



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS INFECTADOS  
PERSISTENTEMENTE CON EL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO  
SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MACRÓFAGOS NO  
INFECTADOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**LAURA TORRES GONZÁLEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO

**VOCAL:** Profesor: ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA

**SECRETARIO:** Profesor: EVELYN RIVERA TOLEDO

**1er. SUPLENTE:** Profesor: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO

**2° SUPLENTE:** Profesor: GIBRAN PEREZ MONTESINOS

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE VIROLOGÍA, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

**ASESOR DEL TEMA:**

  
DRA. EVELYN RIVERA TOLEDO

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

  
DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA

**SUSTENTANTE:**

  
LAURA TORRES GONZÁLEZ

---

---

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
ABREVIATURAS .....	4
I. INTRODUCCIÓN .....	7
II.GENERALIDADES .....	10
2.1. Virus Sincitial Respiratorio Humano .....	10
2.1.1. Clasificación .....	10
2.1.2. Morfología .....	10
2.1.3. Genoma .....	11
2.1.4. Proteínas virales .....	12
2.1.5. Ciclo de replicación.....	15
2.2. Epidemiología y cuadro clínico .....	16
2.3. Persistencia Viral .....	18
2.3.1. Persistencia del HVSR y las enfermedades respiratorias crónicas .....	19
2.4. Modelos de persistencia por HVSR <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	21
2.4.1. Modelos <i>in vivo</i> .....	21
2.4.2. Modelos <i>in vitro</i> .....	22
2.5. Respuesta Inmune .....	22
2.5.1. Respuesta inmune en la infección por HVSR.....	22
2.5.2. Respuesta inmune en modelos <i>in vitro</i> de persistencia por HVSR .....	24
2.6. Activación de macrófagos .....	24
2.7. Citocinas pro-inflamatorias .....	26
2.7.1. Vía de señalización Jak/STAT .....	27
2.7.2. Interferón de tipo I (INF-I) .....	28
2.7.3. Interleucina 6 (IL-6) .....	33

2.7.4. RANTES/CCL5.....	37
2.7.5. Proteína-10 inducible por interferón gamma (IP-10/ CXCL10) .....	38
2.8. Análisis Transcriptómico .....	40
2.8.1. Microarreglos y sus aplicaciones.....	40
<b>III. ANTECEDENTES .....</b>	<b>44</b>
3.1. Modelo de persistencia del HVSR en macrófagos .....	44
3.2. Expresión de citocinas en la infección persistente de HVSR.....	44
3.3. Síntesis y respuesta de IFN-β en la infección persistente de HVSR .....	45
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>47</b>
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>47</b>
<b>VI. OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
6.1. Objetivo general .....	47
6.2. Objetivos particulares .....	47
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
7.1. Cultivos celulares .....	49
7.1.1. Macrófagos no infectados (MφN) .....	49
7.1.2. Macrófagos infectados persistentemente con el HVSR (MφP) .....	49
7.1.3. Hep-2.....	49
7.1.4. VERO .....	50
7.2. Virus Sincitial Respiratorio Humano (HVSR) .....	50
7.2.1. Propagación de HVSR en células Hep-2.....	50
7.2.2. Titulación viral por el método del TCID <sub>50</sub> .....	50
7.3. Confirmación de la persistencia en cultivos de MφP.....	51
7.3.1. Citometría de flujo .....	51
7.4. Colecta de sobrenadantes de los cultivos de MφP (SN-MφP) y MφN (SN-MφN) .....	52
7.4.1. Tratamiento del SN-MφP con luz ultravioleta (U.V.) .....	52

7.4.2. Titulación del SN-MφP por el método de TCID <sub>50</sub> .....	52
7.5. Cinética de la fosforilación del factor de transcripción STAT1 (p-STAT1) en MφN, por efecto del SN-MφP .....	53
7.5.1. Western Blot .....	53
7.6. Perfil de expresión transcripcional de MφN tratados con el SN-MφP .....	55
7.6.1. Extracción de ARN .....	55
7.6.2. Análisis por microarreglo .....	55
7.6.2.1. Características del microarreglo .....	57
7.6.2.2. Análisis de datos.....	58
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	59
8.1. Confirmación de la persistencia del HVSR en MφP .....	59
8.2. Determinación del título viral del SN-MφP por el método TCID <sub>50</sub> .....	60
8.3. Cinética de la fosforilación del factor de transcripción STAT1 (p-STAT1) en MφN por efecto del SN-MφP .....	61
8.4. Estudio del perfil transcripcional de MφN tratados con el SN-MφP.....	62
8.4.1. Análisis de calidad del ARN.....	62
8.4.2. Perfil transcripcional de MφN tratados con el SN-MφP .....	65
8.4.3. Análisis bioinformático .....	66
8.4.3.1. Clasificación de los genes en categorías funcionales .....	70
8.4.3.2. Genes involucrados en procesos del sistema inmune, apoptosis y ciclo celular.....	74
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	84
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	92
<b>XI. REFERENCIAS</b> .....	93
<b>XII. ANEXOS</b> .....	106
<b>AI. Símbolo y nombre de los genes expresados en el análisis por microarreglo.</b> .....	106

---

---

## ABREVIATURAS

<b>M<math>\phi</math></b>	Macrófago
<b>M<math>\phi</math>N</b>	Macrófagos no infectados
<b>M<math>\phi</math>P</b>	Macrófagos persistentemente infectados con HVSR
<b>SN</b>	Sobrenadante
<b>SN-M<math>\phi</math>P</b>	Sobrenadante de macrófagos persistentemente infectados con HVSR
<b>SN-M<math>\phi</math>N</b>	Sobrenadante de macrófagos no infectados
<b>wtVSR</b>	Wild-type virus sincitial respiratorio (cepa silvestre)
<b>rIFN-<math>\beta</math></b>	Interferón beta recombinante
<b>ISGs</b>	Genes estimulados por interferón
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	Interferón beta
<b>RANTES/CCL5</b>	Regulado, expresado y secretado a la activación de células T normales
<b>JAK</b>	Tirosina cinasa de la familia Janus
<b>TyK</b>	Tirosina cinasa de la familia Janus
<b>STAT</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción
<b>GAGs</b>	Glicosaminoglicanos
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>GS</b>	Señal de transcripción de inicio de un gen (gene start)
<b>GE</b>	Señal de transcripción de término de un gen (gene end)
<b>COPD/EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E

---



---

<b>MIP-1<math>\alpha</math>/ CCL3</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$ proteína
<b>MCP-1 / CCL2</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>RIG-1</b>	Gen-1 inducido por ácido retinóico
<b>PRRs</b>	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>SOCS</b>	Supresor de la señalización de citocinas
<b>cDNA</b>	Cadena complementaria del ADN
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>IATRI</b>	Infecciones agudas del tracto respiratorio inferior
<b>Le</b>	Secuencia líder
<b>Tr</b>	Secuencia tráiler
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>IP10/ CXCL10</b>	proteína -10 inducible de interferón gama
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll
<b>NLR</b>	Receptores tipo NOD
<b>RLR</b>	Receptores tipo RIG-1
<b>ADN</b>	Ácido desoxirubonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>mARN</b>	ARN mensajero
<b>ARNr</b>	ARN ribosomal
<b>ARNt</b>	ARN de transferencia
<b>ARNi</b>	ARN interferente
<b>miARN</b>	MicroARN



---

---

<b>cAMP</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>MAPK</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
<b>PI3K</b>	Inositol trisfosfato cinasa
<b>SOCS</b>	Supresor de señalización de citocinas
<b>PIAS</b>	Protein inhibitor of activated STAT 1
<b>USP18</b>	Proteins and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 18
<b>FKHR</b>	Forkhead transcription factor
<b>AKT</b>	Proteína cinasa B

---

---

## I. INTRODUCCIÓN

El virus sincitial respiratorio humano (HVSR) es un virus envuelto, cuyo genoma consta de una sola cadena de ARN de polaridad negativa. Pertenece al orden de los *Mononegavirales*, a la familia *Paramyxoviridae*, a la subfamilia *Pneumovirinae* y al género *Pneumovirus*.

