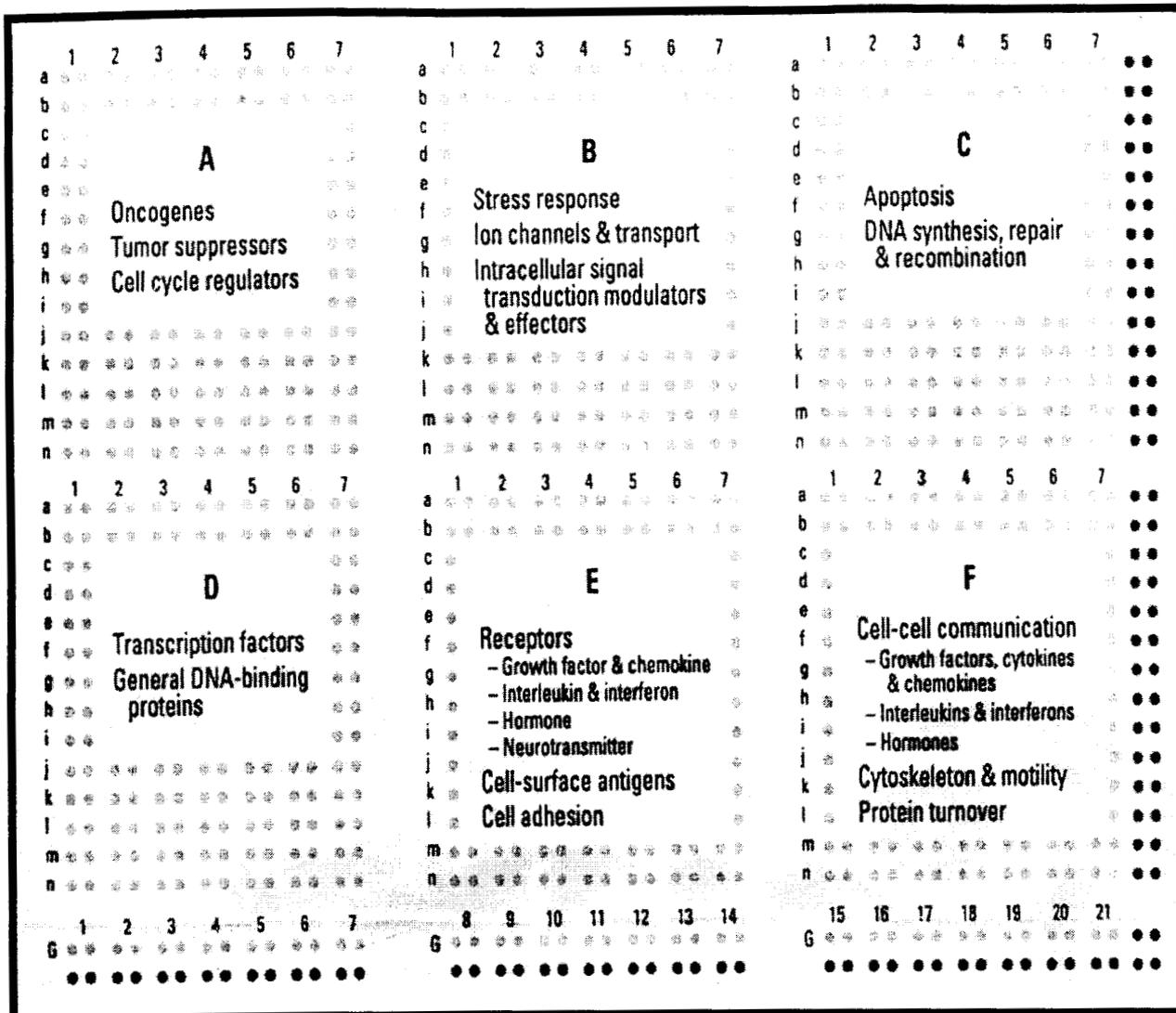


Fig. 3. En esta figura se presenta un modelo de microarray Atlas™ Mouse cDNA Expression Arrays (Clontech Palo Alto, CA, USA) igual al utilizado en cada uno de los experimentos. La distribución cDNAs son específicas y cada par representa un mRNA. La membrana está dividida en 6 cuadros denominados alfabéticamente A, B y C, D, E Y F, en cada uno de estos cuadros se encuentran agrupados genes con actividades similares. Cada uno de estos cuadros se divide a su vez en líneas y columnas, las líneas están designadas de la "a" a la "n", y las columnas del 1 al 7. La localización del gen, entonces está determinada primero por la letra mayúscula que indica el cuadro y posteriormente por el cruce de la letra de la línea y la letra de la columna (A3b). La mitad de la membrana se encuentra rodeada por DNAs genómicos (puntos oscuros), el cual sirve de orientación para determinar la coordenada de la señal de hibridación.

En el extremo inferior se encuentra la línea G, en donde se encuentran genes constitutivos, los cuales ayudarán a normalizar las membranas con RNAs abundantes.

Cuadro 4.

Resultados Experimento 50 unidades IFNg/ml											
Loc. Gen	Intensi. Control	Fondo Control	Intensi. Ajust. Control	Intensi. Trat.	Fondo Treat.	Intensi. Ajust. Trat.	Radio	Veces Reg. Alta	Veces Reg. Baja	Diferencia	Proteína/gene
C3m	7	7	0	63	4	59	Vacio	59.0	0	59	sintasa óxido nítrico inducible (iNOS)
F1m	8	7	1	62	4	58	Vacio	58.0	0	57	monocina inducida por interferón gama (MIG)
A4j	7	7	0	17	4	13	Vacio	13.0	0	13	receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1)
B7k	27	7	20	223	4	220	11.000	11.0	0	200	IRF1; factor 1 regulatorio de interferón
D4k	37	7	30	225	4	222	7.400	7.4	0	192	proteína 1 inducida por interferón
B2g	13	7	6	46	4	42	Vacio	7.0	0	36	B7-2; Antígeno activador de linfocitos T CD86; CD28
B4d	60	7	53	292	4	290	5.472	5.5	0	237	antígeno ligando 2, Antígeno B7-2
B7n	47	7	40	199	4	196	4.900	4.9	0	156	Stat1; transductor de señal y activador de transcripción
C5g	22	7	15	61	4	57	3.800	3.8	0	42	Zyxin; Dominio proteína LIM; proteína de unión actinina-alfa
B3e	10	7	3	17	4	11	Vacio	3.7	0	8	Atm; homólogo murino de ataxia telangiectasia
C1k	37	7	30	103	4	99	3.300	3.3	0	69	LFA1-alpha; integrina L alfa; cadena alfa de glicoproteína de adhesión de leucocito LFA-1
A1h	17	7	10	34	4	30	Vacio	3.0	0	20	BID; agonista de muerte apoptótica
C3g	20	7	13	43	4	39	Vacio	3.0	0	26	Mdm2; proteína regulando p53
C5k	22	7	15	42	4	38	2.533	2.5	0	23	FasI; Antígeno ligando Fas
B3h	34	7	27	6	4	2	Vacio	0	13.5	-25	DNA ligasa III
B4a	86	7	79	11	4	7	Vacio	0	11.3	-72	proteína receptora de transferina (p90, CD71)
F6j	1740	7	1733	161	4	158	0.091	0	11.0	-1575	NF-kB p65; Subunidad p65 del factor de transcripción NF-kappa-B
C2b	323	7	316	35	4	31	0.098	0	10.2	-285	catepsina L
E2k	27	7	20	6	4	2	Vacio	0	10.0	-18	glutathion S- transferasa Mu 1
A7g	33	7	26	7	4	3	Vacio	0	8.7	-23	Receptor tipo 1 de TGF-beta
F4i	61	7	54	12	4	8	0.148	0	6.8	-46	p57kip2; cdk- inhibidor cdk- de kip2
F7j	45	7	38	10	4	6	Vacio	0	6.3	-32	uromodulina
D7f	38	7	31	9	4	5	Vacio	0	6.2	-26	inhibidor 2 de serina proteasa
F6k	87	7	80	17	4	13	0.163	0	6.2	-67	factor de transcripción SP1P; dominio POU de factor de transcripción
F3a	105	7	98	21	4	17	0.173	0	5.8	-81	colagenasa tipo IV
C3b	35	7	28	9	4	5	Vacio	0	5.6	-23	factor de crecimiento parecido a insulina 1A
F4h	1030	7	1023	189	4	186	0.182	0	5.5	-837	inhibidor de lisis por complemento
E1g	23	7	16	7	4	3	Vacio	0	5.3	-13	factor beta de necrosis tumoral (TNF-beta); linfotóxina alfa
E2l	27	7	20	8	4	4	Vacio	0	5.0	-16	receptor C5A
F7m	72	7	65	17	4	13	0.200	0	5.0	-52	receptor alfa beta de interferón
F6h	6031	7	6024	1264	4	1269	0.211	0	4.7	-4755	TIMP-metaloproteína 2 de inhibidor de tejido 2
F7a	105	7	98	25	4	21	0.214	0	4.7	-77	catepsina D
F4g	38	7	31	11	4	7	Vacio	0	4.4	-24	enzima convirtiendo - interleucina (ICE)
F4d	126	7	119	31	4	27	0.227	0	4.4	-92	factor de crecimiento transformante 2 beta
F6l	1728	7	1721	404	4	402	0.234	0	4.3	-1319	trombomodulina
C3j	30	7	23	10	4	6	Vacio	0	3.8	-17	proteasa 2 citotóxica celular (B10)
E7d	22	7	15	8	4	4	Vacio	0	3.8	-11	gadd45; proteína inducible de arresto y daño de DNA
F6m	51	7	44	16	4	12	0.273	0	3.7	-32	integrina alfa 6
F6f	131	7	124	39	4	35	0.282	0	3.5	-89	gene 1 CCP de serina proteasa específica de linfocito T citotóxico
C5d	324	7	317	95	4	91	0.287	0	3.5	-226	enzima convirtiendo-angiotensina (ACE) (clon ACE.5.)
B3c	58	7	51	19	4	15	0.294	0	3.4	-36	receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR-1)
											cadena beta del receptor de interleucina -6; glicoproteína de membrana gp130

F6n	24	7	17	9	4	5	Vacio	0	3.4	-12	gelatinasa B
B7b	134	7	127	42	4	38	0.299	0	3.3	-89	Rab-2 proteina relacionada -ras
C2a	204	7	197	64	4	60	0.305	0	3.3	-137	glutathion S- transferasa (microsomal)
A1e	69	7	62	23	4	19	0.306	0	3.3	-43	EB1 proteina uniendo APC
A4b	130	7	123	42	4	38	0.309	0	3.2	-85	proto-oncogene c-Fms; receptor del factor 1 estimulador de colonias de macrófago (CSF-1)
E6j	55	7	48	19	4	15	0.313	0	3.2	-33	subunidad alfa de glicoproteina MAC-1 de superficie celular
B7g	339	7	332	108	4	104	0.313	0	3.2	-228	14-3-3 proteina eta
B6a	77	7	70	26	4	22	0.314	0	3.2	-48	MAPKK1; MAP quinasa quinasa 3 (especificidad dual) (MKK1)
E6m	51	7	44	18	4	14	0.318	0	3.1	-30	distrogican 1
F5g	191	7	184	63	4	59	0.321	0	3.1	-125	CDC42 - proteina unidora de GTP; G25K
A2g	141	7	134	47	4	43	0.321	0	3.1	-91	c-ErbA oncogene; receptor de hormona tiroidea.
A5b	35	7	28	13	4	9	0.321	0	3.1	-19	c-Cbl proto-oncogene (adaptor de proteina)
B3b	25	7	18	10	4	6	Vacio	0	3.0	-12	IFNGR2; Segunda cadena (beta) de receptor para interferon-gamma
B4m	30	7	23	12	4	8	0.348	0	2.9	-15	Crk adaptor de proteina
A2a	27	7	20	11	4	7	Vacio	0	2.9	-13	Maspin supresor tumoral
B6j	24	7	17	10	4	6	Vacio	0	2.8	-11	PI3-K p110; subunidad catalitica de fosfatidilinositol 3-quinasa
C2k	115	7	108	43	4	39	0.361	0	2.8	-69	c-Akt proto-oncogene; Rac-alpha; proteina quinasa B (PKB)
F7i	48	7	41	19	4	15	Vacio	0	2.7	-26	inhibitor-2 del activador de plasminogeno
C7k	78	7	71	30	4	26	0.366	0	2.7	-45	enzima conjugadora de ubiquitina, ratón HR6B
F7c	26	7	19	11	4	7	Vacio	0	2.7	-12	metaloproteinasas tipo matriz-membrana
F3h	31	7	24	13	4	9	0.375	0	2.7	-15	proteina 2 relacionada con Mad (MADR2)
B1k	41	7	34	17	4	13	0.382	0	2.6	-21	ERp72 proteina de stress reticulo endoplasmico; proteina relacionada con isomerasa disulfido
F6g	3736	7	3729	1453	4	1459	0.391	0	2.6	-2270	catepsina B
E3d	96	7	89	39	4	35	0.393	0	2.5	-54	receptor interleucina-3
C4l	67	7	60	28	4	24	0.400	0	2.5	-36	SPI3; serpin; similar a proteinasas inhibidora 6 humana
F7d	57	7	50	24	4	20	Vacio	0	2.5	-30	nexin 1 proteasa (PN-1)
B5i	143	7	136	59	4	55	0.404	0	2.5	-81	inhibidor de proteina quinasa activadora de ARN, 58 kDa
D3m	165	7	158	71	4	67	0.424	0	2.4	-91	HMG-14 proteina cromosomal no histona
C1m	103	7	96	45	4	41	0.427	0	2.3	-55	glutathion reductasa
A2j	205	7	198	90	4	86	0.434	0	2.3	-112	factor de terminación TTF-1, RNA polimerasa I
B5h	80	7	73	36	4	32	0.438	0	2.3	-41	quinasa 1 regulando señal extracelular (ERK1); p44; Ert2
A1m	32	7	25	15	4	11	0.440	0	2.3	-14	Rb; pp105; proteina asociada a susceptibilidad a retinoblastoma (gene supresor tumoral)
D5h	316	7	309	140	4	136	0.440	0	2.3	-173	factor nuclear relacionado a P45 NF-E2
C4h	34	7	27	16	4	12	0.444	0	2.3	-15	PS-2; gene homologo de enfermedad de Alzheimer
F5l	43	7	36	20	4	16	Vacio	0	2.3	-20	cadena ligera de miosina fetal álcali
F6d	2254	7	2247	999	4	1002	0.446	0	2.2	-1245	vimentina
C3e	31	7	24	15	4	11	0.458	0	2.2	-13	FAF1; factor asociado a proteina Fas; activador de apoptosis
F4f	222	7	215	103	4	99	0.460	0	2.2	-116	factor beta de crecimiento transformante
F6e	87	7	80	42	4	38	0.475	0	2.1	-42	miosina no convencional VI
F6c	53	7	46	26	4	22	0.478	0	2.1	-24	Rab-3b proteina ras-relacionada
F6b	217	7	210	105	4	101	0.481	0	2.1	-109	cadena 3 ligera de miosina no muscular
C1c	38	7	31	19	4	15	0.484	0	2.1	-16	caspsa-7; Lice2; ICE-LAP3 proteasa cisteína
F7h	175	7	168	87	4	83	Vacio	0	2.0	-85	Inhibidor de activador de plasminógeno
B4g	96	7	89	48	4	44	0.494	0	2.0	-45	Stat6; transductor de señal y activador de transcripción 6; IL-4 Stat; STA6
A3b	43	7	36	22	4	18	0.500	0	2.0	-18	Fli-1 proto-oncogene relacionado con ets

B5d	63	7	56	32	4	28	0.500	0	2.0	-28	Syk tyrosina-proteína quinasa p21cdc42Hs quinasa activada (ack))
B6k	57	7	50	29	4	25	0.500	0	2.0	-25	PI3-K p85; fosfatidilinositol 3-quinasa subunidad reguladora; fosfoproteína p85

Cuando la cifra es sólo decimal indica que el gen es regulado a la baja, cuando tiene la palabra "vacío" significa que algún valor de señal, ya sea en la membrana control o con tratamiento no es mayor al valor de fondo o background, por lo tanto nos puede indicar algún gen que no se expresa en el control y si en el tratamiento, o que por efecto del tratamiento, se anula su expresión (regulado a la baja).

En la columna novena se encuentran el número de veces que los genes están regulados a la alta y se calculó dividiendo la intensidad ajustada del tratamiento entre la intensidad ajustada del control.

En la décima columna se encuentran el número de veces que los genes están regulados a la baja, y se calculó dividiendo la intensidad ajustada del control, entre la intensidad ajustada del tratamiento.

En la onceava columna "diferencia" se encuentran los datos calculados con la substracción de la intensidad ajustada de la membrana tratada, menos la intensidad ajustada de la membrana control. Los números negativos en esta columna representan un gen regulado a la baja y los números positivos indican un gen regulado a la alta.

Finalmente en la doceava columna Proteína/gene se encuentra el nombre de la proteína que codifica cada gen.

En los cuadros se presentan en primer lugar los genes regulados a la alta comenzando por el de mayor magnitud, posteriormente se presentan los genes regulados a la baja, también de mayor a menor magnitud, estos genes se seleccionaron por tener dos o más veces la magnitud de la señal del control, dependiendo si es a la alta, es más, y si es a la baja, es menos.

Los resultados de los tres experimentos, uno de cada dosis, se representan de la misma manera y los cálculos se hicieron de la misma forma.

Los resultados del microarreglo del primer experimento, que fue el de 50 unidades de IFN γ / ml, se utilizaron como indicador para buscar en los siguientes experimentos, la respuesta de los mismos genes regulados a la alta o a la baja observados en este experimento, por lo que existen genes reportados en el tratamiento de 10 y 3 unidades de IFN γ /ml que no cumplen con la magnitud de la señal seleccionada, pero se presentan para mostrar el comportamiento de estos genes. Posteriormente se analizó el reporte generado por el experimento sin ninguna modificación, de tal manera que no todos los reportes de los tres experimentos comprenden los mismos genes. Ambos resultados se encuentran en el mismo reporte de cada uno de los experimentos.