El virus Sincitial respiratorio humano (HVSR) se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial y es considerado como el principal patógeno de etiología viral causante de infecciones agudas del tracto respiratorio inferior (IATRI) en niños, las cuales son la causa más importante de mortalidad infantil en todo el mundo principalmente en la población correspondiente a niños menores de 5 años de edad (Nair, et al., 2010). En adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos puede ocasionar o exacerbar padecimientos respiratorios (Lee, et al., 2013, Reina et al., 2013). Sin embargo, en adultos jóvenes la infección por HVSR no ocasiona manifestaciones clínicas severas (Lee, et al., 2013).

El HVSR infecta y se replica en las células del epitelio respiratorio superior y posteriormente en vías respiratorias bajas debido a la diseminación de fluidos y al mecanismo de fusión de membranas celulares característico del virus. De esta manera, el epitelio respiratorio participa como la primera línea de defensa contra el HVSR, activando diversos mecanismos de la respuesta inmune innata y promoviendo el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa en conjunto con las células presentadoras de antígeno (Cane, 2007). La infección por HVSR induce cambios en la expresión génica de células epiteliales, macrófagos alveolares (Ravi et al., 2013) y células dendríticas (todas ellas descritas como células blanco del virus) para activar una cascada de potentes inmunomoduladores y mediadores de la inflamación entre los que se encuentran, citocinas, interferón tipo I (IFN-  $\alpha/\beta$ ), factores de crecimiento y otros mediadores de la respuesta inmune, que actúan como una red de señalización compleja entre las células, determinando la eliminación o progresión de la infección (Cane, 2007).

Muchas investigaciones se han centrado en estudiar la respuesta inmune que se produce en respuesta a la infección con el HVSR, ya que se ha demostrado que

---

---

contribuye de manera importante en la gravedad de la enfermedad. Se ha propuesto una relación entre la severidad de la enfermedad por HVSR durante los primeros meses de vida y el posterior desarrollo de enfermedades respiratorias crónicas como asma y COPD (Sikkel, et al., 2008, Pérez-Yarza, et al., 2007, Korppi, et al., 2004, Jafri, et al. 2004), que ha sido sustentada con la probable persistencia del virus y una respuesta inmune inadecuada que estimula un estado de inflamación crónico (Mejías, et al., 2002).

Aunque la persistencia del HVSR en humanos no ha sido comprobada, existen evidencias circunstanciales que lo sugieren (Mills, et al., 1981, Isaia, et al., 1985, Cubie, et al., 1997, Wilkinson, et al., 2006). Para el estudio de los mecanismos y consecuencias de la infección persistente por el HVSR, se han logrado establecer modelos *in vivo* en animales, e *in vitro* en líneas celulares epiteliales y mieloides, de origen humano o animal (Sarmiento, et al., 2002, Mejías, et al., 2008, Martínez, et al., 2009).

Se ha reportado que las infecciones virales de tipo persistente ocasionan alteraciones en la respuesta inmune de la célula hospedera como resultado de la regulación en la expresión génica viral y celular, lo que permite la evasión del sistema inmune a fin de preservar el genoma del virus en la célula sin inducir la muerte celular (Oldstone, 2006).

Los macrófagos (M $\phi$ ) son células del sistema inmune que se caracterizan por tener una plasticidad que les permite responder de manera eficiente a las señales del “microambiente” induciendo un cambio en su fenotipo. En nuestro laboratorio se ha establecido un modelo de células tipo macrófago para estudiar los mecanismos involucrados en la persistencia del HVSR, el cual consiste en una línea celular de macrófagos murinos infectados persistentemente con la cepa Long del virus sincitial respiratorio humano (M $\phi$ P) (Sarmiento, et al., 2002). En este modelo se ha demostrado que el HVSR persistente altera actividades biológicas características del macrófago tales como la fagocitosis (Gaona et al., 2014) la respuesta antiviral inducida frente al IFN-I (Rivera-Toledo, et al., 2015), así como

---

---

la expresión de citocinas y quimiocinas tales como RANTES, IL-6 e IFN- $\beta$  (Guerrero-Plata 2001; Rivera-Toledo et al., 2015).

Por lo tanto, la respuesta inmune celular es alterada por la persistencia del HVSR induciendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias y probablemente de una gran diversidad de moléculas que pueden ser secretadas en el sobrenadante de las células en cultivo (SN-M $\phi$ P), lo que podría generar un “microambiente” con efecto parácrino en células no infectadas. Una observación importante es que el IFN- $\beta$  producido por los M $\phi$ P no tiene efecto autócrino, es decir, los macrófagos infectados persistentemente por el HVSR tienen bloqueada la vía de señalización Jak/STAT, de tal manera que no expresan genes antivirales, permitiendo la persistencia del virus (Rivera-Toledo, et al., 2015). A partir de estos resultados, hemos planteado la hipótesis de que los factores solubles presentes en el SN-M $\phi$ P podrían actuar de manera parácrina sobre macrófagos no infectados (M $\phi$ N), alterando su perfil transcripcional como consecuencia de la activación de vías de señalización relacionadas con la respuesta hacia las citocinas presentes en el sobrenadante.

En este trabajo, se reporta que el SN-M $\phi$ P, activa la señalización a través de la vía JAK/STAT en M $\phi$ N, involucrada en la respuesta a IFN-I (IFN  $\alpha/\beta$ ). Asimismo, mediante un análisis por microarreglo se determinó que el SN-M $\phi$ P altera de manera general el perfil transcripcional de estas células no infectadas.

---

---

## II. GENERALIDADES

### 2.1. Virus Sincitial Respiratorio Humano

#### 2.1.1. Clasificación

De acuerdo con el Comité internacional de Taxonomía de Virus, el virus sincitial respiratorio humano se clasifica como:

<b>Orden</b>	<i>Mononegavirales</i>
<b>Familia</b>	<i>Paramyxoviridae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Pneumovirinae</i>
<b>Género</b>	<i>Pneumovirus</i>
<b>Especie</b>	<b>Virus sincital respiratorio humano</b>

#### 2.1.2. Morfología

El virión consiste de una nucleocápside contenida dentro de una envoltura lipídica que proviene de la membrana plasmática de la célula infectada. Tiene una forma esférica irregular de 100 a 350 nm de diámetro, o una forma filamentosa de 60-100 nm de diámetro con 10 µm de longitud (Collins, et al., 2013).

Presenta proyecciones en la envoltura del virión, correspondientes a tres glucoproteínas de superficie que son la proteína G de anclaje, la proteína F de fusión y la proteína pequeña hidrofóbica SH; las proyecciones tienen de 11 a 20 nm de largo y cada una de ellas está ubicada a intervalos de 6 a 10 nm de distancia de otra, en toda la superficie de la envoltura (Figura 1) (Collins, et al., 2013).

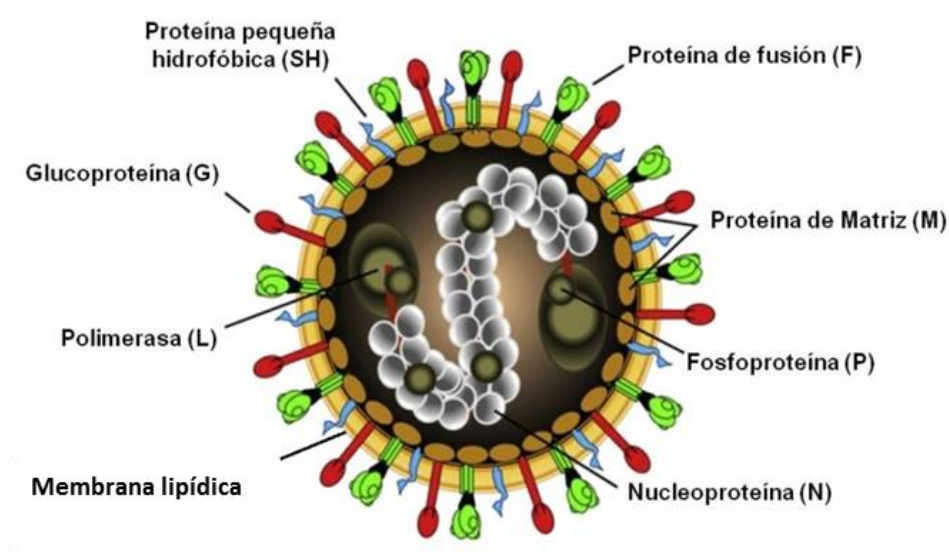
El genoma del virus está constituido por una hebra de ARN no segmentada de polaridad negativa de 15,2 kb, que se encuentra contenida en una nucleocápside helicoidal, formada por varias copias de la nucleoproteína N que envuelven directamente el ARN viral y median su interacción con la fosfoproteína P, la polimerasa L y el factor anti-terminación M2-1, que en conjunto forman el complejo ribonucleoprotéico estrecho resistente a la actividad de las Rnasas, ya que el

---

---

genoma carece de las secuencias CAP y Poli A . La nucleocápside se asocia con la envoltura lipídica mediante la proteína de matriz M, que envuelve el complejo ribonucleoprotéico (Collins, et al., 2013).

En el genoma del virión también se encuentran codificadas las proteínas no estructurales, NS1 y NS2 (Collins, et al., 2013).



**Figura 1. Esquema de la estructura del VSR.** Tomado y modificado de Lay, et al., 2013.

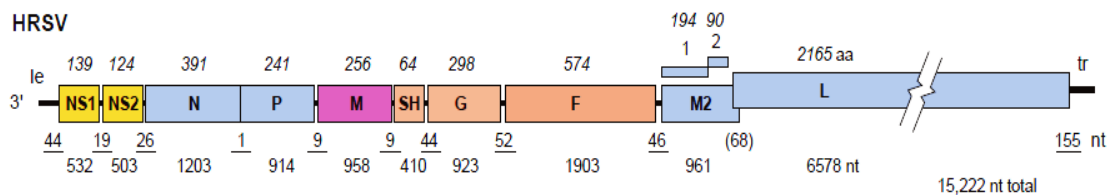
### 2.1.3. Genoma

El genoma del virus sincitial respiratorio humano consta de una cadena sencilla de ARN de polaridad negativa, formada por 15,222 nucleótidos, que carece de las secuencias CAP y Poli A (Collins, et al., 2013).

Contiene 10 genes que codifican para 11 proteínas virales, que ordenados en sentido 3' a 5' son NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L (Figura 2). Cada gen comienza con una secuencia conservada de nueve nucleótidos (GS) y termina con una secuencia conservada de 12 a 13 nucleótidos (GE). El gen que codifica para M2

contiene dos marcos de lectura abierta (ORF) codificando para dos proteínas, la proteína M2-1 y la M2-2 (Collins, et al., 2013).

Los primeros nueve genes se encuentran separados por regiones intergénicas no conservadas que varían de 1 a 52 nucleótidos, sin embargo, los genes M2 y L se encuentran traslapados por 68 nucleótidos, por lo que la secuencia de inicio de L está ubicada dentro de la secuencia de M2 (Figura 2). (Collins, et al., 2013)



**Figura 2.** Mapa del genoma del virus sincitial respiratorio humano cepa A2, en el que se muestra la longitud del genoma de 15,222 nucleótidos; el orden de los genes en el sentido 3' a 5'; los dos marcos de lectura abierta (ORFs) ubicados en M2; el traslape de (68) nucleótidos entre los genes M2 y L; la cantidad de nucleótidos en las regiones intergénicas aparecen subrayados; y la longitud de cada gen se indica en cantidad de aminoácidos (aa) y nucleótidos (nt) . Le se refiere a la secuencia líder y tr a la secuencia tráiler. Tomado y modificado de Collins, et al., 2013.

#### 2.1.4. Proteínas virales

El virión contiene 11 proteínas, clasificadas como estructurales y no estructurales. Dentro de las estructurales están tres glicoproteínas integrales de la membrana, las cuales median la interacción del virus con la célula, éstas son la proteína G, F y SH; las proteínas no glicosiladas M, M2-1 y M2-2 asociadas a la membrana; y las proteínas N, L, P que forman la nucleocápside. Las proteínas NS1 y NS2 son clasificadas como no estructurales (Collins, et al., 2013).

---

---

**Proteína G.** Conocida como proteína de anclaje, se ha reportado que es una proteína de 298 aa. con un peso de 32,588 KDa, que antes de ser expresada en la superficie celular es N- y O- glicosilada aumentando el peso de la proteína a 90 kDa (Satake, et al., 1985). Durante la infección tiene un papel importante en el anclaje del virión a los glicosaminoglicanos presentes en la superficie de las células (GAGs) (Feldman, et al., 1999). Se ha visto que en células Hep- 2 infectadas con cepas de VSR knockout para el gen G, disminuye la replicación viral además de afectar la capacidad de ensamblarse dentro de la célula (Collins, et al., 2013); en el caso de la infección por el virus knockout en ratones fue limitada; sin embargo en células Vero el virus se replicó eficientemente (Teng, et al., 2001).

**Proteína F.** Conocida como proteína de fusión, media la entrada del virus a la célula debido a que induce la fusión entre la envoltura del virus y la membrana plasmática de la célula. Después de la infección, la proteína F se expresa en la célula y puede inducir su fusión con células vecinas para formar sincitios.

La proteína F es sintetizada como una proteína precursora de 574 aa. y 70 kDa que forma trímeros carentes de actividad (F0). La proteína F requiere un mecanismo de modificaciones postraduccionales que consisten en N-glicosilaciones y posteriormente la escisión del precursor F0 por proteasas de tipo furina en el aparato de Golgi. El corte en el residuo 136 de F0 da lugar a dos subunidades F2 (N-terminal) y F1 (C-terminal) de aproximadamente 20 kDa y 50 kDa, unidas a través de un enlace disulfuro, que además permite la liberación del péptido de fusión localizado en la subunidad F1 que consiste en un dominio hidrofóbico, que interactúa directamente con la membrana celular para iniciar la fusión del virus con la célula. (Collins, et al., 1984).

La subunidad F2 por otro lado, se ha asociado con la especificidad de especie del virus (Schlender, et al., 2003).

Recientemente, para la entrada del virus a la célula, se ha propuesto el anclaje de la proteína F a la nucleolina, una proteína presente en la membrana plasmática de



---

---

las células, evento que es seguido de la unión de una molécula co-receptora. La nucleolína es una proteína que normalmente está presente en el núcleo de todas las células y que por mecanismos aún no conocidos puede expresarse en la superficie de las células (Lay, et al., 2013).

**Proteína SH.** Conocida como proteína pequeña hidrofóbica, consta de 64 aa. y tiene un peso de 7,536 Da. Es glicosilada y poliaminoglicosilada, modificando su peso en un intervalo de 13 a 15 kDa y 21 a 60 KDa respectivamente. La función de esta proteína no se conoce completamente pero su incorporación en membranas artificiales ha revelado la formación de poros en la membrana. (Collins, et al., 2013)

**Proteína M.** Es una proteína no glicosilada de 256 aa. que media la interacción de la nucleocápside con la envoltura lipídica (Ghildyal, et al., 2002). Dirige el proceso de ensamblaje de las partículas virales a través de su asociación con las membranas plasmáticas de la célula ya que se ha encontrado que la proteína M se encuentra asociada a balsas lipídicas de la membrana lo que sirve como una plataforma de ensamblaje del virus (Marty, et al., 2003). También se ha encontrado que inhibe la actividad de la transcriptasa viral antes del ensamblaje del virus (Ghildyal, et al., 2002, Rodríguez, et al., 2004).