En el primer experimento con tratamiento de 50 unidades de IFN γ /ml (fig.4a y 4b), se identificaron 88 genes con cambios en los niveles de expresión de ARNm después de la estimulación con IFN γ (cuadro 5). De estos 88 genes, solo 14 están regulados a la alta representando casi el 16%, y, de este total el 57% tuvo una magnitud de 2 a 6 veces más el valor del control, dentro de éste se encuentran el transductor de señal y activador de transcripción 1 (STAT1), proteínas de adhesión como integrina L alfa1 (LFA1) y genes relacionados con apoptosis como proteína reguladora p53 (MDM2), ligando de antígeno Fas (Fas1) y agonista de muerte apoptótica (BID). Alrededor del 29% tuvieron una magnitud de 7 a 13 veces el valor del control, dentro de este grupo se encuentran proteínas relacionadas con IFN γ como Factor1 regulado por IFN (IRF1) y Proteína 1 inducida por IFN; el receptor del factor de crecimiento endotelial (VEGFR1 ó Flt1) relacionado con la inhibición de la mitogénesis inducida por el factor de crecimiento vascular (VEGF), la proteína homóloga de ratón Ataxia telangiectasia (Atm) y antígeno CD86 activador de linfocito T (B7-2), que está relacionado con

Microarray control del experimento de 50 unidades INF γ /ml

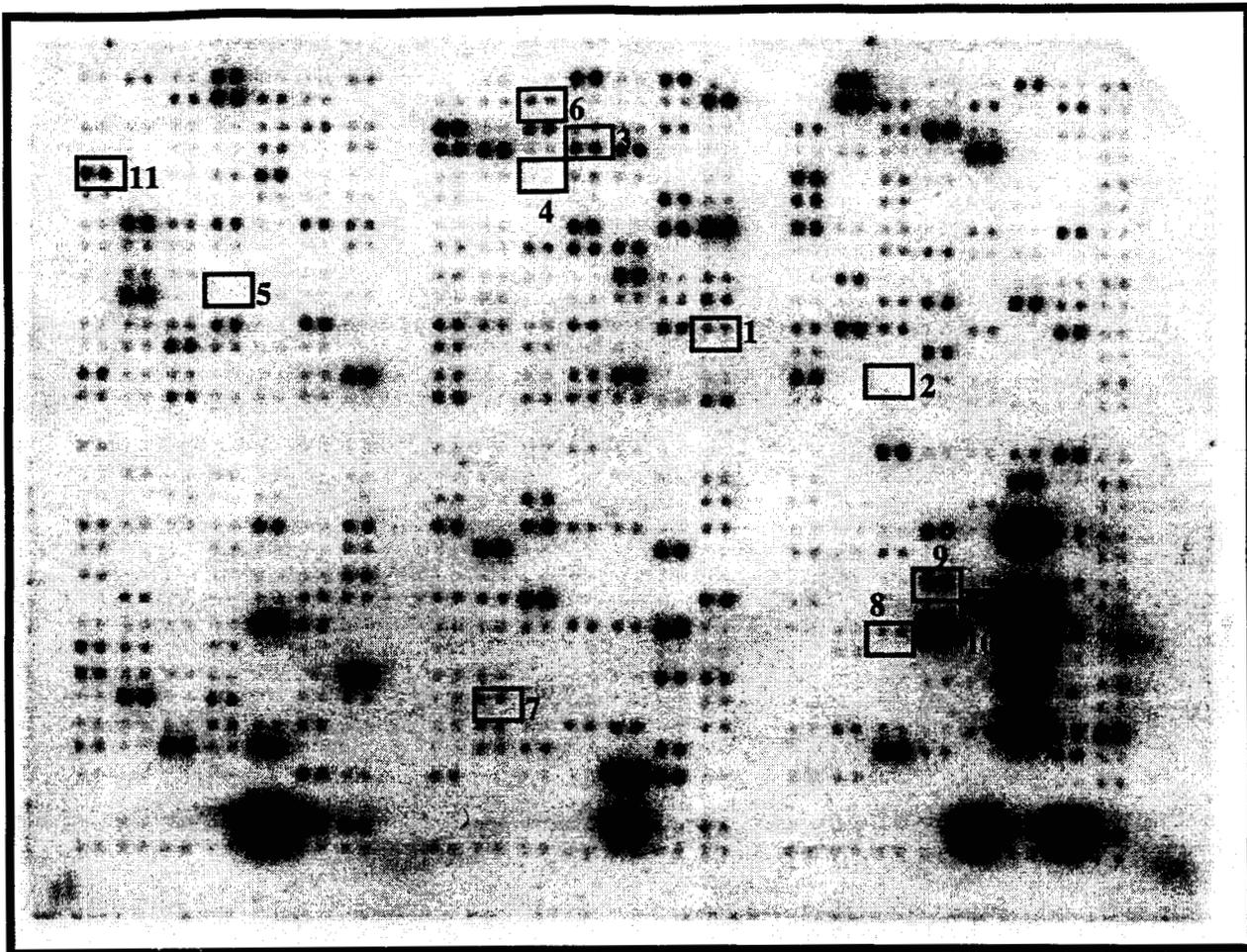


Fig.4a. Resultado del microarray control del experimento de 50 unidades de INF γ /ml en macrófagos peritoneales de ratón. Los cuadros representan los distintos genes y los números los genes de interés; 1. Factor regulatorio de Interferón (IRF1), 2. Oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), 3. transductor de señal y activador de transcripción 1 (STAT1), 4. Integrina 1 alfa (LFA-1), 5. Receptor 1 de factor de crecimiento endotelio vascular (VEGFR1), 6. Receptor 2 INF γ (IFNR2), 7. Receptor 1 de Factor de crecimiento transformante (TGF β R1), 8, Proteína 2 relacionada con MAD (MADR2), 9. Proteína de unión a GTP (CDC42), 10. Factor de crecimiento transformante (TGF) y 11. Proteína de unión de adenomatosis poliposiscoli (EBI-APC).

Microarray con tratamiento del experimento de 50 unidades INF γ /ml

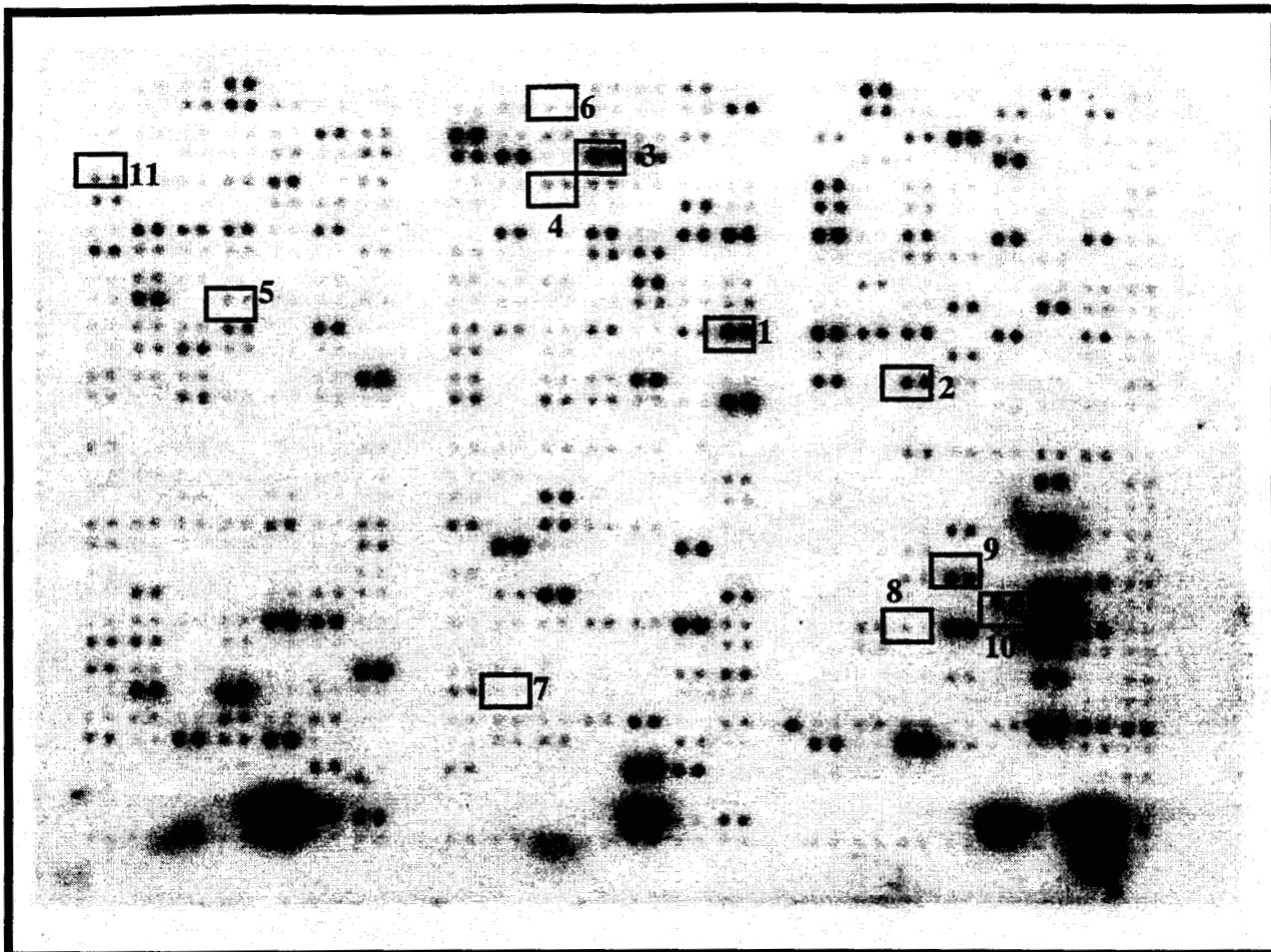


Fig. 4b. Membrana con tratamiento donde se ven claramente el cambio en la intensidad de las manchas, que indica los genes regulados a la alta 1. IRF1, 2. iNOS, 3. STAT1, 4. LFA-1 y 5. VEGF1. Las manchas con intensidad menor que en el control, indican genes regulados a la baja; 6. IFNR2, 7. TGF β R1, 8. MADR2, 9. CDC42, 10. TGF β y 11. EBI-APC.

el disparo de la citotoxicidad de células NK. Y, finalmente, el 14% tuvo una magnitud de 58 a 59 veces más el valor del control, en este grupo se encuentran la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), siendo esta enzima dependiente de IFN- γ y cataliza la formación de grandes cantidades de NO y monoquina inducida por IFN γ (Mig), esta proteína está relacionada con el crecimiento, movimiento y activación de células que participan en la respuesta inflamatoria.

Cabe mencionar que este cambio tan grande en la magnitud de estos dos genes se debió a que en la membrana control el valor de la intensidad ajustada fue 0 y 1 respectivamente.

El 84% restante (74) del total de genes que variaron su expresión debido a la presencia de IFN γ fueron genes regulados a la baja (cuadro 5), de este total el 86.5% tuvo una magnitud de 2 a 5 veces menos el valor de la señal del control. Dentro de este gran grupo se encuentran proto-oncogenes y oncogenes como Fli1, cCbl, c-Fms proto-oncogen, c-Akt y c-ErbA oncogen; un grupo de quinasas o genes relacionados con ellas como proteína quinasa - tirosina Syk (ack), CamKII, MAP quinasa quinasa 3 (MAPKK1), quinasa 1 señal extracelular regulada (ERK1), inhibidor de ARN de proteína quinasa activada, subunidad catalítica 3- quinasa fosfadidil inositol (P13k p110). También se encuentran en este grupo regulado a la baja una gran cantidad de proteasas, entre ellas tenemos proteasa celular citotóxica 2 (B10), gelatinasa B, proteasa serina específica de linfocito T citotóxico (CTLA), proteasa nexin 1 (PN-1), algunas del grupo de proteasa cisteína como caspasa-7 y enzima convertidora de interleuquina (ICE), las dos posiblemente relacionadas con apoptosis; proteasas lisosomales como catepsina B y D; proteínas relacionadas con proteasas como es el caso de la enzima conjugada con ubiquitina.

Cuadro 5. Resultados del microarreglo de 50 U. IFN γ /ml

No. De genes Identificados	Regulados a la alta				
	Número de genes	Porcentaje Total	Porcentaje	Magnitud* (mayor)	
88	14	16	57	2-6	
			29	7-13	
			14	58-59	
	Expresados a la Baja				
	74	84			
				86.5	2-5
				13.5	6-13.5

* Número de veces más ó menos el valor del control

También encontramos en este grupo, proteínas relacionadas con matriz celular, incluyendo a distroglican, metaloproteinasas tipo matriz-membrana, inhibidor de tejido metaloproteinasas 2 (TIMP2). Un grupo de receptores, incluyendo: cadena beta de receptor de interleucina 6, receptor 1 de factor de necrosis tumoral (TNFR1), receptor para interleucina 3, receptor beta para IFN γ (IFN γ R2), receptor beta para IFN α y receptor para el factor de complemento C5. Otro grupo de factores involucrados en la transcripción también se encuentra dentro de estos genes regulados a la baja: factor de transcripción YY1 (UCRBP), factor de terminación 1 y factor S-II de transcripción. Un grupo de genes relacionados con TGF β o con su ruta; proteína 2 relacionada con Mad (MADR2) y factor beta y beta 2 de crecimiento transformante. Un grupo de genes relacionados con coagulación como Inhibidor e inhibidor 2 activador de plasminógeno y trombosmodulina. Los genes supresores de tumor como proteína relacionada con la susceptibilidad a retinoblastoma Rb, maspin supresor de tumor. Proteínas de superficie como subunidad alfa de la glicoproteína de superficie celular (MAC-1), Integrina alfa 6, Proteína de unión de adenomatosis poliposis coli (EB1). Se encontró también en este grupo el gen que codifica al factor transductor de señal y activador de transcripción 6 (Stat 6) y al gen de la proteína de unión CDC42 (G25) relacionada con el movimiento del macrófago y factor beta de necrosis tumoral (TNF β).

Del total de genes regulados a la baja el 13.5% restante tuvo una magnitud de 6 a 13.5 veces menos el valor de la señal del control, encontrándose en este grupo genes que codifican la subunidad p65 del factor de transcripción nuclear NF-kappa-B (NF-kB p65), el receptor tipo 1 de TGF β . También se encuentran algunas proteasas o proteínas relacionadas con ellas como catepsina L, glutatión S transferasa microsomal, Colagenasa tipo IV, e inhibidor 2 de serina proteasa. El gen supresor de tumor p57kip2 también se encuentra en este grupo.

El reporte del experimento de 10 unidades de IFN γ /ml generó 90 genes en total (fig. 5a y 5b, cuadro 6), pero cabe aclarar que de éstos, 27 genes (30%) no cumplen el requisito de tener 2 veces más ó 2 menos la magnitud de señal en comparación con el control, pero era importante conocer su comportamiento, ya que en el experimento de 50 unidades de IFN γ /ml presentaron cambios importantes. Para la descripción del comportamiento de los genes se tomará como 100% los 63 genes restantes (cuadro 7). De este 100%, 11 genes se expresaron a la alta, representando el 17.5% del total y de este total el 82% expresó de 2 a 3 veces más la señal del control, los genes que continúan expresándose son STAT1, LFA1-alfa, BID y Atp. En este grupo se encuentran dos nuevos genes que no se expresaron notablemente en el tratamiento de 50 unidades de IFN γ /ml, la primera es una peptidasa cisteína, Catepsina H, y la segunda la proteasa gelatinasa B y un gen que en 50 unidades se expresa a la baja miosina IV no convencional. El 18% restante lo constituyen los genes que codifican iNOS y IRF1, los cuales tienen 4 y 8.4 veces respectivamente más su expresión que el control.

Con respecto al 82% correspondiente a los genes expresados a la baja en esta dosis, el 79% tuvo una magnitud de 2 a 3 veces más que la manifestada por la membrana control, todos los miembros de este grupo, también se expresaron a la baja en el tratamiento de 50 unidades de IFN γ /ml, excepto la expresión del nuevo gen que codifica la proteína reguladora de glucosa (Grp79). En general en este grupo, la magnitud de expresión fue similar que la registrada en el primer experimento, excluyendo a los genes Catepsina L, Colagenasa tipo IV y glutatión S transferasa, que tuvieron una disminución mayor, entre 2 y 5 veces menos del valor registrado en el experimento anterior.

Microarray control del experimento de 10 unidades INF γ /ml

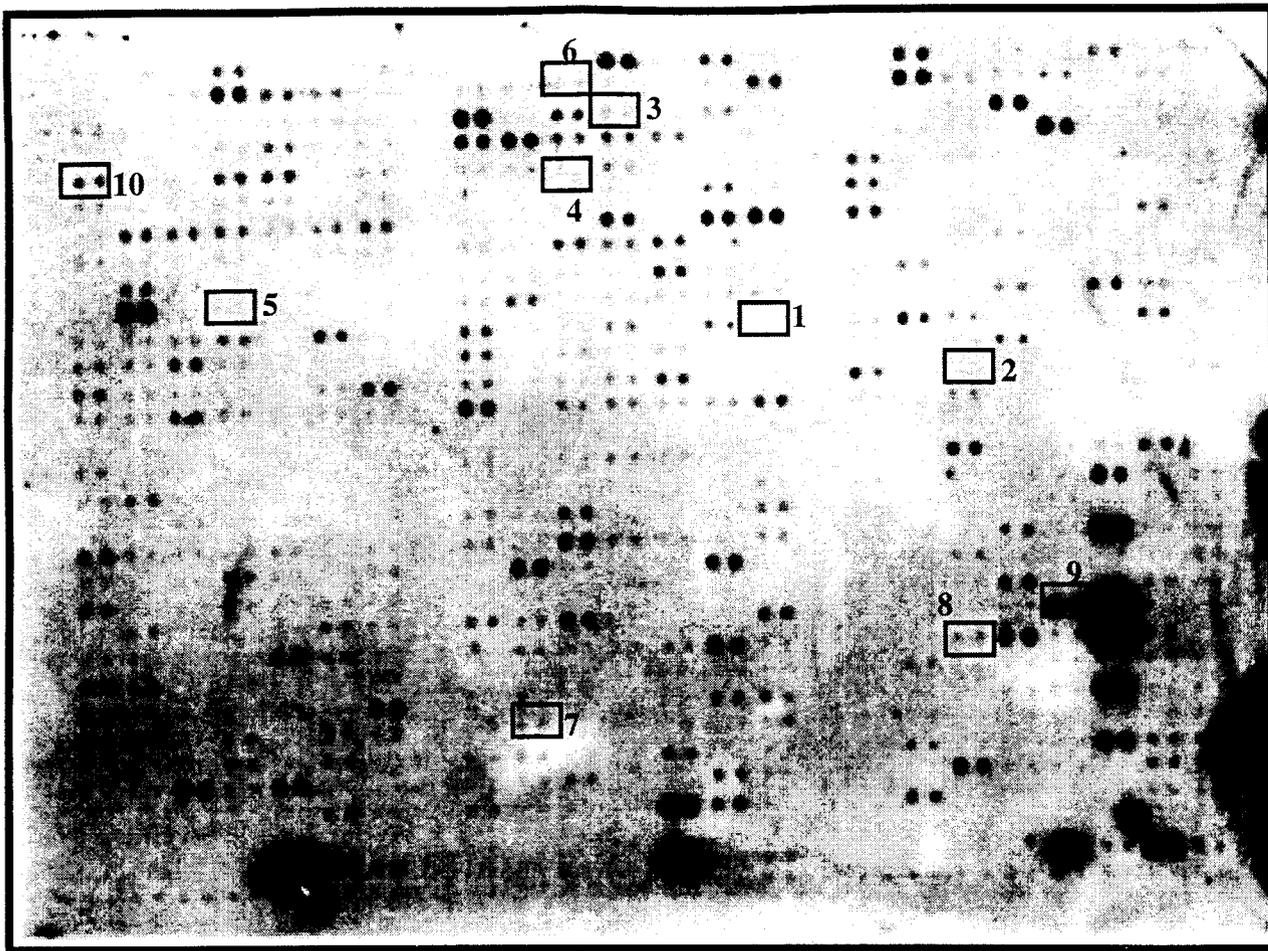


Fig. 5a. En esta figura se muestran los resultados del microarray control del experimento realizado en macrófagos peritoneales de ratón activados con 10 unidades de INF γ /ml. Los genes que se muestran son 1.IRF1, 2.iNOS, 3.STAT1, 4.LFA1, 5.VEGFR1, 6.IFNR2, 7.TGF β R1, 8.MADR2, 9.CDC42 y 10.EBI-APC en la membrana control.

Microarray con tratamiento del experimento de 10 unidades INF γ /ml

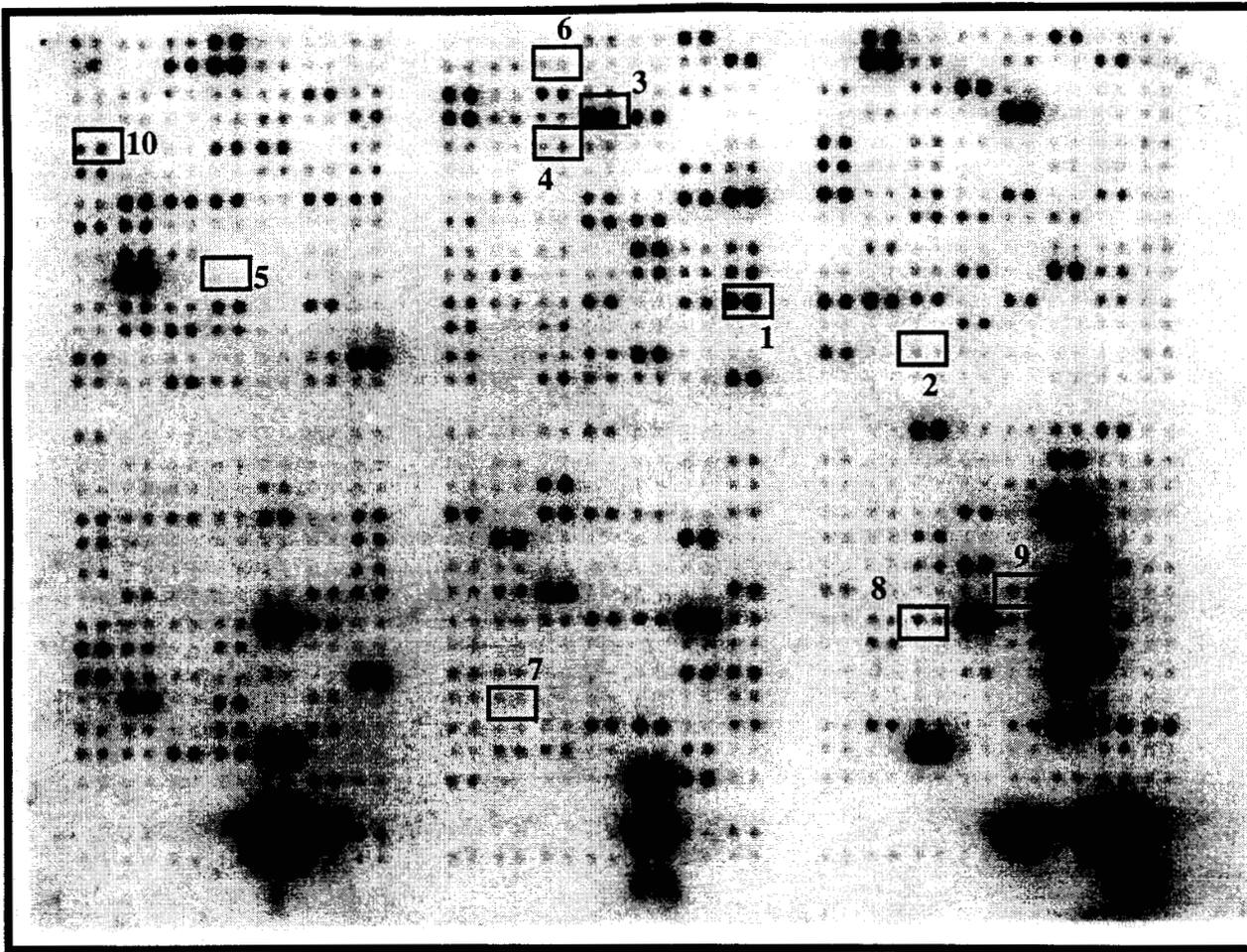


Fig. 5b. Resultados del tratamiento correspondiente a los mismos genes que el control, de los cuales 1.IRF1, 2.iNOS, 3.STAT1, 4.LFA1 se encuentran regulados a la alta y 6.IFNR2, 7.TGF β R1, 8.MADR2, 9.CDC42 y 10.EBI-APC regulados a la baja.

Cuadro 6.

Resultados experimento 10 Unidades / ml de IFNg

Loc. Gen	Intensi.	Fondo	Intensi.	Intensi.	Fondo	Intensi.	Radio	Veces	Veces	Dife_ rencia	Proteina/gene
	Control	Control	Ajust. Control	Trat.	Treat.	Ajust. Trat.		Reg. Alta	Reg. Baja		
B7k	31	17	14	123	5	118	Vacio	8.4	0	104	IRF1; factor 1 regulatorio de interferón
C3m	18	17	1	9	5	4	Vacio	4.0	0	3	sintasa óxido nítrico inducible (iNOS)
F1m	13	17	0	8	5	3	Vacio	3.0	0	3	monocina inducida por interferón gama (MIG)
F7h	133	17	116	120	5	311	2.68104	2.7	0	195	activador del inhibidor de plasminógeno
F6e	92	78	14	41	5	36	Vacio	2.6	0	22	miosina no convencional VI
C5g	35	17	18	22	5	46	Vacio	2.6	0	28	Atm; homólogo murino de ataxia telangiectasia
B3e	19	17	2	10	5	5	Vacio	2.5	0	3	LFA1-alpha; integrina L alfa; cadena alfa de glicoproteína de adhesión de leucocito LFA-1
B4d	81	17	64	178	21	157	2.45313	2.5	0	93	Stat1; transductor de señal y activador de transcripción
F6i	343	293	50	112	5	107	2.14000	2.1	0	57	cathepsina H
C1k	42	17	25	58	5	53	Vacio	2.1	0	28	BID; agonista de muerte apoptotica
F6n	21	17	4	8	5	8	Vacio	2.0	0	4	gelatinasa B
B2g	24	17	7	16	5	11	Vacio	1.6	0	4	B7-2; Antígeno activador de linfocitos T CD86; CD28 antígeno ligando 2, Antígeno B7-2
C3g	24	17	7	15	5	10	Vacio	1.4	0	3	Fas; Antígeno ligando Fas
A1h	36	17	19	32	5	27	Vacio	1.4	0	8	Mdm2; proteína regulando p53
D4k	53	17	36	48	5	43	1.19444	1.2	0	7	proteína 1 inducida por interferón
B7n	86	17	69	79	5	74	1.07246	1.1	0	5	Zyxin; Dominio proteína LIM; proteína de unión actinina-alfa
A4j	16	17	0	6	5	1	Vacio	1.0	0	1	receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1)
B3h	66	17	49	7	5	2	Vacio	0	24.5	-47	proteína receptora de transferrina (p90, CD71)
F5g	260	17	243	29	5	24	0.09877	0	10.1	-219	CDC42 GTP-uniendo proteína; G25K
E2k	33	17	16	7	5	2	Vacio	0	8.0	-14	TGF-beta receptor tipo 1
F7j	52	17	35	11	5	6	Vacio	0	5.8	-29	inhibidor 2 serina proteasa
E2l	38	17	21	9	5	4	Vacio	0	5.3	-17	interferón alpha-beta receptor
D7f	62	17	45	15	5	10	0.22222	0	4.5	-35	factor de transcripción SP1P; dominio POU
A2a	30	17	13	8	5	3	Vacio	0	4.3	-10	tumor supresor maspin
A5b	63	17	46	16	5	11	0.23913	0	4.2	-35	c-Cbl proto-oncogene (adaptor proteína)
C7k	104	17	87	26	5	21	0.24138	0	4.1	-66	enzima conjugadora de ubiquitina, ratón HR6B
F4d	181	17	164	45	5	40	0.24390	0	4.1	-124	trombomodulina
F4h	1415	17	1398	352	5	347	0.24821	0	4.0	-1051	factor beta de necrosis tumoral (TNF-beta); linfotoxina-alfa
C3j	56	17	39	15	5	10	0.25641	0	3.9	-29	gadd45; proteína inducible de arresto y daño de DNA
C4l	92	17	75	25	5	20	0.26667	0	3.8	-55	SPI3; serpin; similar a proteinasa inhibidora 6 humana
A1e	115	17	98	32	5	27	0.27551	0	3.6	-71	EB1 proteína uniendo APC
F6b	518	17	501	150	5	145	0.28942	0	3.5	-356	cadena 3 ligera de miosina no muscular
D3m	192	17	175	56	5	51	0.29143	0	3.4	-124	HMG-14 proteína cromosomal no histona
F4i	41	17	24	12	5	7	Vacio	0	3.4	-17	uromodulina
F7m	105	17	88	31	5	26	0.29546	0	3.4	-62	TIMP-metaloproteinasas 2 de inhibidor de tejido 2
B1k	88	17	71	26	5	21	0.29578	0	3.4	-50	ERp72 proteína de stress retículo endoplásmico; proteína relacionada con isomerasa disulfido
F6l	1869	17	1852	557	5	552	0.29806	0	3.4	-1300	proteasa 2 citotóxica celular (B10)
B1m	67	17	50	20	5	15	0.30000	0	3.3	-35	Proteína regulando glucosa, 78 kDa; Grp78
E7d	47	17	30	14	5	9	Vacio	0	3.3	-21	integrina alpha 6
E1g	50	17	33	15	5	10	Vacio	0	3.3	-23	receptor C5A

F6m	50	17	33	15	5	10	Vacio	0	3.3	-23	gene 1 CCP de serina proteasa especifica de linfocito T citotoxico
A7g	66	17	49	20	5	15	0.30612	0	3.3	-34	p57kip2; cdk- inhibidor cdk- de kip2
F7a	138	17	121	43	5	38	0.31405	0	3.2	-83	enzima convirtiendo - interleucina (ICE)
C4h	58	17	41	18	5	13	0.31707	0	3.2	-28	PS-2; gene homologo de enfermedad de Alzheimer
F6j	2498	17	2481	809	5	804	0.32406	0	3.1	-1677	catepsina L
B5h	125	17	108	40	5	35	0.32407	0	3.1	-73	quinasa 1 regulando señal extracelular (ERK1); p44; Ert2
F4g	41	17	24	13	5	8	Vacio	0	3.0	-16	factor de crecimiento transformante 2 beta
B7b	169	17	152	56	5	51	0.33553	0	3.0	-101	Rab-2 proteína relacionada -ras
B6a	112	17	95	37	5	32	0.33684	0	3.0	-63	MAPKK1; MAP quinasa quinasa 3 (especificidad dual) (MKK1)
F6k	76	17	59	25	5	20	0.33898	0	3.0	-39	colagenasa tipo IV
F3h	40	17	23	13	5	8	Vacio	0	2.9	-15	proteína 2 relacionada con Mad (MADR2)
F6f	71	31	40	19	5	14	0.35000	0	2.9	-26	enzima convirtiendo-angiotensina (ACE) (clon ACE.5.)
F6g	4624	386	4238	1517	5	1512	0.35677	0	2.8	-2726	catepsina B
B3b	50	17	33	17	5	12	Vacio	0	2.8	-21	IFNgR2; Segunda cadena (beta) de receptor para interferón-gamma
C7j	61	17	44	21	5	16	0.36364	0	2.8	-28	translin; proteína de puntos recombinantes
D1d	90	17	73	32	5	27	0.36986	0	2.7	-46	AT factor de unión del motif ATBF1
F6c	49	17	32	14	5	12	Vacio	0	2.7	-20	Rab-3b proteína ras-relacionada
A2g	163	17	146	62	5	57	0.39041	0	2.6	-89	c-ErbA oncogene; receptor de hormona tiroidea.
C3b	72	17	55	27	5	22	0.40000	0	2.5	-33	inhibidor de lisis por complemento
B4g	132	17	115	52	5	47	0.40870	0	2.4	-68	Stat6; transductor de señal y activador de transcripción 6; IL-4 Stat; STA6
E6m	64	17	47	25	5	20	0.42553	0	2.4	-27	dystroglican 1
C2b	584	17	567	262	5	257	0.45326	0	2.2	-310	glutation S- transferasa Mu 1
F6d	2894	17	2877	1361	5	1356	0.47132	0	2.1	-1521	vimentina
B6k	65	17	48	28	5	23	0.47917	0	2.1	-25	PI3-K p85; fosfatidilinositol 3-quinasa subunidad reguladora; fosfoproteína p85
B5d	103	17	86	47	5	42	0.48837	0	2.0	-44	Syk tyrosina-proteína quinasa p21cdc42Hs quinasa activada (ack)
C2k	172	17	155	82	5	77	0.49677	0	2.0	-78	c-Akt proto-oncogene; Rac-alpha; proteína quinasa B (PKB)
F4f	261	17	244	127	5	122	0.50000	0	2.0	-122	factor beta de crecimiento transformante
F6h	6662	17	6645	3395	5	3390	0.51016	0	2.0	-3255	catepsina D
C2a	276	17	259	145	5	140	0.54054	0	1.9	-119	glutation S- transferasa (microsomal)
A4b	186	17	169	99	5	94	0.55621	0	1.8	-75	proto-oncogene c-Fms; receptor del factor 1 estimulador de colonias de macrófago (CSF-1)
B3c	85	17	68	45	5	40	0.58824	0	1.7	-28	cadena beta del receptor de interleucina -6; glicoproteína de membrana gp130
E3d	151	17	134	86	5	81	0.60448	0	1.7	-53	receptor interleucina-3
B7g	366	17	349	216	5	211	0.60459	0	1.7	-138	14-3-3 proteína eta
F7c	37	17	20	18	5	13	Vacio	0	1.5	-7	metaloproteinasas tipo matriz-membrana
C5d	378	17	361	250	5	245	0.67867	0	1.5	-116	receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR-1)
D5h	355	17	338	254	5	249	0.73669	0	1.4	-89	factor nuclear relacionado a P45 NF-E2
B6j	36	17	19	19	5	14	Vacio	0	1.4	-5	PI3-K p110; subunidad catalítica de fosfatidilinositol 3-quinasa
B4m	45	17	28	20	5	21	Vacio	0	1.3	-7	Crk adaptador de proteína
C1m	103	17	86	53	5	68	0.79070	0	1.3	-18	glutation reductasa
A3b	53	17	36	34	5	29	0.80556	0	1.2	-7	Fli-1 proto-oncogene relacionado con ets
F3a	156	17	139	119	5	114	0.82014	0	1.2	-25	factor de crecimiento parecido a insulina 1A
C5k	40	17	23	24	5	19	Vacio	0	1.2	-4	DNA ligasa III
F7d	49	17	32	33	5	28	Vacio	0	1.1	-4	proteasa nexina 1 (PN-1)
C3e	37	17	20	18	5	18	Vacio	0	1.1	-2	FAF1; factor asociado a proteína Fas; activador de apoptosis
F7i	67	17	50	37	5	45	0.90000	0	1.1	-5	inhibidor-2 del activador de plasminógeno
B5i	161	17	144	96	5	130	0.90278	0	1.1	-14	inhibidor de proteína quinasa activadora de

B4a	102	17	85	83	5	78	0.91765	0	1.1	-7	ARN, 58 kDa
A2j	370	17	353	406	77	329	0.93201	0	1.1	-24	NF-kB p65; Subunidad p65 del factor de transcripción NF-kappa-B
E6j	81	17	64	48	5	61	0.95313	0	1.0	-3	factor de terminación TTF-1, RNA polimerasa I
											Precursor de la subunidad alfa de la glicoproteína de superficie celular MAC-1; CR-3; antígeno CD11B

El 15% de los genes tuvo una disminución en su expresión de 4 a 5 veces menos el valor de la señal del control y presentan similitud, tanto en los genes como en su correspondiente magnitud. Sólo dos genes tienen una leve diferencia, maspin supresor de tumor y enzima conjugando ubiquitina, las dos presentan una diferencia de dos veces menos el valor registrado en el primer experimento. El 6% restante lo componen genes que disminuyeron su expresión de 7 veces en adelante, estando en este grupo, TGFβ con una expresión a la baja similar a la obtenida en el experimento de 50 unidades de IFNγ/ml, CDC42, con una expresión de 3 veces menos que en el anterior experimento.