**Proteínas N, P, L y M2-1.** Son proteínas que conforman la nucleocápside del virus y cumplen funciones durante el proceso de transcripción y replicación. La proteína N es la de mayor abundancia en la nucleocápside, con 391 aa. , que se encarga de encapsidar al genoma y antiogenoma del virus, los cuales funcionan como secuencias templado para la síntesis de ARN (Fearn, et al., 1997). La fosfoproteína P de HVR contiene 241 aa., la cual forma homotetrámeros y es fosforilada en varios residuos de serina por una proteína casein cinasa II celular, lo cual es necesario para su actividad en la transcripción. P interactúa con N, L y M2-1 y funciona como una proteína chaperona para evitar la unión no específica de N con ARN no viral (Curran, et al., 1995), además P es un cofactor muy importante para la polimerasa viral y puede contribuir con cambios conformacionales del templado de ARN para su interacción con la transcriptasa

---

---

viral (Castagné, et al., 2004). La proteína L de 2,165 aa. es la polimerasa dependiente de ARN del virus, con la principal actividad enzimática en la replicación y transcripción del genoma viral. El factor anti-terminación M2-1 es una proteína de 194 aa., que puede ser fosforilada o no y evita que la actividad de la polimerasa termine prematuramente durante la transcripción permitiendo la síntesis completa de los mARN del VSR.

**Proteína M2-2.** Es una proteína constituida por 90 aa., que se ha reportado que inhibe la síntesis de ARN viral cuando la expresión de M2-2 aumenta. (Collins, et al., 2013)

**Proteínas NS1 y NS2.** Constituidas por 139 aa. y 124 aa. respectivamente, se han relacionado la interferencia en la respuesta inmune mediada por IFN tipo I y III ya que se unen o degradan proteínas clave que inducen la respuesta y producción de los interferones.

También están implicadas en la replicación viral ya que la ausencia de estas proteínas inhibe la replicación del virus en la célula. Además también inducen factores anti-apoptóticos como NF-kappa B (NF-kB), AKT, PDK, GSK (Barik, 2013).

### **2.1.5. Ciclo de replicación**

La entrada del virus a la célula comienza con el acoplamiento de la proteína G y F a los GAGs de la membrana plasmática. La proteína F, fusiona la envoltura del virus con la membrana de la célula, para liberar la nucleocápside al citoplasma, en donde ocurre la replicación y transcripción del virus, mediada por las proteínas virales N, P, L y M2. El proceso de transcripción comienza con el reconocimiento de la región promotora en el sitio Le (leader) 3' del ARN del virus (Figura 2) por la polimerasa viral, la cual se desplaza a lo largo del genoma viral en dirección 3'→5', sintetizando mARNs subgenómicos de tipo monocistronico para los 10 genes del HVSR. El genoma viral contiene en su secuencia, regiones intergénicas que sirven como sitios de acoplamiento para la polimerasa, entre el inicio y el término de un gen (Fearn, R. 2002). Las secuencias de inicio y término de los genes

---

---

virales, son conocidos como señales de inicio GS (gene-start) y término GE (gene-end) que determinan el límite de la polimerasa. Después, los mARN virales son poliadenilados y liberados del complejo protéico de transcripción como cadenas de mRNA. El proceso de traducción de los mARNs virales, ocurre en el citoplasma a través los complejos ribosomales de la célula hospedera. La transcripción es un proceso que ocurre rápidamente, ya que los mARNs virales se han detectado desde 4 a 6 h posteriores a la infección (Collins, P. L, 2013). La replicación del genoma viral, es un proceso que se lleva a cabo por la polimerasa del virus, que inicia con la formación una cadena de ARN con sentido 5'-3' (antigenoma) a partir del ARN genómico, el cual sirve como cadena templado para la síntesis de copias nuevas de ARN viral (Bentzen, et al., 2005), se ha reportado que el proceso de replicación viral, es un proceso que comienza cuando aumenta la cantidad de proteína N, la cual encapsida el ARN viral (Fearn, et al., 2002). Posteriormente, el ensamblaje de las proteínas del virus, ocurre a través de plataformas de ensamble o balsas lipídicas conformadas por las proteínas virales M, F, G y SH asociadas a la membrana plasmática de la célula infectada, para después liberar partículas virales por gemación, adquiriendo una envoltura lipídica que proviene de la membrana plasmática de la célula hospedera. La producción de partículas virales ocurre de 10 a 12 horas después de la infección (Collins, et al., 2013).

## **2.2. Epidemiología y cuadro clínico**

El virus sincitial respiratorio humano (HRSR) se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial y puede ocasionar brotes en ciertas estaciones del año. En regiones con clima templado ocurren durante el invierno, mientras que en regiones con clima tropical ocurren durante todo el año (Bloom-Feshbach, et al., 2013).

El HRSR se transmite por aerosoles o por contacto directo con secreciones respiratorias y fómites contaminados. Las vías de entrada del virus son la ocular y la respiratoria, en donde se replica inicialmente en la nasofaringe y posteriormente en vías respiratorias bajas debido a la diseminación de fluidos y al mecanismo de fusión de membranas. El período de incubación del virus es de 2 a 5 días, con

---

---

manifestaciones físicas tempranas que incluyen estornudos, tos, fiebre, malestar general y escurrimiento nasal.

El HVSR es considerado como el principal causante de infecciones agudas del tracto respiratorio inferior (IATRI) en niños. (Wright, et al., 2000), las cuales han sido identificadas como la causa más importante de mortalidad infantil en todo el mundo, principalmente en la población correspondiente a niños menores de 5 años (Nair, et al., 2010). Se ha estimado que del 50 al 69% de los niños han sido infectados por HVSR durante el primer año de vida y más del 90% a los 2 años de edad (Glezen, et al., 1986).

Las complicaciones asociadas a la enfermedad por HVSR son la neumonía y bronquiolitis, que pueden presentarse en la población infantil con altas tasas de mortalidad (Collins, et al., 2007). El 85% de casos de bronquilitis y el 20% de neumonías se han asociado al HVSR (Wright, et al., 2000).

De acuerdo con la Secretaría de Salud de México (Perfil epidemiológico de la Infancia en México 2010), las IATRI son la primera causa de ingreso hospitalario y la décima causa de mortalidad en niños menores de 5 años. La neumonía, que es una de las complicaciones en la infección por HVSR y es considerada como IATRI es la tercera causa de muerte en niños menores de un año. En un estudio realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez se obtuvo que un 74.7% de muestras provenientes de niños que presentaban síntomas de enfermedad respiratoria fueron positivas para el HVSR, muchos de los cuales tenían una enfermedad subyacente y requirieron hospitalización (Rodríguez-Auad, et al., 2012).

Además de causar complicaciones respiratorias en pacientes pediátricos, el HVSR también ocasiona enfermedades respiratorias en adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, en los adultos jóvenes la infección por HVSR no ocasiona padecimientos respiratorios severos (Lee, et al., 2013).

---

---

### 2.3. Persistencia viral

La interacción entre los virus y su célula hospedera, puede llevar al desarrollo de infecciones de tipo agudas o persistentes. Las infecciones agudas se caracterizan por el desarrollo de mecanismos del sistema inmune del hospedero capaces de modular la replicación del virus y conducir a su eliminación, involucrando la muerte de células infectadas, así como daño tisular. En el caso de las infecciones de tipo persistente, a pesar de que el organismo hospedero genera una respuesta en contra del agente infeccioso y los síntomas de la enfermedad desaparecen, el virus permanece por períodos prolongados en las células modificando funciones que nos son vitales para la célula y sin ocasionar la destrucción de las mismas.

Durante las infecciones de tipo persistente el genoma del virus se encuentra presente, sin embargo en algunas ocasiones no es detectable y tampoco existe la producción de partículas virales infecciosas, en ese caso, se clasifican como infecciones latentes, mientras que en las que el genoma del virus es detectable y existe la producción de partículas virales infecciosas se conocen como infecciones de tipo crónico.

Durante las infecciones virales de tipo persistente, ocurren principalmente tres eventos (Oldstone, 2006):

- La evasión de la respuesta inmune, para evitar la eliminación del virus.
- La modificación de la expresión de genes virales y celulares como una estrategia para mantener la replicación o latencia viral sin que ocurra la muerte celular.
- El desarrollo a largo plazo de enfermedades, como consecuencia de la alteración en la homeostasis de la célula, por ejemplo, alteración en la síntesis o degradación de neurotransmisores y hormonas.

Algunos de los virus que pueden ocasionar infecciones persistentes son los virus de ADN como virus del Herpes Simple (HSV) tipo 1 y 2 , Herpes Humano (HHV) 6 y 7, Citomegalovirus (CMV), Eipsten Barr (EBV), Adenovirus (AdV), y virus de ARN como Hepatitis B (HBV) y Virus de Sarampión (MV).