Cuadro 7. Resultados del microarreglo de 10 U. IFN_γ /ml

No. De genes Identificados	Regulados a la alta			
	Número de genes	Por ciento Total	Por ciento	Magnitud* (mayor)
63	11	17.5	82 ^a	2-3
			18 ^b	4-8.4
	Expresados a la Baja			
	52	82	79 ^c	2-3
			15 ^d	4-5
			6	7

Nota.- Se generaron 90 genes en total y solo el 30% (27) no cumplen con el requisito de tener 2 veces más o menos la magnitud comparada con el control y se tomaron como 100% los 63 genes restantes.

* Número de veces más ó menos el valor del control

a.- 2 nuevos genes aparecen y que no se presentan en la dosis de 50 Unidades, BID y Atm.

b.- iNOS, IRF1.

c.- También se presentan en 50U., (excepto proteínas reguladoras de glucosa Grp70)

d.- Expresión de maspina y ubiquitina esta última 2 veces menos al de 50U.

Los resultados obtenidos en el experimento de 3 unidades de IFN γ /ml, tuvieron un total de 86 genes (cuadro 8), de éstos, 49 o sea el 57% no cumplieron con el requisito de dos o más veces el valor de la señal, por lo tanto los 37 genes restantes serán ahora el 100%(figura 6a y 6b, cuadro 9). De este 100%, el 16% se expresó a la alta, y el 83% de este total se expresó en una magnitud de 2 a 5 veces más el valor de la señal del control. En este grupo se encuentra el gen que codifica la proteína LFA1-alfa, la cual tiene un valor similar en los tres tratamientos. El gen que codifica IRF1, tuvo una expresión dosis respuesta, es decir que disminuyó en magnitud de expresión al disminuir la dosis. El gen que codifica la proteína 1 inducible por IFN, tiene un comportamiento poco coherente, ya que se expresa en igual magnitud en los tratamientos de 50 y 3 unidades de IFN γ /ml, pero en el tratamiento de 10 unidades de IFN γ /ml, no se expresa. En este grupo, aparece un nuevo gen, la proteína receptora de transferrina (p90), que en los anteriores experimentos se expresó marcadamente a la baja. El 17% restante de los genes regulados a la alta, lo representa un solo gen, VEGFR1, con una elevada magnitud de expresión a la alta, debido a que el valor del control es 0, además cabe mencionar, que en el tratamiento de 10 unidades de IFN γ /ml no se expresa.

Con respecto a los genes regulados a la baja, en total representan el 84%, de este total el 90% tuvo una magnitud de expresión a la baja de 2 a 7 veces menos el valor del control. En este grupo se encuentran genes que mantuvieron su expresión sin mucha variación en los tres tratamientos como metaloproteinasas tipo matriz-membrana, serpin (SPI3), IFN γ R2, Integrina alfa 6, CTLA1, clusterin, inhibidor de lisis por complemento, MADR2, TIMP-2, MAPKK1, colagenasa tipo IV y EB1.

Cuadro 8. Resultados del microarreglo de 3 U. IFN γ /ml

No. De genes Identificados	Regulados a la alta			
	Número de genes	Porciento Total	Porciento	Magnitud* (alta)
37	6	16	83 ^f	2-5
			17 ^g	
	Expresados a la Baja			
	Número de genes	Porciento Total	Porciento	Magnitud* (baja)
	31	84	90 ^h	2-7

Nota.-Se generaron 86 genes en total y el 57% (49) no cumplen con el requisito de tener 2 veces más o menos la magnitud comparada con el control y se tomaron como 100% los 37 genes restantes.

* Número de veces más ó menos el valor del control

f.- Gen de la proteína LFA1-alfa con valor similar en los tres tratamiento, IRF1 se expresa de acuerdo a la relación dosis respuesta.

Aparece un nuevo gen relacionado a proteínas receptora transferrina p90

g.- Un solo gen VEGFR1, y en el tratamiento de 10 U no aparece.

h.- Genes relacionados a las metaloproteinasas tipo matriz-membrana, serpin (SPI3), IFN γ R2, Integrina alfa 6, CTLA1, clusterin, inhibidor de lisis por complemento, MADR2, TIMP-2, MAPKK1, colagenasa tipo IV y EB1. Además están los genes que tuvieron dosis respuesta como enzima convertidora de angiotensina (ACE), catepsina L, RAB-2, proteína relacionada -ras, serina proteasa inhibidor 2 (Spi2), TGF β 2, uromodulina y finalmente TGF β R1.

También en este grupo se encuentran genes como gelatinasa B, factor proteico asociado a Fas (FAF1), factor nuclear relacionado con P45 NF-E2, Glutathion reductasa, y factor 1A de crecimiento parecido a insulina, que no tuvieron cambio en la dosis intermedia, y que en esta dosis baja si presentan un cambio.

Microarray control del experimento de 3 unidades INF γ /ml

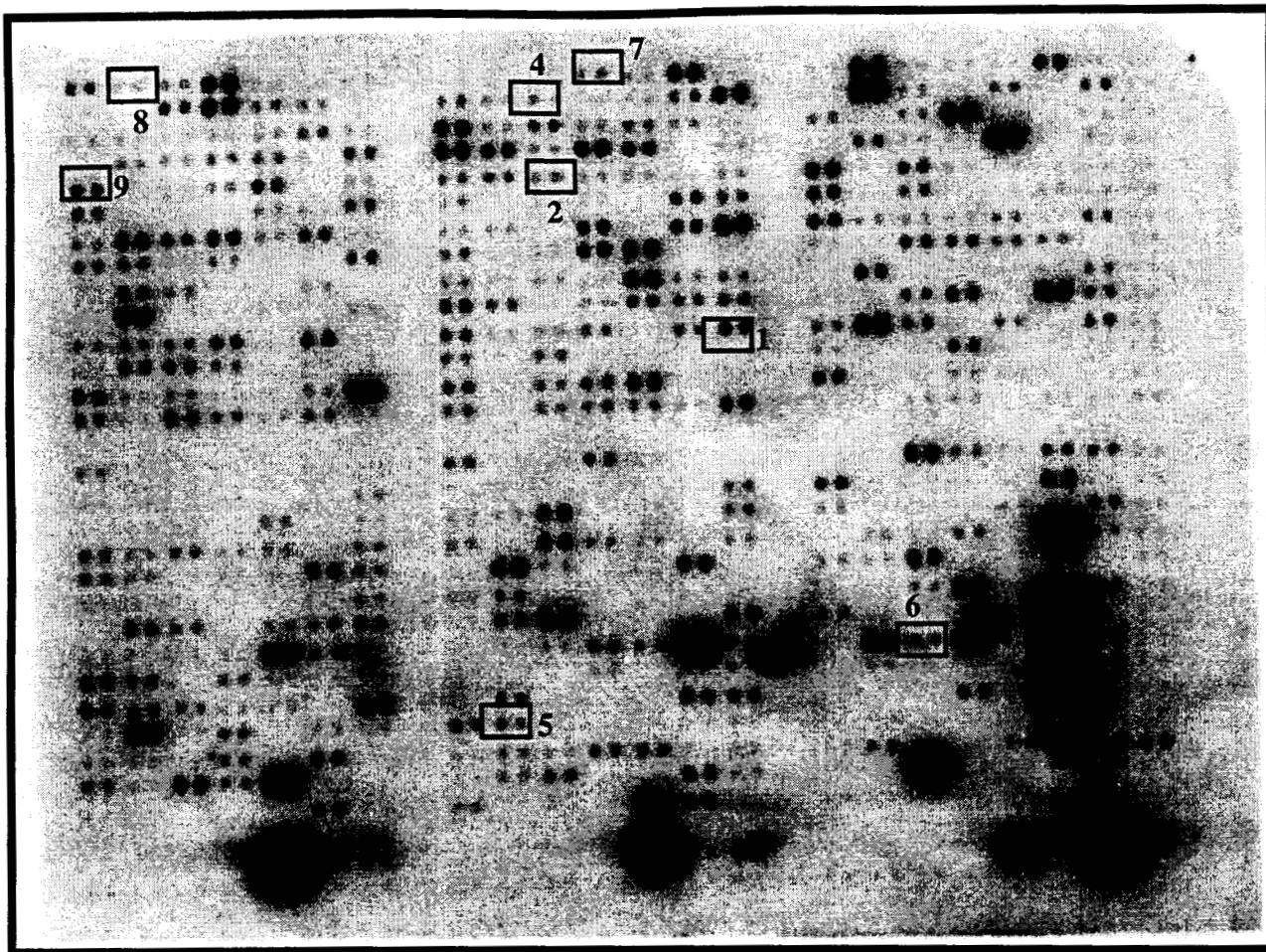


Fig. 6a. En esta figura se muestran los resultados del microarray del experimento realizado en macrófagos peritoneales de ratón activados con la dosis más baja de 3 unidades de INF γ /ml señalando la expresión de los siguientes genes: 1.IRF1, 2.LFA1, 4.IFNR2, 5.TGF β R1, 6.MADR2, 7. Subunidad 65 del factor de transcripción NF-kappaB (NF-kB p65) y 8. Maspin Tumor supresor y 9.EB1-APC

Microarray con tratamiento del experimento de 3 unidades $\text{INF}\gamma/\text{ml}$

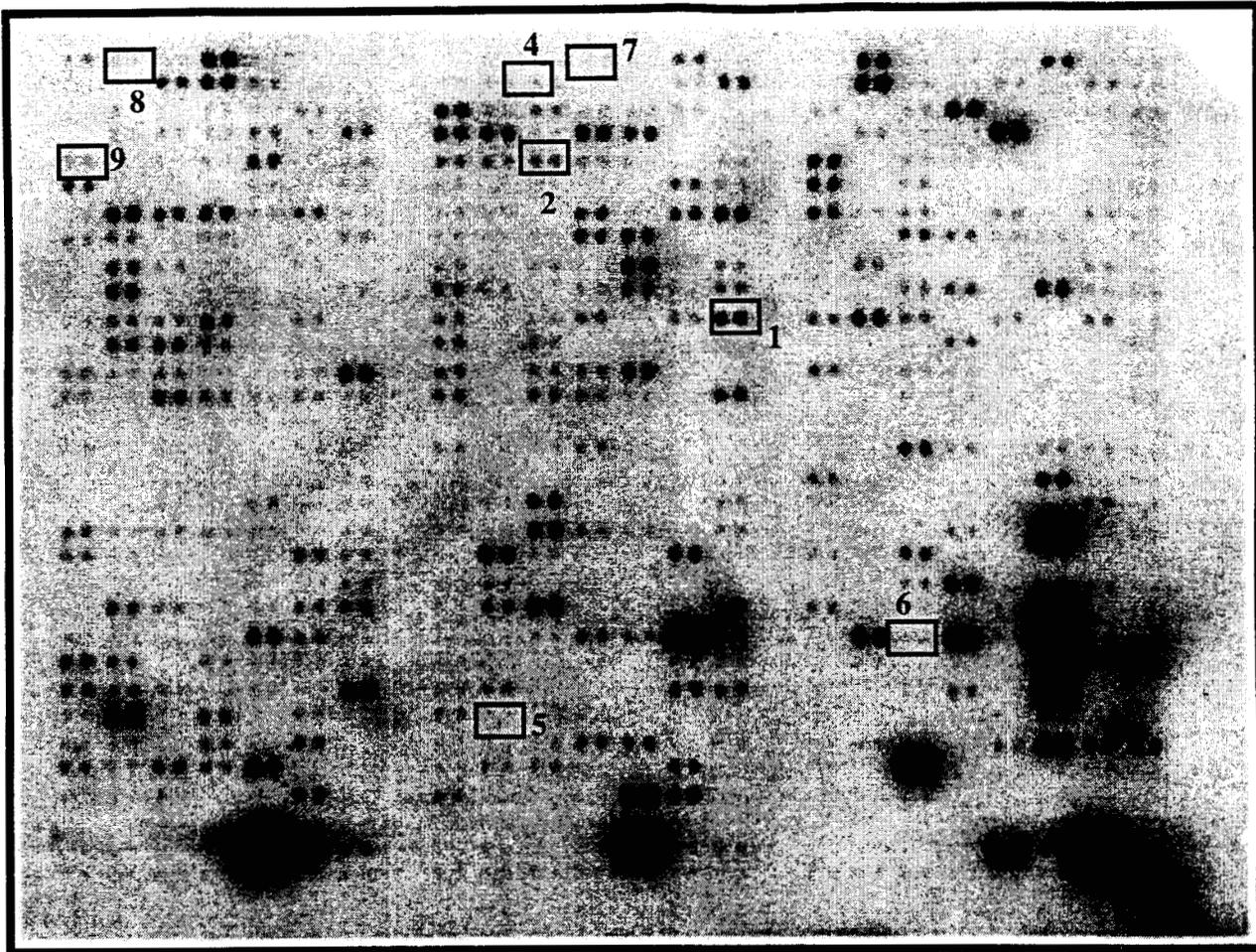


Fig.6b. Señala en cada cuadro los mismos genes que el control con los respectivos cambios debidos a la activación por $\text{INF}\gamma/\text{ml}$. 1.IRF1 y 2.LFA1 regulados a la alta y los genes 4.IFNR2, 5.TGF β R1, 6.MADR2, 7.NF-kB p65, 8. Maspin Tumor supresor y 9.EB1-APC regulados a la baja.

Cuadro 9.

Resultados Experimento 3 unidades IFNg/ml

xc. en	Intensi. Control	Fondo Control	Intensi. Ajust. Control	Intensi. Trat.	Fondo Treat.	Intensi. Ajust. Trat.	Radio	Veces Reg. Alta	Veces Reg. Baja	Dife_ rencia	Proteína/gene
4j	34	33	1	32	20	34	Vacio	34.0	0	33	receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1)
1g	36	33	3	25	20	14	Vacio	4.7	0	11	receptor C5A
4k	69	33	36	55	20	100	Vacio	2.8	0	64	proteína 1 inducida por interferón
3e	64	33	31	45	20	71	Vacio	2.3	0	40	LFA1-alpha; integrina L alfa; cadena alfa de glicoproteína de leucocito LFA-1
7k	163	33	130	118	20	282	2.169	2.2	0	152	IRF1; factor 1 regulatorio de interferón
3h	40	33	7	25	20	14	Vacio	2.0	0	7	proteína receptora de transferina (p90, CD71)
5e	127	33	94	67	20	135	1.436	1.4	0	41	miosina no convencional VI
5d	4926	33	4893	2250	20	6417	1.311	1.3	0	1524	vimentina
1k	78	33	45	40	20	57	Vacio	1.3	0	12	BID; agonista de muerte apoptótica
6g	68	33	35	35	20	43	Vacio	1.2	0	8	proteína interactuando con el receptor retinoide X (RIP 15)
5d	172	33	139	75	20	158	1.137	1.1	0	19	Syk tyrosina-proteína quinasa p21cdc42Hs quinasa activada (ack)
2g	295	33	262	120	20	287	1.095	1.1	0	25	c-ErbA oncogene; receptor de hormona tiroidea.
3g	56	33	23	29	20	25	Vacio	1.1	0	2	Fas; Antígeno ligando Fas
4d	346	33	313	136	20	333	1.064	1.1	0	20	Stat1; transductor de señal y activador de transcripción
3b	121	33	88	52	20	92	Vacio	1.0	0	4	Fli-1 proto-oncogene relacionado con ets
5g	105	33	72	46	20	74	Vacio	1.0	0	2	CDC42 - proteína unidora de GTP; G25K
1h	1339	33	1306	475	20	1309	1.002	1.0	0	3	factor beta de necrosis tumoral (TNF-beta); linfotoxina alfa
7g	41	33	8	23	20	8	Vacio	1.0	0	0	p57kip2; cdk- inhibidor cdk- de kip2
3m	35	33	2	21	20	2	Vacio	1.0	0	0	sintasa óxido nítrico inducible (iNOS)
4g	152	33	119	60	20	115	0.966	1.0	0	-4	Stat6; transductor de señal y activador de transcripción 6; IL-4 Stat; STA6
4a	82	33	49	14	20	0	Vacio	0	49.0	-49	NF-kB p65; Subunidad p65 del factor de transcripción NF-kappa-B
2a	54	33	21	16	20	0	Vacio	0	21.0	-21	Maspin supresor tumoral
7j	86	33	53	22	20	5	Vacio	0	10.6	-48	translin; proteína uniendo puntos recombinantes
1e	157	33	124	26	20	17	Vacio	0	7.3	-107	EB1 proteína unidora -APC
5n	100	33	67	24	20	11	Vacio	0	6.1	-56	gelatinasa B
5k	713	33	680	59	20	112	Vacio	0	6.1	-568	colagenasa tipo IV
2j	45	33	12	21	20	2	Vacio	0	6.0	-10	Blk; quinasalinfocito B; miembro de la familiaSrc
2k	71	33	38	23	20	8	Vacio	0	4.8	-30	receptor tipo 1 de TGF-beta
6b	95	33	62	25	20	14	Vacio	0	4.4	-48	MAPKK3; MAP quinasa quinasa 3 (especificidad dual)
5a	296	33	263	42	20	63	Vacio	0	4.2	-200	MAPKK1; MAP quinasa quinasa 3 (especificidad dual)
3h	89	33	56	25	20	14	Vacio	0	4.0	-42	proteína 2 relacionada con Mad (MADR2)
3e	113	33	80	27	20	20	Vacio	0	4.0	-60	FAF1; factor asociado a proteína Fas; activador de apoptosis

1m	142	33	109	31	20	31	Vacio	0	3.5	-78	Rb; pp105; proteína asociada a susceptibilidad a retinoblastoma (gene supresor tumoral)
3b	60	33	27	23	20	8	Vacio	0	3.4	-19	inhibidor de lisis por complemento
6m	59	33	26	23	20	8	Vacio	0	3.3	-18	gene 1 CCP de serina proteasa especifica de linfocito T citotóxico
7m	109	33	76	29	20	25	Vacio	0	3.0	-51	TIMP-metaloproteinasas 2 de inhibidor de tejido 2
7d	48	33	15	22	20	5	Vacio	0	3.0	-10	integrina alfa 6
7j	157	33	124	35	20	43	Vacio	0	2.9	-81	inhibidor 2 de serina proteasa
7a	73	33	40	25	20	14	Vacio	0	2.9	-26	enzima convirtiendo - interleucina (ICE)
13b	63	33	30	24	20	11	Vacio	0	2.7	-19	IFN γ R2; Segunda cadena (beta) de receptor para interferón gamma
15h	641	33	608	104	20	241	0.396	0	2.5	-367	factor nuclear relacionado a P45 NF-E2
17b	340	33	307	63	20	123	0.401	0	2.5	-184	Rab-2 proteína relacionada -ras
4g	89	33	56	28	20	23	Vacio	0	2.4	-33	factor de crecimiento transformante 2 beta
4i	51	33	18	23	20	8	Vacio	0	2.3	-10	uromodulina
6j	8911	33	8878	1439	20	4083	0.460	0	2.2	-4795	cathepsina L
11m	155	33	122	40	20	57	Vacio	0	2.1	-65	glutathion reductasa
16j	696	33	663	129	20	313	0.472	0	2.1	-350	MHR23B; proteína homóloga de reparación de escisión UV
14l	121	33	88	35	20	43	Vacio	0	2.0	-45	SPI3; serpin; similar a proteinasa inhibidora 6 humana
7c	160	33	127	42	20	63	Vacio	0	2.0	-64	metaloproteinasas tipo matriz-membrana
6f	251	33	218	58	20	109	Vacio	0	2.0	-109	enzima convirtiendo-angiotensina (ACE) (clon ACE.5.)
3a	313	33	280	70	20	143	0.511	0	2.0	-137	factor de crecimiento parecido a insulina 1A
11h	87	33	54	30	20	28	Vacio	0	1.9	-26	Mdm2; proteína regulando p53
4b	469	33	436	103	20	238	0.546	0	1.8	-198	proto-oncogene c-Fms; receptor del factor 1 estimulador de colonias de macrófago (CSF-1)
17k	106	33	73	34	20	40	Vacio	0	1.8	-33	enzima conjugadora de ubiquitina, ratón HR6B
4d	64	33	31	26	20	17	Vacio	0	1.8	-14	trombomodulina
12k	622	33	589	133	20	325	0.552	0	1.8	-264	Receptor tipo 1 de TGF-beta
12b	1059	33	1026	220	20	575	0.560	0	1.8	-451	Receptor tipo 1 de TGF-beta
13j	88	33	55	31	20	31	Vacio	0	1.8	-24	gadd45; proteína inducible de arresto y daño de DNA
16j	82	33	49	30	20	28	Vacio	0	1.8	-21	PI3-K p110; subunidad catalítica de fosfatidilinositol 3-quinasa
4m	122	33	89	38	20	51	Vacio	0	1.7	-38	Crk adaptor de proteína
4h	104	33	71	35	20	43	Vacio	0	1.7	-28	PS-2; gene homologo de enfermedad de Alzheimer
13m	246	33	213	66	20	132	0.620	0	1.6	-81	HMG-14 proteína cromosomal no histona
7i	357	33	324	91	20	204	0.630	0	1.6	-120	inhibidor-2 del activador de plasminógeno
7d	82	33	49	31	20	31	Vacio	0	1.6	-18	nexin 1 proteasa (PN-1)
15k	62	33	29	27	20	20	Vacio	0	1.5	-9	DNA ligasa III
1b	114	33	81	40	20	57	Vacio	0	1.4	-24	proteína 1 morfogenética de hueso
5h	312	33	279	89	20	198	0.710	0	1.4	-81	quinasa 1 regulando señal extracelular (ERK1); p44; Ert2
6m	141	33	108	47	20	77	Vacio	0	1.4	-31	dystroglican 1
13c	102	33	69	38	20	51	Vacio	0	1.4	-18	cadena beta del receptor de interleucina -6; glicoproteína de membrana gp130

225562

7g	478	33	445	136	20	333	0.748	0	1.3	-112	14-3-3 proteína eta
5b	353	33	320	107	20	250	0.781	0	1.3	-70	cadena 3 ligera de miosina no muscular
7f	47	33	14	24	20	11	Vacio	0	1.3	-3	factor de transcripción SP1P; dominio POU de factor de transcripción
1d	374	33	341	114	20	270	0.792	0	1.3	-71	HSP86; proteína de 86-kDa de choque térmico
2a	439	33	406	132	20	322	0.793	0	1.3	-84	glutathion S- transferasa (microsomal)
1d	83	33	50	34	20	40	Vacio	0	1.3	-10	AT factor de unión del motif ATBF1
2i	54	33	21	26	20	17	Vacio	0	1.2	-4	receptor alfa beta de interferón
2i	166	33	133	58	20	109	Vacio	0	1.2	-24	proto-oncogene c-Jun (factor de transcripción AP-1
5d	1240	33	1207	377	20	1027	0.851	0	1.2	-180	receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR-1)
7n	183	33	150	65	20	129	0.860	0	1.2	-21	Zyxin; Dominio proteína LIM; proteína de unión actinina-alfa
1k	105	33	72	42	20	63	Vacio	0	1.1	-9	ERp72 proteína de stress reticulo endoplásmico; proteína relacionada con isomerasa disulfido
5g	8936	33	8903	2755	20	7871	0.884	0	1.1	-032	catepsina B
5i	1333	33	1300	424	20	1162	0.894	0	1.1	-138	Proteasa citotóxica celular 2 (B10)
5i	393	33	360	133	20	325	0.903	0	1.1	-35	inhibidor de proteína quinasa activadora de ARN, 58 kDa
4f	506	33	473	173	20	440	0.930	0	1.1	-33	factor beta de crecimiento transformante
7j	114	33	81	48	20	80	Vacio	0	1.0	-1	Receptor para laminina 1
1m	34	33	1	18	20	0	Vacio	0	1.0	-1	monocina inducida por interferón gama (MIG)

El siguiente grupo, lo representan genes que tuvieron dosis respuesta como enzima convertidora de angiotensina (ACE), catepsina L, RAB-2, proteína relacionada -ras, serina proteasa inhibidor 2 (Spi2), TGFB2, uromodulina y finalmente TGFb R1. También en este grupo se encuentran genes como gelatinasa B, factor proteico asociado a Fas (FAF1), factor nuclear relacionado con P45 NF-E2, Glutathion reductasa, y, factor 1A de crecimiento parecido a insulina, que no tuvieron cambio en la dosis intermedia, y que en esta dosis baja si presentan un cambio. Por último, los genes proteína homóloga de reparación de escisión UV Rad 23 y Quinasa de linfocito B (BLK), los cuales se encuentran en este grupo de expresión a la baja entre 2 y 7 veces menos, pero en las dosis anteriores no habían presentado cambio alguno.

Por último se encuentra el grupo de genes que presentó una magnitud de expresión a la baja, de más de 8 veces la señal generada por el control. Estos genes no presentan congruencia en los resultados, como en el caso de supresor de tumor maspin, que en este experimento presenta una magnitud muy alta al igual que los genes que codifican NF-kB p65 y la proteína uniendo puntos recombinantes (traslin), este valor tan alto de la señal se debe a que a que el valor de la señal del control es igual a 0, éste último gen no presenta ningún cambio en las dos dosis anteriores, el gen que codifica el receptor de la fracción de complemento C5A, se encuentra también en este grupo, y tuvo un comportamiento similar, ya que en las dos primeras dosis está regulado a la baja y en la dosis menor aparece regulado a la alta.

Posteriormente a los microarreglos, se hicieron transferencias Northern (Northern blots) de 7 genes para conocer la veracidad de los resultados. Se escogieron dos genes regulados a la alta, IRF1 y STAT1 y 4 genes regulados a la baja, TGF β R1, TGF β , los cuales están relacionados con TGF β , el gen que codifica la proteína CDC42, relacionada con el movimiento del macrófago, y, IFN γ R2, porque en los resultados de microarreglos tuvo un comportamiento a la baja de similar magnitud en los tres tratamientos y, finalmente Fli1 por tener un comportamiento un poco extraño en los resultados de los tres tratamientos. Los Northern blot, se realizaron con ARN poli A, y solo con la dosis alta (50 unidades de IFN γ /ml) y la baja (3 unidades de IFN γ /ml) y se usó para normalizar los resultados el gen que codifica la proteína S29. Los resultados con respecto a los genes regulados a la alta IRF1 y STAT1 (Fig. 7), ratifican los resultados obtenidos en los microarreglos en una proporción similar. En relación a los genes involucrados con TGF β , TGF β R1 y TGF β (Fig.8), la proporción obtenida en el microarreglos fue mucho mayor a la obtenida en los Northern blots, pero la tendencia se mantiene claramente a la baja, sobre todo en TGF β R1 en la dosis de 50 unidades y para TGF β en la dosis de 3 unidades/ml. Los resultados obtenidos en el gen que codifica Fli 1, es similar al obtenido en el microarreglo, al igual que el gen que codifica CDC42, al parecer, los genes no son estimulados con la dosis menor de 3 unidades de IFN γ /ml. Los resultados obtenidos con respecto al gen que codifica el receptor 2 para de IFN γ , con la dosis alta muestra una disminución marcada en su expresión, mientras que en la dosis baja, también existe un cambio aunque menor, pero en ambos casos es menor que el registrado en las membranas de microarreglo, ya que la disminución fue alrededor de 3 veces menos la señal registrada por el control en los correspondientes microarreglos (fig. 9).

Como una tercera y última comprobación de los datos registrados en los microarreglos, se hicieron Northern blots de 4 genes, dos de los cuales fueron regulados a la alta, IRF1 y STAT1 y dos regulados a la baja, CDC42 y TGF β R1. Para este último experimento se utilizó un bloqueador de la ruta de señalización para IFN γ llamado tirfostin AG490, el cual funciona bloqueando la actividad de JAK2, inhibiendo específicamente la actividad tirosina quinasa e interrumpiendo por consecuencia toda la señalización. Para realizar este experimento se utilizaron ARN total y Poli A, los únicos resultados que se presentan son los de Poli A, porque los resultados son mucho más claros, ya sea manteniendo, disminuyendo o aumentando la expresión de los cADNs. Cabe mencionar, que siempre se mantuvo la misma tendencia, tanto en los experimentos realizados con ARN total y Poli A. Cada uno de los experimentos fue realizado con macrófagos peritoneales de ratón, como en los demás experimentos y con la siguiente estructura: un grupo control, un grupo la dosis alta de IFN γ utilizada en todos nuestros experimentos (50 unidades de IFN γ /ml) y un tercer grupo con la dosis anterior de IFN γ y AG490 a una concentración de 40 mM.

Los resultados obtenidos con los genes regulados a la alta (Fig.10), fueron inesperados porque la expectativa, era obtener resultados similares en el grupo control y en el tercer grupo tratado con IFN γ y AG 490, y no fue así, en los experimentos realizados con estos dos genes el tercer grupo con tratamiento de IFN γ y AG490, tuvo un comportamiento similar al tratado sólo con IFN γ , indicando el no bloqueo de la ruta de señalización. Para el ARNm de STAT 1, el grupo tratado con IFN γ aumentó alrededor de tres veces el valor del control y el resultado obtenido por el grupo de IFN γ más AG490, reportó un aumento de alrededor de 2.5 veces el valor de la señal del control. En el caso de IRF1, el valor del grupo de células tratadas con IFN γ fue de alrededor

Transferencia Northern de los genes regulados a la alta por $IFN\gamma$

el grupo de $IFN\gamma$ más AG490, reportó un aumento de alrededor de 2.5 veces el valor de la señal del control. En el caso de IRF1, el valor del grupo de células tratadas con $IFN\gamma$ fue de alrededor

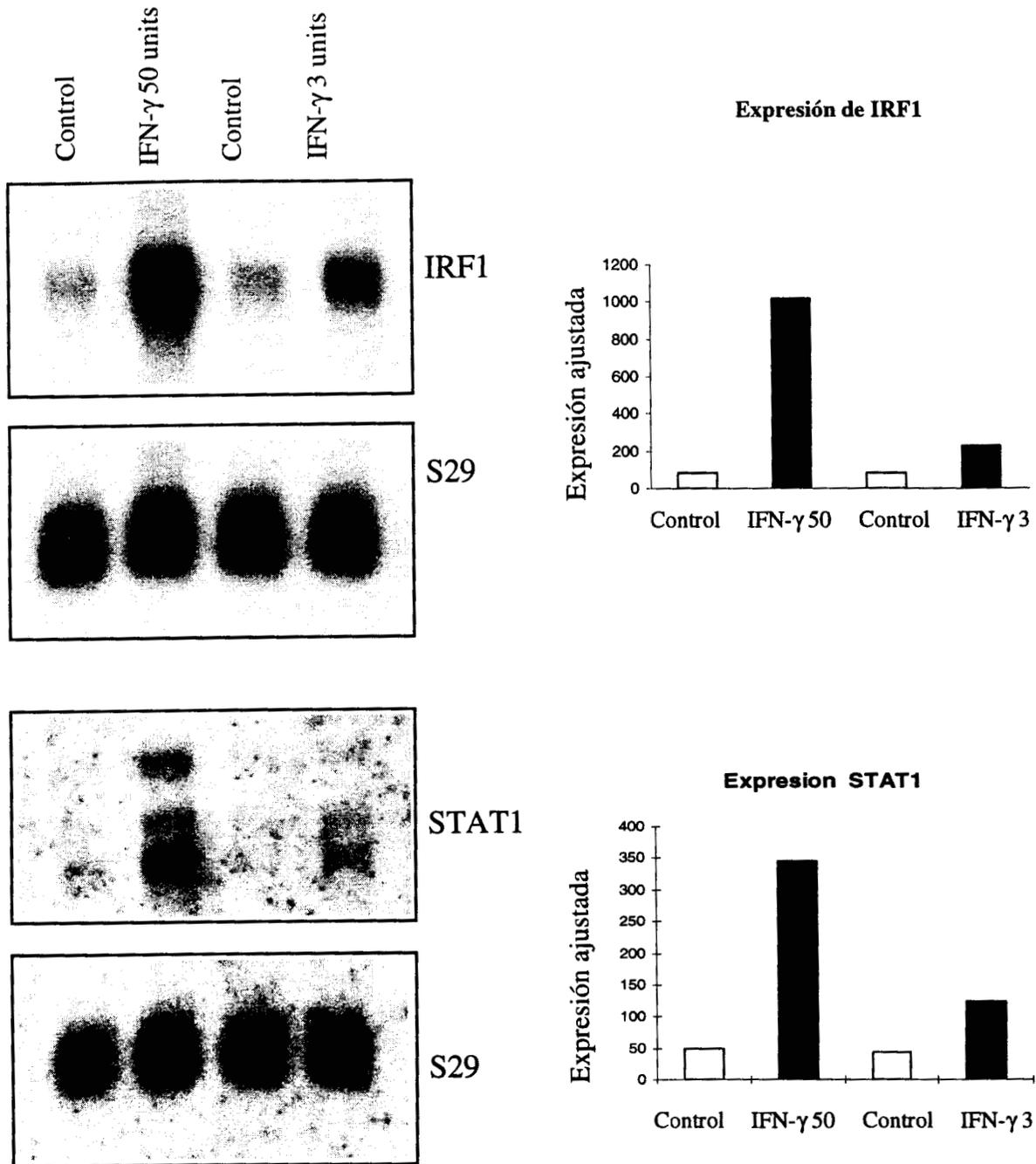


Fig 7. Para conocer la veracidad de los resultados obtenidos en los microarrays se hicieron transferencias Northern del mRNA obtenido de macrófagos peritoneales de ratón con la dosis alta de 50 unidades de $IFN\gamma/ml$ y la dosis baja de 3 unidades de $IFN\gamma/ml$ de dos genes regulados a la alta IRF1 y STAT1, los resultados obtenidos se normalizaron con la hibridación obtenida del mRNA que codifica la proteína ribosomal S29. Los resultados muestran el mismo comportamiento de los dos genes y es muy cercana la magnitud de expresión en la transferencia a la alcanzada en los microarrays.