---

---

Una de las estrategias que han desarrollado los virus para mantenerse de forma persistente en la célula hospedera consiste en la alteración de la presentación de antígenos, induciendo la degradación de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o inhibiendo alguno de los pasos involucrados en el proceso de degradación de proteínas y transporte de péptidos desde el RE (retículo endoplásmico) hasta la membrana plasmática en donde ocurre la presentación de antígenos. El CMV es un ejemplo del uso de este mecanismo, ya que codifica para una proteína homóloga a la  $\beta$ -2 microglobulina de la molécula del MHC I capaz de secuestrarla y competir por su unión a las cadenas pesadas (cadenas  $\alpha$ ) de las moléculas del MHC I. Así mismo, codifica para otras proteínas como pp65, UL97, US3, US6, US2 y US11 que impiden la maduración de las moléculas del MHC I (Griffiths, et al., 2015). Los herpesvirus son otro ejemplo de virus que interfieren con el proceso de presentación de antígenos, debido a que éstos codifican para proteínas que interfieren con la actividad de las proteínas TAP que en el caso del herpes simple tipo 1 es la proteína ICP47 (Verweij, et al., 2015). También, estos tienen genes que codifican receptores virales acoplados a proteínas G (vGPCRs) con la capacidad de unirse a varias citocinas e impedir su función.

La infección de células del sistema inmune es otra de las estrategias empleadas por los virus para evadir al sistema inmunológico, ya que como consecuencia genera estados de inmunosupresión o hiperreactividad en el hospedero. Un ejemplo de éste mecanismo es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que infecta a linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Otras infecciones persistentes, como la establecida por HVSR, emplean estrategias como la modificación en el perfil de expresión de citocinas y moléculas anti-apoptóticas (Guerrero-Plata, et al., 2001, Gaona et al., 2014, Nakamura-Lopez, et al., 2015).

### **2.3.1. Persistencia del HVSR y las enfermedades respiratorias crónicas**

La infección por HVSR con frecuencia ocasiona síntomas respiratorios desde moderados hasta severos, que duran de 10 a 14 días y después desaparecen. A

---

---

pesar de que la persistencia del HVSR en humanos no ha sido demostrada, existen evidencias que sugieren que el virus puede establecer una infección crónica. Algunos de los hechos que apoyan esta teoría son la presencia de antígenos virales en biopsias óseas y en células provenientes de pacientes con la enfermedad de Paget (Mills et al., 1981); la detección post mortem del genoma viral en tejido de pulmón de niños sin manifestaciones clínicas aparentes, que murieron durante el verano (Cubie et al., 1997); y el aislamiento continuo del virus durante 5 meses, a partir de la nasofaringe de niños sin manifestaciones clínicas aparentes (Isaia et al., 1985).

Varios estudios han asociado la infección temprana por HRSV al desarrollo de enfermedades respiratorias crónicas como, asma y COPD, aportando evidencias indirectas acerca de las probables consecuencias clínicas de la persistencia (Sigurs, et al., 2010, Wilkinson, et al., 2006).

El asma y COPD son padecimientos que se caracterizan por la obstrucción de la vía respiratoria, que puede ser reversible en asma pero es progresiva e irreversible en COPD (Barnes, 2008). En ambas ocurre un estado de inflamación crónico en el tracto respiratorio, mediado por diferentes células inmunes y citocinas reguladas por el factor de transcripción NFκB, que es activado en células epiteliales y macrófagos en ambos padecimientos. Durante el asma ocurre el reclutamiento y activación de mastocitos que secretan moléculas broncoconstrictoras como histamina y citocinas ligadas a la alergia como IL-4, IL-5 e IL-13. También, en el asma ocurre la activación de eosinófilos, mientras que en COPD los mastocitos no tienen un rol fundamental y principalmente ocurre la activación y reclutamiento de neutrófilos que inducen la liberación GROα e IL-8. (Barnes, 2008). En ambas patologías, se induce el aumento en el número y en la actividad de los macrófagos, con liberación de citocinas y quimioatrayantes. También participan linfocitos T y B, hay cambio de isotipo a IgE, citocinas TH1 (IL-6, IL-8, IP-10, RANTES, IL-8, MCP-1, TNFα), estrés oxidativo y nitroso, que en conjunto, causan constricción de las vías respiratorias, secreción excesiva de mucosidad, sibilancias, daño en el epitelio respiratorio y angiogénesis necesaria

---

---

por el incremento en la masa pulmonar (Barnes, 2008). Por lo tanto, la respuesta inmune es uno de los factores que contribuye en mayor proporción al desarrollo de estos padecimientos crónicos, asociada a la severidad de la enfermedad aguda por HVSR en etapas tempranas de la vida (Mejias, et al., 2002, Sikkell, et al., 2008, Sigurs, et al., 2010). En un estudio se encontró una relación entre la gravedad de la enfermedad por HVSR a edades tempranas y el desarrollo a largo plazo de asma, después de que se analizaron a 47 individuos no mayores de 18 años que a la edad de un año o menos estuvieron hospitalizados debido a una infección por HVSR y en los cuales se encontraron más casos de asma y alergia que en los individuos control (Sigurs, et al., 2010). Por otro lado en un grupo de pacientes con COPD, se encontró el aumento de los niveles de IL-6, IL-8, MPO y una disminución más acelerada de la función pulmonar en aquellos pacientes en los que se detectó el HVSR que aquellos en los que no se detectó (Wilkinson, et al., 2006). Además, otros de los factores de riesgo implicados en estos padecimientos son los ambientales, enfermedades preexistentes, inmunodeficiencias y factores genéticos como polimorfismos en los genes que codifican para las citocinas (Zeng, et al., 2011). El determinar si el HVSR establece persistencia es de relevancia en salud pública, por lo que siguen los proyectos de investigación para contestar esta pregunta. Dado que la obtención de muestras humanas provenientes de tejido respiratorio es complicado, se han propuesto alternativas de estudio que consisten en modelos experimentales de persistencia *in vivo* e *in vitro* en animales y líneas celulares, respectivamente.

#### **2.4. Modelos de persistencia por HVSR *in vivo* e *in vitro***

Los modelos de persistencia establecidos en varios laboratorios han proporcionado información relevante acerca de los mecanismos involucrados en la interacción del virus-célula durante una infección persistente.

##### **2.4.1. Modelos *in vivo***

Se han logrado establecer modelos de persistencia por HVSR en cobayos (Bramley, et al., 1999) y ratones. En el modelo murino, se demostró la presencia



---

---

del genoma viral 6 semanas después de la inoculación y el desarrollo de inflamación crónica e hiperreactividad de las vías respiratorias a largo plazo (Mejías, et al., 2008).

#### **2.4.2. Modelos *in vitro***

Se han empleado diversas líneas celulares de origen epitelial o inmunológico para el establecimiento de modelos de infección persistente. Uno de estos modelos, se obtuvo infectando a la línea celular de origen epitelial Hep-2 (Martínez, et al., 2009). Alrededor del 50% de las células que sobrevivieron a la infección aguda, mantuvieron la expresión de antígenos virales a través de los pases subsecuentes y esas células infectadas persistentemente mostraron disminución en la producción de progenie viral infecciosa. Otros modelos han utilizado macrófagos P388D1 (Sarmiento, et al., 2002), células dendríticas (Hobson, et al., 2008), células de riñón BS-C-1, (P'ringlé, et al., 1978) y linfocitos B (Bangham, et al., 1986).

### **2.5. Respuesta inmune**

#### **2.5.1. Respuesta inmune en la infección por HVSR**

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra patógenos, mediante la cual se intenta eliminar o contener la infección hasta el establecimiento de una respuesta inmune más específica que es la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata se compone por barreras físicas como la piel y mucosas, barreras químicas como pH y moléculas solubles con actividad antimicrobiana, además de una colección de receptores que detectan productos microbianos y promueven la activación de una variedad de cascadas de señalización.

En la infección por HVSR la respuesta inmune innata parece ser determinante en el progreso y la severidad de la enfermedad, ya que dirige el proceso inflamatorio y determina la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa.