Transferencia Northern de los genes relacionados con TGF β activados con INF γ

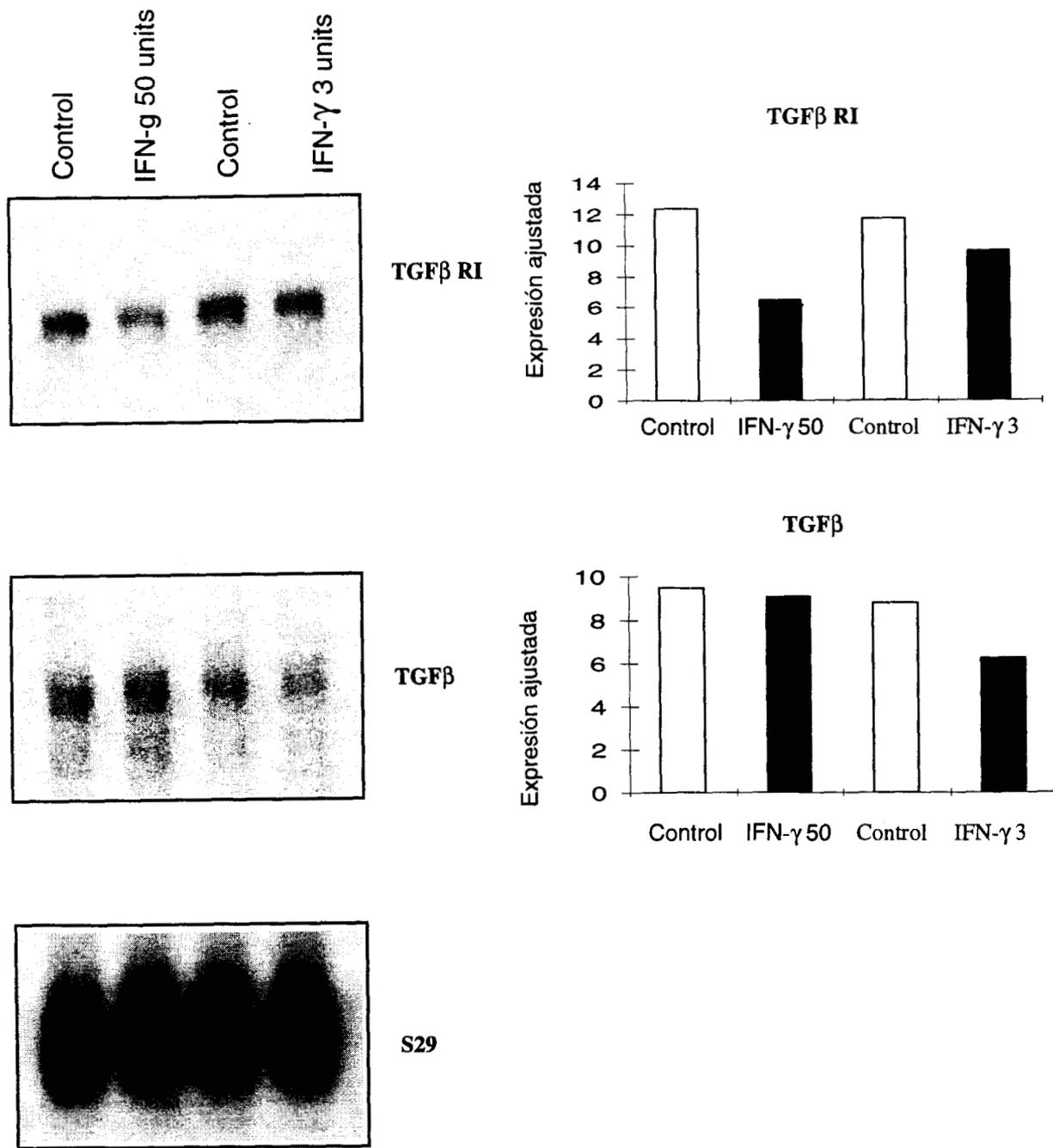


Fig 8. Para conocer la veracidad de los resultados obtenidos en los microarrays se hicieron transferencias Northern del mRNA obtenido de macrófagos peritoneales de ratón con la dosis alta de 50 unidades de INF γ /ml y la dosis baja de 3 unidades de INF γ /ml de dos genes regulados a la baja TGF β y TGF β R1. Los resultados muestran para TGF β un comportamiento similar, solo que de proporción diferente, sobre todo en la dosis de 50 U/ml, en la cual es muy leve el cambio de expresión. Para TGF β R1 la tendencia en las dos dosis se mantiene claramente a la baja, solo la proporción no es la misma.

Transferencia Northern de los genes regulados a la baja por $\text{INF}\gamma$

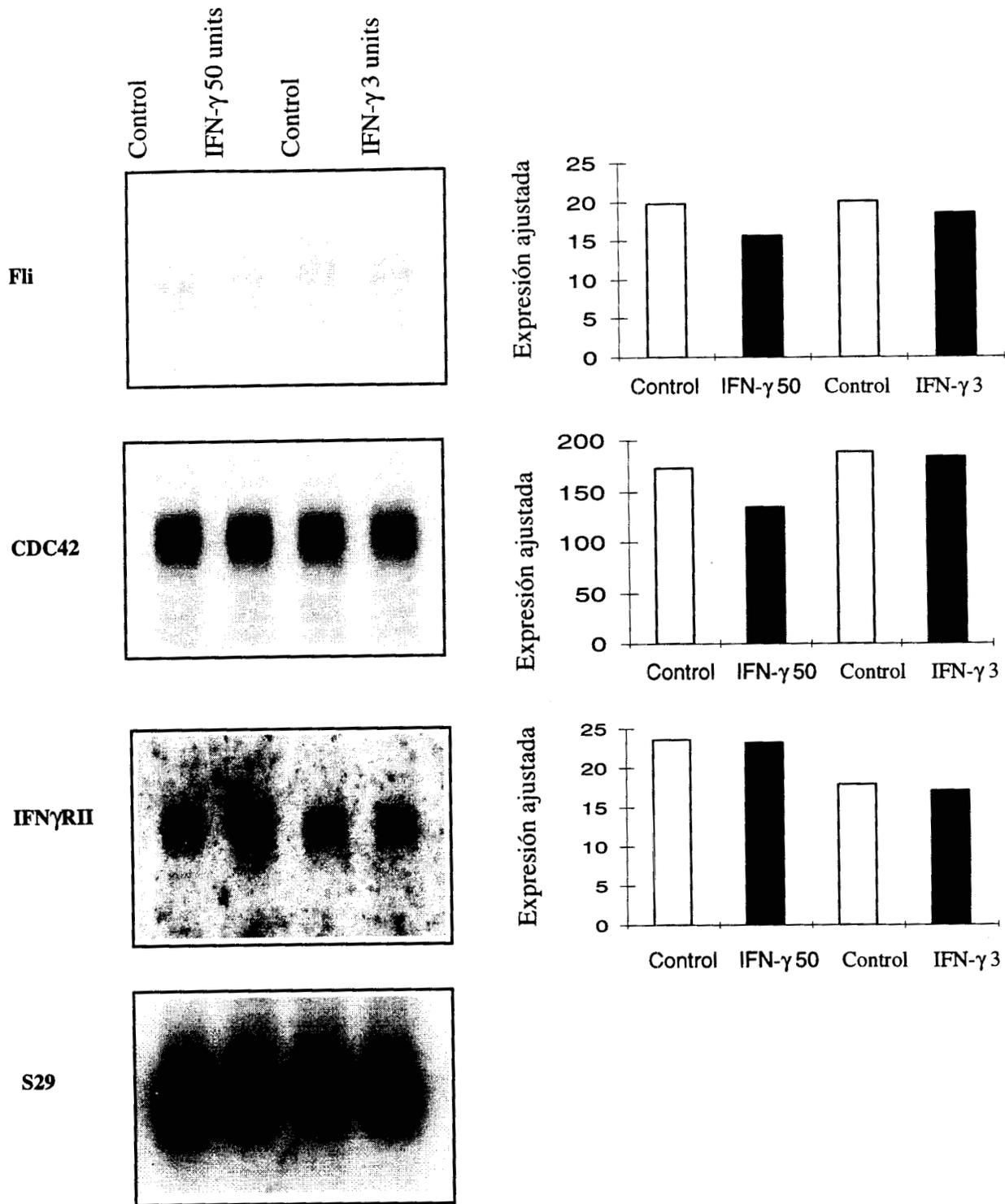


Fig. 9. Para conocer la veracidad de los resultados obtenidos en los microarrays se hicieron transferencias Northern del mRNA obtenido de macrófagos peritoneales de ratón con la dosis alta de 50 unidades de $\text{INF}\gamma/\text{ml}$ y la dosis baja de 3 unidades de $\text{INF}\gamma/\text{ml}$ de otros tres genes regulados a la baja, Fli1, CDC42 e $\text{INF}\gamma\text{RII}$. Los resultados muestran tanto para Fli1 y CDC42 una tendencia similar a la obtenida en los microarrays, solo que la magnitud de la expresión a la baja no es igual. Con respecto a $\text{INF}\gamma\text{RII}$, la tendencia en las dos dosis se mantiene presentando un ligero cambio en la dosis de 50U/ml y obviamente la proporción varía notablemente a la obtenida en el microarray.

Transferencia Northern de genes regulados a la alta por $\text{INF}\gamma$ con AG-490 como bloqueador de la ruta de señalización

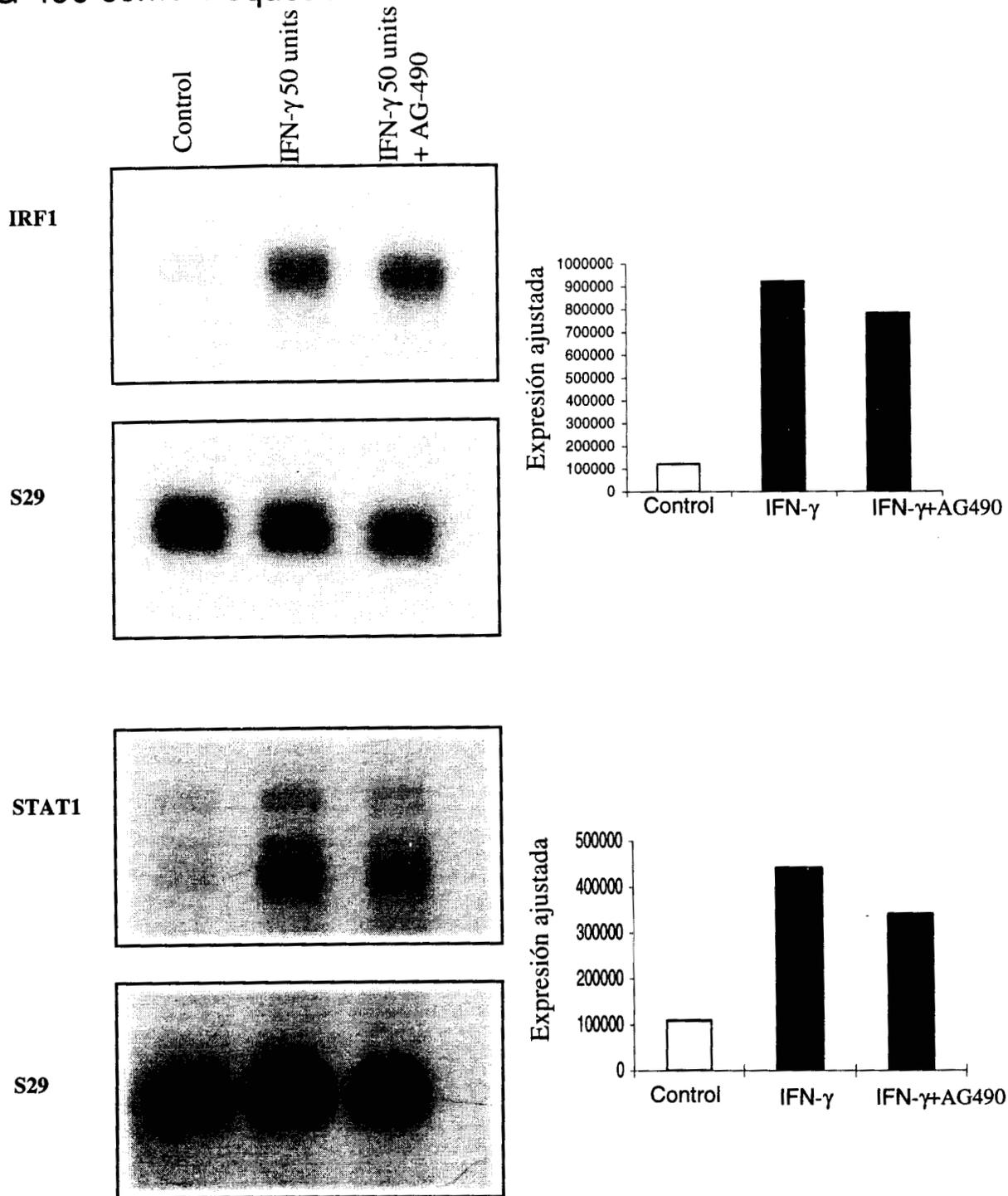


Fig. 10. Como una segunda comprobación de los resultados obtenidos en los microarrays se hicieron transferencias Northern del mRNA obtenido de macrófagos peritoneales de ratón con la dosis alta de 50 unidades de $\text{INF}\gamma/\text{ml}$ usando el bloqueador de la ruta JAK-STAT, AG490. Los resultados obtenidos de los genes regulados a la alta fueron inesperados ya que ninguno de estos genes se bloqueó el estímulo desencadenado por $\text{INF}\gamma$, presumiblemente puede existir una ruta alterna. El resultado obtenido con interferón en este experimento fué similar al de los microarrays.

de 7 veces más el valor del control y la expresión de este gen en el grupo tratado con IFN γ y AG490, fue la misma. Cabe mencionar que este experimento, dado sus resultados, se repitió dos veces más con resultados similares.

Con respecto a los dos genes regulados a la baja, en lo microarreglos (fig 11), los resultados fueron los esperados. El grupo de células tratadas con IFN γ más AG 490, presentó un comportamiento similar, al grupo de células tratado control, expresando el gen, a diferencia del tratado con IFN γ , que manifestó la disminución de la expresión del gen. Comparando los resultados del microarreglos con este experimento son muy cercanos los valores de la regulación a la baja de estos genes.

El análisis de t de Student de los resultados obtenidos de óxido nítrico en todos los experimentos a las 48 hr., reporto una significancia $p < 0.05$

Transferencia Northern de genes regulados a la baja por $\text{INF}\gamma$ con AG-490 como bloqueador de la ruta de señalización

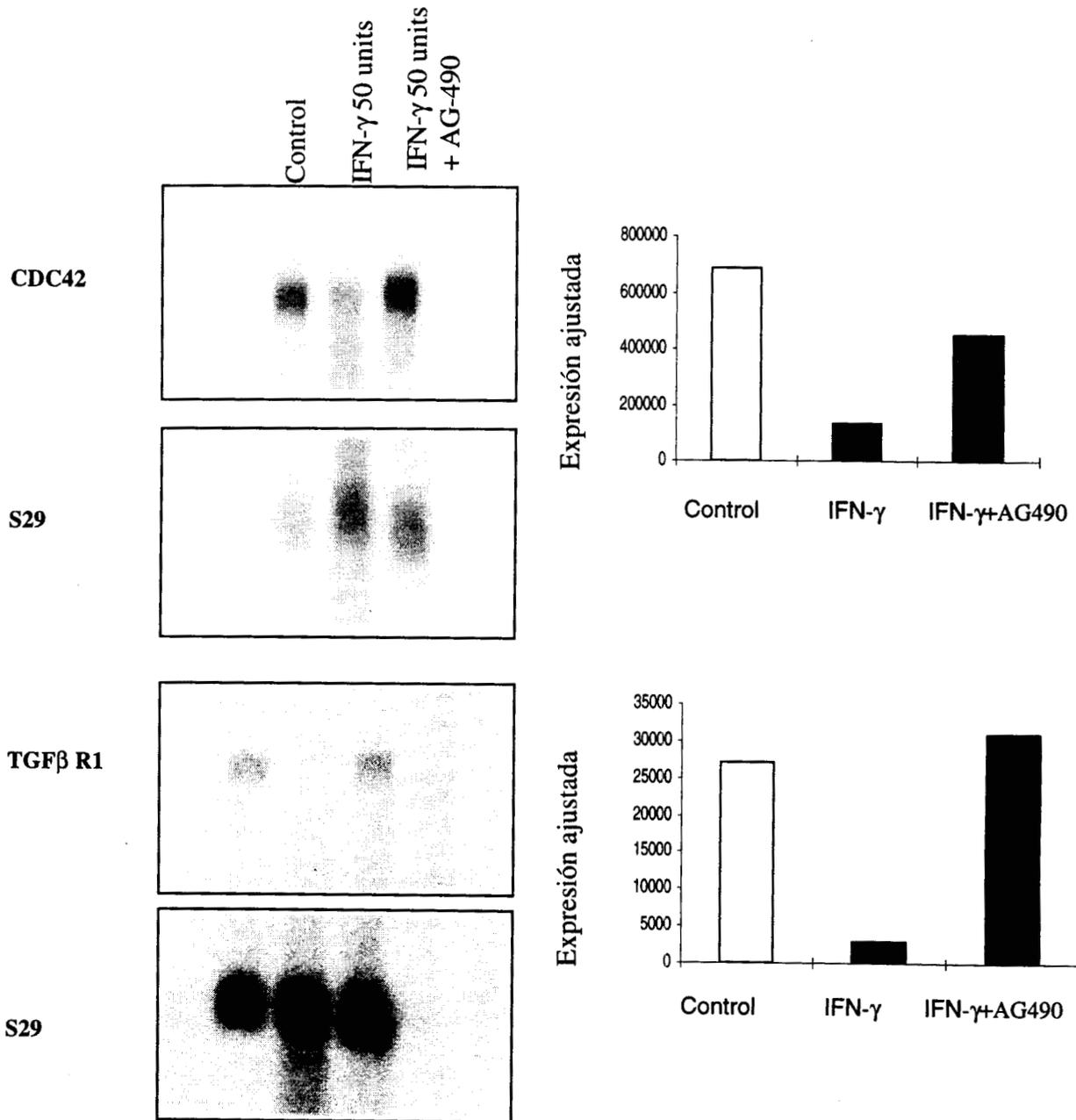


Fig. 11. Como una segunda comprobación de los resultados obtenidos en los microarrays se hicieron transferencias Northern del mRNA obtenido de macrófagos peritoneales de ratón con la dosis alta de 50 unidades de $\text{INF}\gamma/\text{ml}$ usando el bloqueador de la ruta JAK-STAT, AG490. Los resultados obtenidos de los genes regulados a la baja CDC42 y TGFβ R1 con interferón fueron similares a los obtenidos en el microarrays. Los resultados con $\text{INF}\gamma$ y AG490 fueron los esperados por el bloqueo de la ruta de señalización.