El HVSR infecta y se replica inicialmente en las células epiteliales del aparato respiratorio y macrófagos alveolares, que constituyen la primera barrera física de defensa, los cuales a través de los receptores de reconocimiento de patrones

---

---

(PRRs) detectan desde etapas tempranas, la presencia de proteínas virales e inducen una respuesta.

Los PRRs principalmente involucrados en el reconocimiento del HVSR son los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR) y receptores tipo RIG-1 (RLR). La unión del ARN del virus a RIG-1 (gen inducible por ácido retinoico-1) y al TLR3, así como de la proteína de fusión (F) al TLR4, activan la transducción de señales mediadas por cinasas para inducir la traslocación al núcleo de los factores de transcripción IRF3 y NFκB que promueve la traducción de IFN-I y II, así como de citocinas pro-inflamatorias (Cane, 2007), que tienen un papel fundamental en el reclutamiento y activación de los leucocitos.

Muchas investigaciones han demostrado la producción de MIP-1α, MCP-1 y RANTES por la infección del HVSR, en células epiteliales del tracto respiratorio (Olszewska-Pazdrak, et al., 1998). En tanto que en macrófagos alveolares se ha demostrado la expresión de RANTES, IL-6, IL-1β, MIP-1α, MCP-1/CCL2, TNFα, STAT1 fosforilado, ISGs y moléculas pro-apoptóticas (Ravi, et al., 2013), lo que destaca la importancia de los mecanismos efectores de los macrófagos durante la infección.

Varias de estas citocinas se han relacionado con la gravedad de la enfermedad en niños hospitalizados, con elevadas concentraciones de MIP-1 α, RANTES, IL-8, IL-6, IL-10, e infiltrado celular en aspirados nasofaríngeos (Sheeran, et al., 1999, McNamara, et al., 2005, Pérez-Yarza et al., 2007), que se correlacionan con los hallazgos en modelos murinos de infección por HVSR (Jafri, et al., 2004). Algunas de ellas como RANTES, MIP-1 α y MCP-1 se asocian con el grado de hipoxia en niños enfermos y con la obstrucción de la vías respiratorias debido a su capacidad de reclutar eosinófilos y otros mediadores broncoconstrictores (Olszewska-Paz ET AL. 1998).

La respuesta adaptativa a HVSR se caracteriza por una respuesta citotóxica potente mediada por linfocitos TCD8<sup>+</sup> y una población mixta de TCD4<sup>+</sup> TH1 y TH2 (Tripp et al., 2005).

---

---

### **2.5.2. Respuesta inmune en modelos *in vitro* de persistencia por HVSR**

En modelos *in vitro* de persistencia de HVSR se ha mostrado una modificación en la respuesta inmune innata. En células Hep-2 persistentemente infectadas se ha encontrado un aumento en la expresión de citocinas de tipo pro-inflamatorio como MIP-1 $\alpha$ , IP-10, IL-8, IL-6, RANTES e IFN- $\beta$ , así como la alteración en los niveles de expresión de RIG-1, TLR3, c-Jun (involucrada en la vía de señalización de NF $\kappa$ B) (Herranz, et al., 2011), el incremento en los niveles de SOCS1 y la disminución en la fosforilación de STAT1/STAT2 (Zheng, et al., 2015).

En macrófagos murinos infectados de manera persistente por el HVSR, se ha documentado el aumento en la actividad fagocítica mediada por los receptores Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII (Gaona et al., 2014), incremento de mRNA y proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-x y XIAP (Nakamura-Lopez, et al., 2015), además de el incremento en la expresión de las citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (Guerrero-Plata, et al., 2001).

### **2.6. Activación de macrófagos**

Los macrófagos son células ampliamente distribuidas en el organismo de los mamíferos, que participan en el mantenimiento de la homeostasis. De acuerdo a su localización, se diferencian en osteoclastos, macrófagos alveolares, macrófagos de pulmón, microgliales, histiocitos, células de Kupffer, macrófagos de bazo, macrófagos del tracto gastrointestinal y peritoneales. Contribuyen al desarrollo y regeneración de tejidos, la regulación de la respuesta inmune, la generación y resolución de la inflamación. También son células capaces de responder a diversas señales de su entorno modificando su perfil transcripcional, fenotipo y función de acuerdo al contexto de los estímulos, lo que induce un estado de activación en el macrófago (Mosser, et al., 2008).

Los estados de activación han sido ampliamente estudiados y clasificados en dos grandes grupos. Los macrófagos activados clásicamente (M1) son inducidos por la exposición a IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , ligandos de receptores tipo Toll (PAMPs), IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12. Estos macrófagos funcionan como efectores pro-inflamatorios, detonan

---

---

mecanismos para la muerte de patógenos intracelulares, lisis de células tumorales, son productores eficientes de ROS, ON, citocinas IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IP-10, IL-12, IL-12, CCL3, CXL9, cambios fagolisosomales, aumento de CD86 y de la presentación antigénica vía moléculas de MHC (Correa, et al., 2007, Sang, et al., 2015). Los macrófagos activados alternativamente (M2) que se subdividen en tres fenotipos (a, b y c) son inducidos principalmente por IL-4, IL-13, TGF- $\beta$ , complejos inmunes, antagonistas de TLRs, IL-10, glucocorticoides y serotonina. Estos macrófagos antagonizan la respuesta M1, limitan la respuesta inflamatoria, desactivan el estallido respiratorio, regulan de manera positiva la expresión de supresores de señalización de citocinas como SOCS, el receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra), disminuyen proteasas (caspasa 1 y mmp9) que procesan la pro-IL1 $\beta$ , contribuyen a la reparación del tejido, a la remoción de células dañadas, progresión de tumores y alergia (Correa, et al., 2007, Sang, et al., 2015). Sin embargo, la complejidad de los estímulos en un microambiente, en realidad promueve un amplio grupo de fenotipos de activación (Mosser, et al., 2008, Martinez, et al., 2014).

En el contexto de las infecciones virales la producción y respuesta al IFN tipo I es crítica para estimular en las células un estado antiviral y de defensa contra patógenos, promoviendo la expresión de ISGs y regulando otras vías de señalización que pueden fortalecer la respuesta celular de otras citocinas, induciendo un fenotipo M1. Sin embargo, debido a las propiedades multifuncionales del IFN-I, también puede promover un estado M2 a través de STAT3 o STAT6 por la inducción de IL-10 e IL-1Ra (Sang et al., 2015). En la infección por HVSR se ha descrito una polarización M1 y M2 debida a la expresión combinada de citocinas Th1 y Th2 a lo largo de la infección (Tripp et al., 2005). Las infecciones virales pueden generar estados de activación nocivos para el hospedero, como es el caso de las infecciones persistentes (Sang, et al., 2015).

---

---

## 2.7. Citocinas pro-inflamatorias

Las citocinas son polipéptidos solubles de aproximadamente 30 kDa que pueden exhibir una o varias de las siguientes características: pleiotropía (capacidad de actuar sobre diferentes células y generar diferentes efectos), redundancia (varias citocinas pueden tener el mismo efecto), sinergismo (dos o más citocinas pueden potenciar un efecto) y antagonismo (inhibición mutuo de sus efectos). Regulan funciones biológicas como la supervivencia celular, la proliferación, la diferenciación y la respuesta inmunológica, al unirse con alta afinidad a receptores específicos en las células a través de los que desencadenan complejas vías de señalización que activan mensajeros intracelulares para regular la transcripción génica. Así como ocurre con las hormonas del sistema endócrino, su actividad puede ser autócrino y parácrino. Además su función depende de la concentración y el tiempo de estímulo (lañez, 1999).

Las citocinas son mediadores necesarios para conducir la respuesta inflamatoria hacia las regiones de infección y lesión. Es decir, las citocinas conocidas como pro-inflamatorias, entre las que se incluyen IL-1, TNF $\alpha$ , IL-8, IL-12, IL-6 e interferones, fomentan y regulan los procesos inflamatorios. Sin embargo, la producción exagerada de estas puede alterar de manera importante la fisiología celular. En contraparte, las citocinas anti-inflamatorias limitan la respuesta de las anteriores para mantener un equilibrio y evitar los efectos potencialmente perjudiciales de las reacciones inflamatorias exacerbadas, algunas de estas citocinas incluyen a IL-1ra, IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13 (lañez, 1999).