5. DISCUSIÓN.

Para determinar los cambios en la expresión de ARNm en macrófagos peritoneales de ratón con diferentes dosis de IFN γ , se hicieron microarreglos con dosis de 3, 10 y 50 unidades de IFN γ /ml, cada uno con su correspondiente control. Para conocer la veracidad de los resultados obtenidos en las membranas de microarreglo, se hicieron transferencias Northern con algunos genes escogidos (7) con las mismas dosis y finalmente se realizaron otras transferencias Northern, con 4 genes, dos regulados a la baja y dos regulados a la alta. Este experimento se realizó solo con la dosis alta y con esta misma dosis y un bloqueador de la ruta JAK- STAT, AG-490, de tal manera que el resultado esperado en el grupo de células con IFN γ más AG-490, tuviera el mismo comportamiento que el control.

Solo se tomaron en cuenta aquellos genes que tuvieron un cambio en la magnitud de expresión de 2 ó más veces a la alta o a la baja con respecto al control, además de usar como punto de comparación los resultados obtenidos en el primer experimento realizado, que fue el de la dosis mayor de 50 unidades de IFN γ / ml. Cabe mencionar en este punto que alrededor de 500 genes contenidos en las membranas de microarreglos, no presentaron cambios al tener contacto con IFN γ .

De los genes que presentaron cambios debido a la presencia de IFN γ , los resultados muestran alrededor del 20% de genes regulados a la alta en las células tratadas con IFN γ y este resultado fue constante en los tres tratamientos. Esta es la primera divergencia en nuestros resultados, porque en otros experimentos se han reportado más genes regulados a la alta que a la baja (Bohem, et al., 1997; Klamp et al., 1997; Der S. et al., 1998).

Nuestros resultados no muestran diferencias en cuanto a los genes que fueron regulados a la alta. Los genes que son preferencialmente inducidos por IFN γ , son integrina alfa 1 (LFA1 α), transductor de señal y activador de la transcripción STAT1, factor1 regulador de IFN (IRF1), agonista de muerte apoptótica (BID), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), homólogo ataxia telangiectasia murino (Atm), proteína inducible por interferón y monoquina inducida por IFN γ . La mayoría de estos genes, solo fueron regulados a la alta en los tratamientos con 50 y 10 unidades de IFN γ /ml y sólo LFA-1 y IRF1, fueron regulados a la alta en los tres tratamientos. Para STAT1 y IRF1, los resultados son esperados, ya que es conocido que STAT1 se encuentra en el citoplasma y cuando es activado por la unión de IFN γ con su receptor, la activación de JAK, la fosforilación y subsecuente división de STAT1, el cual es translocado al núcleo, donde se une a los sitios activados por IFN γ (GAS) en los promotores inducibles por IFN γ para dar lugar a la transcripción primaria de estos genes, uno de los cuales es IRF1 y la misma STAT1, los cuales pueden actuar como factores activadores de transcripción de otros genes activados por IFN γ que poseen en sus promotores elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE) como iNOS, ICE (respuesta secundaria) (Bohem et al., 1997 y Lehtonen, et al., 1997). En cuanto a LFA1, se sabe que los contactos funcionales entre leucocitos y endotelio, juega un importante papel en la biología del sistema inmune y en inflamación. Es bien conocida la regulación a la alta de este gen mediada por IFN γ en células endoteliales (Billiau et al., 1998), lo que si vale la pena tomar en cuenta, es la sensibilidad que tiene este gen a este mediador químico, ya que presentó cambio importante aun con la dosis más baja de IFN γ .

El 80% restante, lo representaron genes regulados a la baja, en este grupo, tuvimos muchas diferencias entre nuestros resultados y otros trabajos reportando estos genes y estas diferencias fueron tan grandes como tener genes regulados a la baja, que en la bibliografía están reportados como regulados a la alta. Nosotros podemos explicar esta divergencia, argumentando que con algunos trabajos no estamos compartiendo la misma especie y en otros que compartimos la especie, no compartimos el mismo tipo celular. Se han reportado diferencias marcadas en la expresión de genes entre tipos celulares distintos en respuesta a la activación

por IFN γ y aún entre el mismo tipo celular, sólo que una población de ella, proviene de cultivo celular como en el caso de la línea celular RAW 264, contra macrófagos peritoneales de la misma especie (Hussain et al., 1999). También se han reportado diferencias en la expresión de genes aun entre dos líneas celulares diferentes, Raw 264 contra WEHI-3, porque esta última línea, aunque es capaz de responder al estímulo por IFN γ promoviendo regulación a la alta de algunos genes, esta respuesta no incluye la respuesta de genes que dependen primariamente de elementos ISRE o GAS, sugiriendo, que los macrófagos pueden utilizar diferentes elementos GAS dependiendo del estado de maduración en el que se encuentre (Lucas et al., 1998). También existen diferencias en cuanto a expresión de genes, dependiendo de la sustancia utilizada para elicitar los macrófagos, específicamente se han detectado algunos cambios en receptores de superficie cuando las células son elicidadas con tioglicolato que aquellas elicidadas con peptona (Zuckerman S., 2001 comunicación personal). Por último, también se han reportado poblaciones diferencialmente distintas de macrófagos, cuando son elicitados con tioglicolato (Pinson et al., 1992). Otro punto de argumentación para estos resultados tan diferentes, es que la dosis de IFN γ usada en nuestros experimentos, fueron muy bajas en comparación a las usadas por los diferentes grupos, donde la dosis más baja es de 100 unidades de IFN γ /ml.

Para explicar nuestros resultados con TGF β , TGF β R1 y MADR2, tenemos que recordar la ruta normal de señalización de TGF β , el primer mediador importante de señalización caracterizado fue "mothers against dpp" (MAD). En vertebrados, algunos homólogos han sido identificado, llamándoseles SMAD. En células no estimuladas, se encuentran estas proteínas principalmente en el citoplasma como complejos homoméricos, cuando son estimulados con TGF β , se induce una asociación pasajera de las proteínas SMAD con los receptores heterodiméricos para TGF β (Macias-Silva et al., 1996). TGF β R1 fosforila el dominio terminal carboxilo de SMAD2 y SMAD3 y su heteromerización con una subunidad común, SMAD4. El complejo activado SMAD2/SMAD3-SMAD4, es translocado al núcleo donde ellos actúan como activadores transcripcionales a través de su interacción con proteínas unidas a ADN. Un miembro de la subfamilia de SMAD, SMAD7 también conocido como anti-SMAD, previene la formación del complejo SMAD2/SMAD4, inhibiendo como consecuencia la acumulación nuclear de SMAD2 y la pérdida de la señal de TGF β hacia el núcleo (Hayashi et al., 1997).

Las citoquinas, que su ruta de señalización es a través de la ruta JAK-STAT, son generalmente antagonistas de TGF β en la regulación de desarrollo hematopoyético y funciones celulares inmunes, como la inflamación (Jun et al., 1995; Hu H. y Zuckerman K., 2001). En nuestros resultados no se encuentran incorporados datos de SMAD7, porque la membrana que se usó, no contiene el cADN que codifica SMAD7, además que se ha registrado su máximo incremento a los 30 min. después de haber administrado IFN γ y se mantuvo presente hasta 8 hr. posteriores (Ulloa et al., 1999). Los ARNs de nuestros macrófagos fueron aislados a las 48 hr. después de haber adicionado IFN γ , de tal manera, que probablemente de haberlos contenido en la membrana, no hubiéramos podido identificar este mensajero.

Se han reportado en otros estudios regulación a la baja del receptor 1 para TGF β en monocitos humanos activados por IFN γ , los autores concluyen, que esta disminución en los receptores puede deberse a un efecto selectivo de este inmunomodulador sobre una población específica de proteínas de membrana y no el resultado de una internalización generalizada de la membrana, de la misma manera se explica la regulación a la baja del receptor C5A y en macrófagos aislados de lesiones inflamatorias de animales tratados con IFN γ (Brandes et al., 1991; Espinoza-Delgado et al., 1994).

Nuestros datos correspondientes al receptor para IFN γ cadena beta (IFN γ R2) concuerdan con observaciones realizadas en linfocitos T auxiliares (TH), en los cuales inicialmente se sugiere la existencia de una regulación muy delicada en la transcripción de la cadena beta del receptor para IFN γ , al encontrar diferencias en la habilidad para responder a IFN γ entre los mismos

linfocitos TH (Gajewski y Fitch, 1988), posteriormente dos grupos de trabajo independientes, demostraron, que esta diferencia en respuesta a IFN γ es debida a una carencia de expresión celular de la cadena beta de su receptor y que esta regulación a la baja era dependiente de la presencia de IFN γ porque los linfocitos TH2, que no producen esta citocina no presentan esta disminución, que presentó la subpoblación de linfocitos TH1, productores de IFN γ (Pernis et al., 1995; Bach et al., 1995). Por estos experimentos se puede deducir, que IFN γ parece regular la expresión de la cadena beta de su propio receptor, sobre ciertos tipos celulares, determinando de esta manera la habilidad de estas células para responder a subsecuentes activaciones por IFN γ (Bach et al., 1997)

CDC42 (G25) es miembro de la familia de proteínas pequeñas G llamadas Rho, la cual regula importantes funciones celulares que incluyen adhesión, polaridad y migración a través de la reorganización del citoesqueleto de actina para formar filopodias (Kjoller y Hall, 1999). En macrófagos, es esencial para polaridad en dirección a un gradiente celular, pero no lo es así para la quimiotaxis y también se ha propuesto que desempeñan un papel importante involucrado en el transporte vesicular (Allen et al., 1998; Kroshewski, 1999). En nuestros resultados podemos ver alternativas interesantes de trabajo alrededor de esta proteína, que es regulada a la baja cuando los macrófagos son activados con IFN γ . Estudios en nuestro laboratorio han comprobado que IFN γ regula a la baja el gen de la enfermedad de Tangier en células espumosas (Panousis y Zuckerman, 2000). Esta enfermedad se caracteriza por tener un raro desorden en las lipoproteínas, (básicamente disminución de lipoproteínas de alta densidad e incremento de colesterol ester en macrófagos de tejidos linfoides). Las células de pacientes que padecen esta enfermedad son un buen modelo para el estudio de la salida de colesterol celular y su envío por medio del transporte reverso hacia el hígado para su eliminación (Grundy S. 1990). En el mismo año se publicó otro artículo, donde células provenientes de pacientes con ésta enfermedad, presentan una baja expresión de CDC42 y los autores sugieren que el transporte vesicular puede estar involucrado en el movimiento intracelular del colesterol y que este movimiento está asociado a su vez con reorganización del citoesqueleto de actina y que por lo tanto CDC42 desempeña un papel importante en este proceso (Hirano et al, 2000).

Nuestros resultados muestran un gran número de proteasas reguladas a la baja, algunas de estas proteasas están involucradas en la presentación de antígeno como la catepsina lisosomal L (Villadangos et al., 1999), o, relacionadas con procesos apoptóticos como Catepsina D (Chen et al., 2000), o con procesos cancerígenos como catepsina B (Li Q. y Bever CT Jr., 1998). Proteasas relacionadas con apoptosis como, caspasa 7 e ICE (Thornberry NA. Y Molineaux SM., 1995; Juan et al., 1997). Proteasas relacionadas con la modulación de defensa antioxidante, también relacionadas con apoptosis como las S-transferasas microsomal y Mu (Briehl et al., 1997). Otras contienen secuencias reguladoras para transcripción como proteasa celular citotóxica (B10) (Fregeau CJ y Bleackley RC., 1991). Otras proteasas participan en funciones relacionadas con matriz extracelular como colagenasa tipo IV, gelatinasa B y metaloproteinasa tipo matriz-membrana. En resumen podemos decir que todas ellas tienen participación de alguna manera en la respuesta inmune.

Comparando los resultados obtenidos en el microarreglos contra los obtenidos en las comprobaciones por transferencia Northern, podemos decir que los microarreglos de cADN permiten monitorear la expresión de cientos de genes simultáneamente y proveen un formato sencillo para su identificación y detectar cambios en su actividad en un solo experimento. A pesar de que esta técnica proporciona una gran cantidad de datos, ellos no brindan una comprensión profunda del problema a resolver, pero dan un primer acercamiento a él en forma general y sobre todo al entendimiento de la red regulatoria de genes, que la técnica tradicional de gen por gen no podría brindar en un solo experimento. Por lo tanto es necesaria la comprobación de algunos resultados por medio de otras técnicas que brinden más exactitud en los resultados. De acuerdo a nuestra experiencia, tuvimos la oportunidad de tener una visión

general del comportamiento de genes activados por IFN γ a dosis muy bajas en macrófagos peritoneales de ratón. Al comprobar algunos resultados con transferencias Northern, con excepción de un gen, los demás mostraron el mismo comportamiento, aunque no la misma magnitud en el cambio comparados con el control. En ningún caso tuvimos un resultado contradictorio, por ejemplo cambios de expresión a la alta, en un gen que el resultado del microarreglos proporcionó como regulado a la baja, o viceversa. Por lo tanto podemos confiar en los resultados como un primer acercamiento al problema, siempre y cuando el cambio manifestado sea igual o mayor de dos veces el valor registrado por el control, valores en el cambio menores a éste, no indican un cambio real.

Esta técnica provee la oportunidad de llevar a cabo perfiles de enfermedades identificando los genes relacionados con ella y/o seleccionar genes que se diferencian entre la salud y el proceso patológico, permitiendo el desarrollo y/o uso de drogas apropiadas y terapias génicas hacia nuevos blancos. (Heller et al., 1997. Brazma A. y Vilo J., 2000).

En nuestros últimos experimentos realizados con el inhibidor de la ruta AG490, que bloquea concretamente JAK 2 (Vos et al., 2000), se esperaba no tener respuesta en los experimentos con este inhibidor.

Para los genes CDC42 y TGF β R1, como se muestra en los resultados, al grupo de células tratadas con IFN γ más el bloqueador, los resultados son similares a los obtenidos por el grupo de células control, como se esperaba, tal parece que IFN γ regula a la baja estos genes por la ruta JAK-STAT. Sin embargo, los resultados obtenidos para los genes que codifican las proteínas activadoras de transcripción STAT1 y IRF1, los cuales no muestran ningún bloqueo en la transducción de señal y activación de la transcripción al usarse el bloqueador de la actividad quinasa JAK2, AG490 (Vos et al., 2000) y los resultados son similares al obtenido en la células activadas sólo con IFN γ (sin la acción de AG490). Estos resultados nos llevan a pensar que IFN γ probablemente tenga otra ruta de transducción de señal aparte de la conocida JAK-STAT. Para activar esta ruta es imprescindible la actividad quinasa de JAK2 para fosforilar el residuo Y₄₄₀ sobre la subunidad α del receptor, ésto con el objetivo de formar un sitio desembarcadero para STAT1. STAT 1, es dividida y ya en esta forma activa puede translocarse al núcleo para inducir la transcripción de genes (Bach et al., 1997. Bohem, et al. 1997). Este hallazgo, nos abre un nuevo camino para estudiar en el futuro.

6. CONCLUSIONES

Podemos concluir que los macrófagos activados con bajas dosis de IFN γ presentan una serie de cambios en la expresión de genes. Dentro de los cambios más importantes se encuentran que la mayoría de los genes que presentaron cambios, este cambio es a la baja, y solo un pequeño porcentaje presentó cambios a la alta. Los genes que codifican IRF1 y LFA1- α , son los indicadores de activación de macrófagos más sensibles, con un incremento en los niveles de ARNm detectados aun en la dosis más baja de 3 unidades de IFN γ /ml.

Dentro del grupo de genes regulados a la baja en macrófagos activados por IFN γ se encuentran un gran número de proteasas que desempeñan diferentes funciones en la respuesta inmune, un grupo de genes involucrados en la ruta de señalización de TGF β , y genes involucrados en la movilización y vesiculación en macrófagos.

En cuanto a la técnica podemos decir que el microarreglos es una herramienta eficaz cuando el objetivo que se persigue es tener un panorama general de un problema, y no datos profundos y exactos.

Para finalizar, tenemos que hacer notar que de todos los resultados obtenidos, tal vez los más importantes, son los relacionados con IRF1 y STAT1, porque nos dejan una respuesta pendiente: Existe otra ruta de señalización independiente a la ruta JAK-STAT en respuesta a la activación de macrófagos por IFN γ ?

7. BIBLIOGRAFÍA

- Pestka S. and Langer J.A. (1987) Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 727- 77.
- Trent J.M., Sharon O. and Lawn R.M. (1982) Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, immune interferon genes by means of *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7809-7813.
- Zoon K., Miller D., Bekisz J., Nedden D., Enterline J., Nguyen N., and Hu R. (1992) Purification and characterization of multiples components of human lymphoblastoid interferon- α . *J. Biol. Chem.* 267: 15210-15216.
- Farrar M. and Schreiber R. (1993) The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu. Rev Immunol.* 11: 571-611.
- Pace J., Russel S., LeBlanc P. and Murasko D. (1985) Comparative effects of various classes of mouse interferon on macrophage activation for tumor cell killing. *J. Immunol.* 134: 977-981.
- Naylor S., Sakaguchi A., Shows T., Law M., Goeddel D. and Gray P. (1983) Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Exp. Med.* 57: 1020-1027.
- Derynck R., Leung D., Gray P. and Goeddel D. (1982) Human interferon γ is encoded by a single class of mRNA. *Nucleic Acid Research* 10: 3605-3615.
- Gray P. and Goeddel D. (1983) Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5842-5846.
- Rinderknecht E., Connor B. and Rodriguez H. (1984). Natural Human interferon γ . Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J. Biol. Chem.* 259: 6790-5797.
- Fountoulakis M., Zulauf M., Lustig A. and Garotta G. (1992) Stoichiometry of interaction between interferon γ and its receptor. *Eur. J. Biochem.* 208: 781-787.
- Kelker H., Yip Y., Anderson P. and Vilcek J. (1983) Effects of glycosidases treatment on the physicochemical properties and biological activity of human Interferon- γ . *J. Biol. Chem.* 258: 8010-8013.
- Mosmann T., Cherwinski H., Bond M., Giedlin M. and Coffman R. (1986) Two types of murine helper T cell clone. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
- Young H. and Hardy K. (1995) Role of interferon- γ in immune cell regulation. *J. Leuk. Biol.* 58: 373-381.
- Spits H., Lanier L. and Phillips J. (1995) Development of human T and natural killer cells. *Blood* 85: 2654-2670
- Handa K., Suzuki R., Matsui H., Shimmizu Y. and Kumagai K. (1983) Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-Induced interferon γ production. *J. Immunol.* 130: 988-992

- Williams JG, Jurkovich GJ, Hahnel GB, and Maier RV. (1993). Interferon- γ : A key immunoregulatory lymphokine. *J. Surgical Research* 54: 79-93
- Billiau a., Heremans H., Vermeire K. and Matthys P. (1998) Immunomodulatory Properties of Interferon- γ . An update. *Ann. N.Y. Acad. Of Sciences* 856: 22-32
- York I. and Rock K. (1996) Antigen processing and presentation by the class 1 Major Histocompatibility Complex. *Annu. Rev. Immunol* 14: 369-396
- Bohem U., Klamp T. y Howard J. (1997) Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev Immunol.* 15: 749-795
- Groettrup M., Soza A., Eggers M., Kuehn L., Dicks T., Schild H., Rammensees H., Koszinowski U and Kloetzel P. (1996) A role for the proteasome regulator PA28 α in antigen presentation. *Nature* 381: 166-168.
- Epperson D., Arnold D., Spies T., Cresswell P., Pober J. and Johnson D. (1992) Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class 1 expression in endothelial cells. *J. Immunol.* 149: 3297-3301
- Snapper C., Peschel C. and Paul W. (1988) IFN γ stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 140: 2121-2127.
- Abed N., Chace J., Fleming A. and Cowdery J. (1994) Interferon γ regulation of Lymphocyte differentiation: Activation of B cells is a prerequisite for IFN- γ mediated inhibition of B cells differentiation. *Cel. Immunol.* 153: 356-366.
- Stark G., Kerr I., Williams B., Silverman R. and Schreiber R. (1998) 67:227-264
- Mond J., Carman J., Sama Ch., Ohara J. and Finkelman F. (1986) Interferon- γ suppresses B cells stimulation factor (BSF-1) induction of class II MHC determinants on B cells. *J. Immunol.* 137: 3534-3537.
- Szabo S., Dighe A., Gubler U. and Murphy K. (1997) Regulation of the interleukin (IL)-2R β 2 subunit expression in developing T helper 1 (TH1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* 185:817-824.
- Gajewski T. and Fitch Frank (1988) Anti-proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocytes clones. *J. Immunol.* 140: 4245-4252
- Liu Y. and Janeway A. (1990) Interferon plays a critical role in induced cell death of effector T cell: A possible third mechanism of self-tolerance. *J. Esp. Med.* 172:1735-1739
- Novelli F., Pierro F., Celle P., Bertini S, Affaticati P., Garotta G. and Forni G. (1994) Environmental signals influencing expression of the IFN- γ receptor on human T cells control whether IFN- γ promotes proliferation or apoptosis. *J. Immunol.* 152: 496-504.
- Naik S., Shibagaki N., Li L., Quinlan K., Paxton L. and Caughman W. (1997) Interferon γ -dependent induction of Human Intercellular Adhesion Molecule-1 gene expression involves activation of a distinct STAT protein complex. *Bioch. Mol. Biol.* 272: 1283-1290

Shiokara m., Koike K. and Nakahata T. (1993) Synergism of Interferon- γ and Stem Cell Factor on development of murine hematopoietic progenitors in serum-free culture. *Blood* 81: 1435-1441

Snoeck H., Bockstaele V., Nys G., Lenjou M., Lardon F., Haenen L., Rodrigus I., Peetermaans M. and Berneman Z. (1994). Interferon- γ selectively inhibits very primitive CD34²⁺ CD38⁻ and not more mature CD34⁺ CD38⁺ human hematopoietic progenitors cells. *J. Exp. Med* 180: 1177-1182

Vermeulen M., David J. and Remold H. (1987) Differential mRNA responses in human macrophages activated by interferon- γ and muramyl dipeptide. *J. Immunol.* 139: 7-9

Buchmeier N. and Schreiber R., (1985). Requirement of endogenous interferon- γ production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7404-7408.

Adams D. and Hamilton T. (1984) The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2:283-318

Glimcher L. and Kara C. (1992) Sequences and factors: A guide to MHC class-II transcription *Ann. Rev. Immunol.* 10:13-49

Kamijo R., Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gerecitano J., Shapiro D., Le J., Koh S., Kimura T., Green S., Mak W., Taniguchi J. and Vilcek J. (1994) Requirement for transcription factor IRF1 in NO Synthase induction in macrophages. *Science* 263: 1612-1615.

MacMicking J., Xie Q. and Nathan C. (1997) Nitric oxide and macrophage function *Ann. Rev. Immunol.* 15:323-350

Albina J. and Reichner J. (1998) Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer and Metastasis Reviews* 17: 39-53

Strunk R., Cole F., Perlmutter D. and Colten H. (1985) γ -Interferon increases expression of class III complement genes C2 and factor B in human monocytes and murine fibroblasts transfected with human factor genes. *J. Biol. Chem.* 260: 15280-15285

Marsters S., Pennica D., Bach E., Schreiber R. and Ashkenazi A. (1995) Interferon- γ signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. USA* 92:5401-5405

Bazan J.F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. USA* 87: 6934-6938.

Bach E., Aguet M. and Schreiber R. (1997) The IFN- γ receptor. A paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 563- 591.

Aguet M. and Dembic Zlatko (1988) Molecular cloning and expression of the human interferon- γ receptor. *Cell.* 55: 273-280.

Hemmi S., Bohnl R., Stark G., Di Marco F. and Aguet M. (1994) A novel member of the interferon receptor family complements functionality of murine interferon γ receptor in human cells. *Cell* 76: 803-810.

Hersey G. and Schreiber. (1989) Biosynthetic analysis of the human interferon- γ receptor. Identification of N-linked glycosylation intermediates. *J. Biochem. Molecular Biol.* 264:11981-11989.

Fischer T., Thoma B., Scheurich P. and Pfizenmaier K. (1990). Glycosylation of the human interferon- γ receptor. *J. Biol. Chem.* 265:1710-1717.

Schindler C. and Darnell J. (1995) Transcriptional responses to polypeptide Ligands: The JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 621-651

Lu B., Ebensperger C., Dembic ZI., Wang Y., Kvatyuk M., Lu T., Coffman R., Pestka S. and Rothman P. (1998) Targeted disruption of the interferon- γ receptor 2 gene result in severe immune defects in mice. *PNAS* 95: 8233-8238.

Leonard W. and O'Shea J. (1998). JAKs and STATs: Biological Implications. *Annu Rev. Immunol.* 16: 293-332.

Darnell J. E. Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.

Leonard W. and Lin J. (2000) Cytokine receptor signaling pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:877-888

Kazuroni I. And Leonard W. (2000). The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology* 37:1-11

Heim Markus (1999) The Jak-STAT pathway: Cytokine signaling from the receptor to the nucleus. *J. Of Receptor & Signal Transduction Research* 19:75-120

Bach E., Szabo S., Dighe A., Ashkenazi A., Aguet M., Murphy K and Schreiber R.. (1995) Ligand-induced autoregulation of IFN- γ receptor β chain expression in T helper cell subsets. *Science* 270:1215- 1218.

Kaplan D., Greenlund A., Tanner J., Shaw A. and Schreiber R. (1996) Identification of an Interferon- γ receptor α chain sequence required for JAK-1 binding. *J. Biol. Chem.* 271:9-12

Krause C., Lunn CH., Izotova L., Mirochnitchenko O., Kotenko S., Lundell D., Narula S., Pestka S. (2000) Signaling by covalent heterodimers of interferon- γ . *J. Biol. Chem.* 275: 22995-23004.

Murakami M , Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T, and Kishimoto T (1991) Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family *PNAS* 88: 11349-11353

Tanner JW., Chen W, Young L., Longmore G., and. Shaw A. (1995) The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK Kinases *J. Biol. Chem.* 270: 6523-6530

- Igarashi K, Garotta G, Ozmen L, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Lamer AC and Finbloom DS (1994) Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor *J. Biol. Chem.* 269:14333-14336
- Kotenko S., Izotova L., Pollack B., Mariano T., Donnelly R., Muthukumaran G., Cook J., Garotta G., Silvennoinen O., Ihle J. and Pestka S. (1995) Interaction between the components of the interferon receptor complex. *J. Biol. Chem.* 270:20915-20921
- Bach EA., Tanner JW., Marsters S., Ashkenazi A., Aguet M., Shaw AS., and Schreiber RD., (1996) Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells. *Mol. Cell. Biol.* 16:3214-3221
- Briscoe J., Rogers NC., Witthuhn BA., Watling D., Harpur AG., Wilks A., Stark GR., Ihle JN. and Kerr IM. (1996). Kinase- negative mutants of JAK1 can sustain interferon -gamma inducible gene expression but not an antiviral state. *J. EMBO* 15:799-809
- David M, Petricoin E III, Benjamin C, Pine R, Weber MJ, Lamer AC. (1995). Requirement of MAP kinase (ERK2) activity in interferon γ - and interferon β -stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 269:1721-23
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82:241-50
- Darnell J. E. Jr. (1998) Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J. of Interferon and Cytokine Research.* 18:549-554.
- Horvai A., Xu L., Korzus E., Brard G., Kalafus D., Mullen TM., Rose D., Rosenfeld M. and Christopher K. (1997) Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1074-1079
- Kim TK and Maniatis T. (1996) Regulation of interferon- γ -activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273: 1717- 1719
- Contursi C., Wang I-M., Gabriele L., Gadina M., O'shea J., Morse H. and Ozato K. (2000) IFN consensus sequence binding protein potentiates STAT1- dependent activation of IFN γ - responsive promoters in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:91-96
- Roy S., Wachira S., Weihua X., Hu J. and Kalvakolanu D. (2000). CCAAT/ enhancer-binding potation- β regulates interferon- induced transcription through a novel element. *J. Biol. Chem.* 275:12626 -12632
- Der S., Zhou A., Williams B. and Silverman R. (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15623-15628
- Lucas D., Lokuta M., McDowell M., Doan J. and Paulnok D. (1998) Analysis of the IFN- γ - signaling pathway in macrophages at different stages of maturation. *J. Immunol.* 160: 4337-4342.

Koenig W. (1999) Atherosclerosis involves more than just lipids: focus on inflammation. *European heart J. Supplement.* 1:T19-126.

Shimizu H, Taniguchi T, Ishikawa Y, Yokoyama M. (1997) Effects of nitric oxide on cholesterol metabolism in macrophages. *Atherosclerosis.* 129: 193-198.

Soares MB., Bonaldo MDF., Jelene P., Su L., Lawton L., and Efstratiadis A. (1994) Construction and characterization of a normalized cDNA library. *PNAS* 91: 9228-9232

Klamp T., Bohem U., Groot M. y Howard J. (1997) A list of genes regulated by Interferon- γ . Supplement to "Cellular responses to interferon- γ Supplement material: *Annu. Rev Immunol.* 15: 749-795

Lehtonen A., Sampsa M. and Julikunen I. (1997) Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *J. Immunol.* 159: 794-803.

Hussain S., Zwilling B. and Lafuse W. (1999) *Mycobacterium avium* infection of mouse macrophages inhibits IFN γ janus kinase-STAT signaling and gene induction by down-regulation of IFN γ receptor. *J. Immunol.* 163: 2041-2048

Pinson D., LeClaire R., Lorsbach R., Parmely M. and Russell S. (1992). Regulation by transforming growth factor- β 1 of expression and function of the receptor for IFN- γ on mouse macrophages. *J. Immunol.* 149:2028-2034.

Macias-Silva M., Abdollah S., Hoodless PA., Pirone R., Attisano L. and Wrana JL. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF β , receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87:1215-1224

Hayashi H. Abdollah S. Qiu Y. Cai J. Xu YY. Grinnell BW. Richardson MA. Topper JN. Gimbrone MA Jr. Wrana JL. And Falb D. (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell.* 89:1165-1173

Jun C., Choi B., Kim S., Lee S., Kim H. and Chung H. (1995) Down Regulation of transforming growth factor β gene expression by antisense oligodeoxynucleotides increase recombinant interferon induced nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Immunology* 85:114-119.

Hu X. and Zuckerman K. (2001) Transforming growth factor: signal transduction pathways, cell cycle mediation, and effects on hematopoiesis. *J. Hematotherapy & Stem Cell Research.* 10:67-74.

Assoian R., Fleurdelys B., Stevenson H., Miller P., Madtes D., Raines E., Ross R. and Sporn M. (1987) Expression and secretion of type- β transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA .* 84:6020-6024

Ulloa L., Doody J. and Massague J. (1999) Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signaling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397:710-713

Pernis A., Gupta S., Gollob K., Garfein E, Coffman R., Schindler Ch. And Rothman P. (1995). Lack interferon- γ receptor β chain and the prevention of interferon- γ signaling in T_H1 cells. *Science* 269: 245- 247.

Brandes M., Wakefield L. y Wahl S. (1991) Modulation of monocyte type I transforming Growth factor- β receptors by inflammatory stimuli. *J. Biol. Chem.* 266: 19697-19703

Espinoza-Delgado I., Bosco M., Musso T., Mood K., Ruscetti F., Longo D. y Varesio L. (1994) Inhibitory cytokine circuits involving transforming growth factor- β , and interleukin-2 in human monocyte activation. *Blood* 83:3332-3338

Kjoller L. and Hall A. (1999) Signaling to rho GTPases. *Experimental Cell Research* 253:166-179

Allen W., Zicha D., Ridley A. and Jones G. (1998) A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J. Cell Biol.* 141:1147-1157

Kroschewski R. and Hall A. Mellman I. (1999) Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nature Cell Biology.* 1:8-13.

Panousis C. and Zuckerman S. (2000) Interferon- γ induces downregulation of Tangier Disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vase Biol.* 20:1565-1571

Grundy S. 1990 Cholesterol and atherosclerosis. Philadelphia Grove Medical Publishing. J.B. Lippincott Company, 1.2 – 1.38

Hirano K., Matsuura F., Tsukamoto K., Zhang Z., Matsuyama A., Takaishi K., Komuro R., Suehiro T., Yamashita S., Takai Y. and Matsuzawa Y. (2000) Decreased expression of a member of the rho GTPase family, Cdc42Hs, in cell from Tangier disease – the small G protein may play a role in cholesterol efflux. *FEBS Letters* 484:275-279

Villadangos J., Bryant R., Deussing J., Driessen Ch., Lennon-Dumenil AM., Riese R., Roth W., Saftig P., Shi GP., Chapman H., Peters Ch. And Ploegh H. (1999) Proteases involved in MHC classII antigen presentation. *Immunol. Rev.* 172:109-120.

Chen SH., Arany I., Apisarnthanarax N., Rajaraman S., Tying SK., Horikoshi T., Brysk H. and Brysk MM. (2000) Response of keratinocytes from normal and psoriatic epidermis to interferon-gamma differs in the expression of zinc-alpha(2)-glycoprotein and cathepsin D. *FASEB J.* 14:565-571.

Li Q. and Bever CT Jr., (1998) Modulation of interferon gamma induced increases in cathepsin B in THP-1 cells by adrenergic agonists and antagonists. *Cell. Biol. International* 22:13-20

Thornberry NA. And Molineaux SM. (1995) Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. *Protein Sci.* 4:3-12

Juan TS., McNiece IK., Argento JM., Jenkins NA., Gilbert DJ., Copeland NG. And Fletcher FA. (1997) Identification and mapping of Casp7, a cysteine protease resembling CPP32 beta, interleukin-1 beta converting enzyme, and CED-3. *Genomics* 15: 86-93

Briehl MM., Baker AF., Siemankowski LM. And Morreale J, (1997) Modulation of antioxidant defenses during apoptosis. *Oncol. Res.* 9:281-285

Fregeau CJ. And Bleackley RC. (1991) Transcription of two cytotoxic cell protease genes in under the control of different regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 19:5583-5590

Heller R., Schena M., Chai A., Shalon D., Bedilion T, Gilmore J., Woolley D. and David R. (1997) Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes sin cDNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:2150- 2155.

Brazma A. and Vilo J. (2000) Gene expression data analysis. *Fed. Europ. Bioch. Soc.(FEBS)* 480:17-24.

De Vos J., Jourdan M., Tarte K., Jamin C. and Klein B. (2000) JAK tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT9 pathway and induces apoptosis in myeloma cells. *British J. of Hematology* 109:823-828.

El jurado designado por el comité de la maestría en Biología
Experimental aprobó la tesis que presentó

Martha Leticia Alfaro León

El 29 de Junio del 2001

Integración del jurado

 Dra. M. Concepción Gutiérrez Ruíz	Presidenta
 Dra. Ana Ma. Rosales Torres	Vocal
 Dra. Marisol López López	Vocal
 M. en C. Marcela Vergara Onofre	Secretaria