Después de la infección por HVSR se ha reportado en individuos totalmente recuperados de la enfermedad la persistencia de una respuesta de tipo pro-inflamatoria (Bermejo-Martin, et al., 2007), lo que sugiere que puede ser la base del desarrollo de la hiperreactividad de vías respiratorias a largo plazo.

En células persistentemente infectadas con HVSR en modelos *in vitro* existe la producción de IFN- $\beta$ , IL-6, RANTES e IP-10 (Herranz, et al., 2011, Zheng, et al., 2015, Guerrero-Plata, et al., 2001).

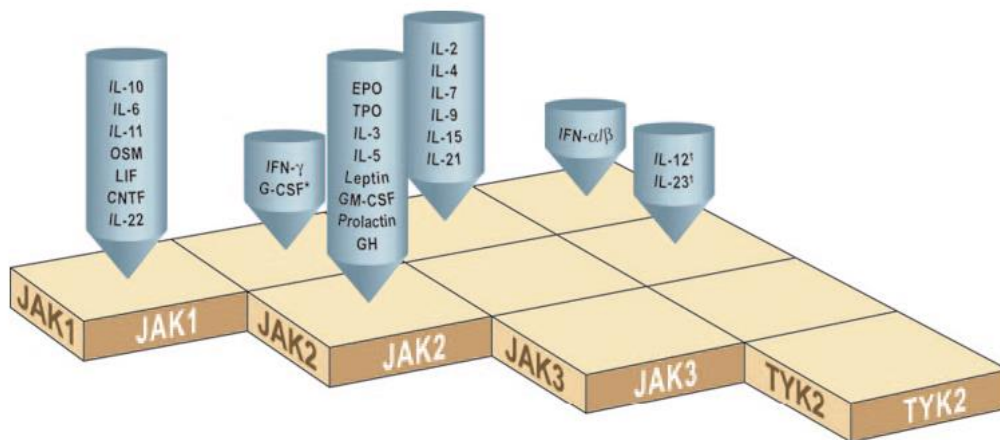
---

---

### 2.7.1. Vía de señalización Jak/STAT

La vía de señalización Jak/STAT, fue descubierta por el estudio de la actividad de interferón, sin embargo ahora se conoce que varias citocinas utilizan esta vía de transducción de señales para ejercer sus funciones biológicas. Estas citocinas incluyen aquellas que se unen a los receptores de clase I y II. Entre las citocinas clase I están las que utilizan la subunidad gp130 o de la familia de IL-6 (IL-6, IL-11, OSM, LIF, CT-1, G-CSF, IL-12, IL-23, leptina, NNT-1, CNTF), aquellas que utilizan la subunidad  $\gamma$ C o de la familia del receptor IL-2 (IL-4, IL-2, IL-15, IL-9) y EPO, GH, PRL, Tpo. Las citocinas clase II o de la familia del interferón incluyen IFN $\alpha/\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-10, IL-20, IL-22 e IL-19 (Valle Mendiola, et al., 2005).

Las proteínas Jak (Tirosina cinasa de la familia Janus) son una clase de proteínas de entre 1100 y 1200 aa. con actividad de cinasa de tirosina, asociadas a los receptores de las citocinas (Figura 3 y Tabla 1), que fosforilan en residuos de tirosina a las cadenas del receptor, creando sitios de unión para los dominios SH2 de los factores de transcripción STAT. Se ha reportado que también algunas STATs pueden ser fosforiladas en respuesta a citocinas acopladas a proteínas G. Las proteínas STATs son factores de transcripción de entre 750 y 800 aa. con un peso molecular entre 90 y 115 kDa, que se encuentran normalmente en el citoplasma de las células. Una vez reclutadas por el receptor fosforilado, las STATs son fosforiladas por Jaks, para después formar homo o hetero dímeros y translocarse al núcleo para estimular la expresión de diversos genes (Valle Mendiola, et al., 2005).



**Figura 3. Esquema de las proteínas Jak activadas por diferentes citocinas.**  
Tomada de Murray, 2007.

Proteína	Familia de receptores
<b>STAT1</b>	IFN- $\alpha/\beta$ , IFN-g, IL-10, IL-6, IL-11, OSM, LIF, CNTF, G-CSF, IL-2, IL-7, GH, PRL, PDGF, EGF, CSF-1, AT1
<b>STAT2</b>	IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha/\beta$ , AT1
<b>STAT3</b>	IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-11, OSM, CNTF, leptina, IL-12, IL-15, IL-2, IL-7, IL-9, GH, G-CSF, EGF, PDGF
<b>STAT4</b>	IL-12
<b>STAT5a/b</b>	IFN-g, IL-10, IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-3, IL-5, GM-CSF, EPO, GH, PRL, G-CSF, leptina
<b>STAT6</b>	IL-4, IL-13, leptina

**Tabla 1. Activación de las proteínas STAT por los diferentes receptores de las citocinas.** Tomada y modificada de Valle Mendiola, et al., 2005.

### 2.7.2. Interferón de tipo I (INF-I)

Los macrófagos son las primeras células productoras de IFN- $\beta$  en respuesta a una infección respiratoria de tipo viral (Collins, et al., 2013).

---

---

Los Interferones (IFNs) constituyen una amplia familia de glicoproteínas secretadas por casi todo tipo de células en respuesta a diferentes estímulos biológicos.

Están agrupados en tres tipos de acuerdo a la secuencia de aminoácidos y a la afinidad que tienen por su receptor. Los interferones tipo I (IFNs I), son un grupo de interferones representado por varios subtipos de IFN- $\alpha$  y un solo tipo de IFN- $\beta$ . Los genes que codifican para interferón tipo I están localizados en el cromosoma 9 en humanos y en el cromosoma 4 en ratones, con 14 genes que codifican para varios subtipos de IFN- $\alpha$  y un gen para IFN- $\beta$  (Capobianchi et al., 2015). Existe una amplia gama de células que tienen la capacidad de montar una respuesta dependiente de interferón tipo I y las células del sistema inmune en particular responden rápidamente a cantidades pequeñas de interferón. Sin embargo las células hematopoyéticas y células dendríticas, especialmente plasmacitoides, son los productores predominantes de IFN-I. Además se han identificado otras especies de IFN tipo I, como IFN- $\omega$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\tau$ , and IFN- $\zeta$  que son producidas por determinado tipo de células y especies (Fensterl, et al., 2009).

El interferón tipo II o IFN- $\gamma$  es codificado por un gen ubicado en el cromosoma 12 de humanos y 10 en ratones, es expresado por células T activadas T(Th1), células T CD8+ y células Natural Killers (NK) ante diferentes estímulos como las citocinas IL-12 y TNF $\alpha$  producidas por los macrófagos. Dentro de sus funciones tiene la capacidad de regular y principalmente inducir la expresión de las ERO. (Capobianchi et al., 2015).

La familia de IFNs tipo III comprende al IFN- $\lambda$  1, 2 y 3 también conocidos como IL-29, IL-28A e IL-28B respectivamente, codificados por genes ubicados en el cromosoma 19 de humanos y 7 en murinos, cuyo efecto se enfoca principalmente a células epiteliales de mucosas que expresan el receptor (Capobianchi et al., 2015).

La síntesis de IFN-I, se induce en células infectadas a través del reconocimiento de ARN de doble cadena (dsARN) o la región 5'-trifosfato-ARN, por receptores tipo



RIG-I, como RIG-I y MDA5 (Tabla2), que activa los factores de transcripción NFκB e IRF3, los cuales al translocarse al núcleo inducen la expresión génica del IFN-β.

Síntesis de IFN α/β		
PRR	Ubicación	Ligando
TLR3	Endosoma	dsARN
TLR7	Endosoma	ssARN
TLR8	Endosoma	ssARN
TLR9	Endosoma	dsARN
TLR4	Superficie celular	Proteínas virales, LPS
RIG-I	Citoplasma	dsARN
MDA-5	Citoplasma	dsARN
DAI	Citoplasma	dsARN

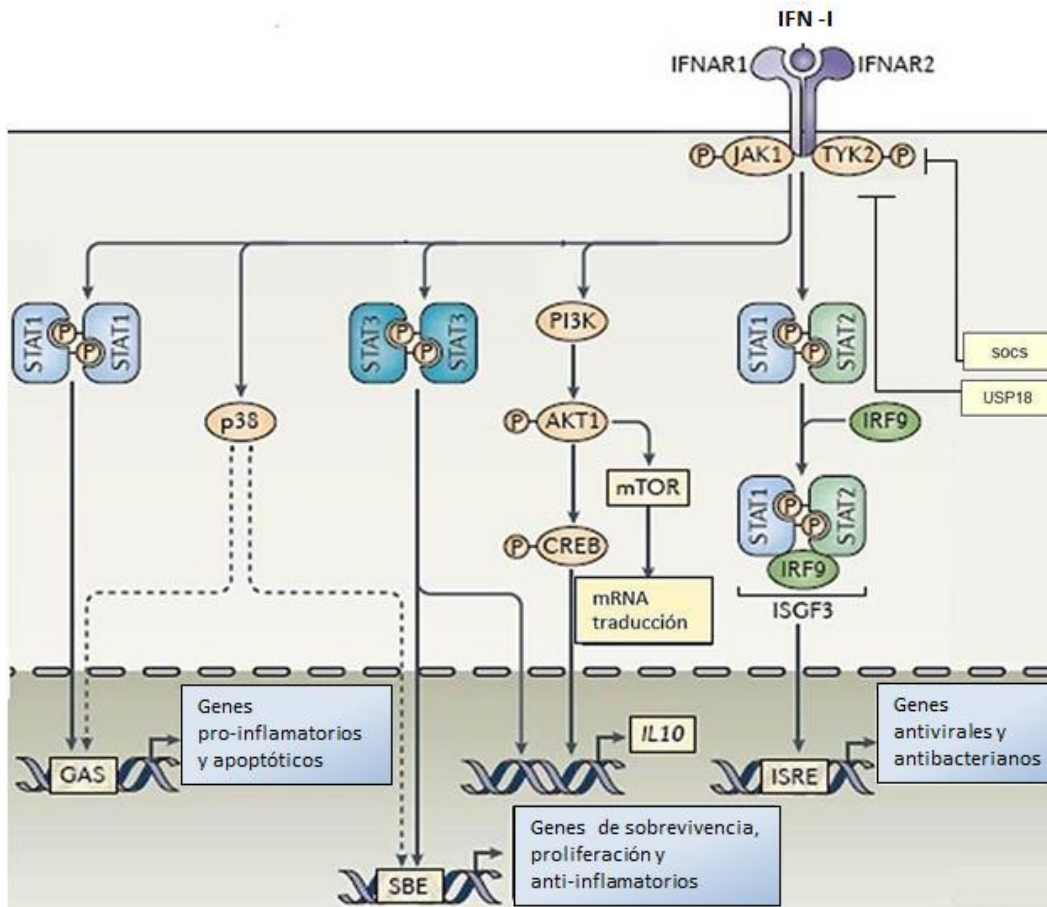
**Tabla 2. Ligandos de los PRRs que inducen la síntesis de IFN-I.** Tomada y modificada de Fensterl, et al., 2009.

Sin embargo, el HVSR en particular es considerado como un pobre inductor de IFN-I ya que se ha documentado que células infectadas de manera aguda por HVSR muestran una baja producción de IFNα/β debida al efecto inhibitorio de las proteínas no estructurales del virus NS1 y NS2 (Spann et al., 2004).

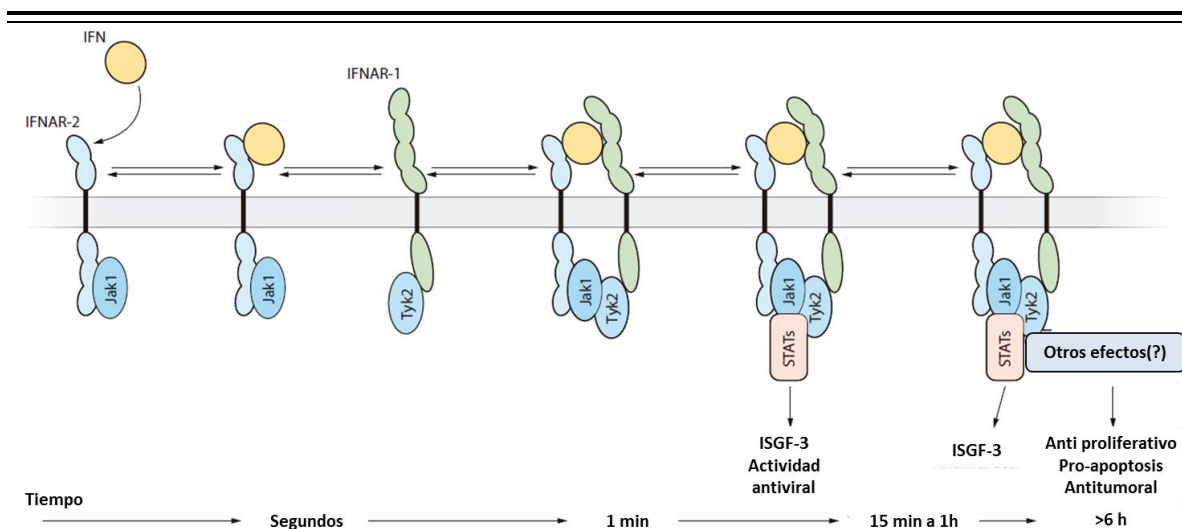
La unión de IFN-I al receptor heterodimérico IFNAR1/IFNR2 asociado a Janus tirosina cinasas TYK2 y JAK1, desencadena la activación de la vía de señalización Jak/STAT. En respuesta al IFN-I, TYK2 y JAK1, fosforilan a STAT1 (91kDa) en la posición Tyr 701 y Ser727, así como STAT2 (113kDa), que se heterodimerizan y se unen con IRF9, para formar un complejo ISGF3 que se transloca al núcleo y se une a secuencias ISRE en el ADN para estimular los ISGs. También, es capaz de activar homodímeros de STAT1 y STAT3, que se acoplan a promotores GAS y SBE respectivamente. Otras moléculas de señalización activadas por IFN-I, son p38 MAPK, MAPK/ERK y PI3K (Figura 4) (González-Navajas, et al., 2012).

La activación de la vía de señalización de Jak /STAT, está controlada por varios mecanismos que la regulan de manera negativa. IFN-I, induce la expresión de las proteínas SOCS1, SOCS3, USP18 que se unen a las cinasas Jak inhibiendo su

función catalítica (Figura 4). Por otro lado, PIAS1 se une a los dímeros de STAT impidiendo su unión a las secuencias de ADN (Ivashkiv, et al., 2014).



**Figura 4. Vías de señalización de IFN-1.** Tomada y modificada de González-Navajas, et al., 2012.



**Figura 5. Esquema de la formación del complejo receptor para IFN-I.** Tomada y modificada de Langer, 2007. En el que el autor propone una línea del tiempo de activación.

Se ha demostrado que la respuesta celular al IFN-I, es importante para amplificar la respuesta pro-inflamatoria en una infección por HVSR, ya que en ratones knockout para IFNAR1 se encontró una considerable disminución en la expresión de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , CCL3/ MIP1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ), IL-5 e IFN- $\beta$  (Goritzka, M. 2014).

Los efectores primarios de la respuesta al IFN, son los genes estimulados por interferón (ISGs). Se han identificado más de 300 ISGs implicados en numerosos procesos fisiológicos como respuesta antiviral, presentación de antígenos, estimulación e inhibición de la fagocitosis, inducción de autofagia, producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, estimulación e inhibición de anticuerpos, regulación del ciclo celular, muerte celular, inhibición de la angiogénesis, supervivencia y diferenciación celular (De Veer, et al., 2001, Capobianchi et al., 2015). Sin embargo las funciones de todos los ISGs aún no se conocen por completo. A continuación se mencionan algunos ISGs, entre los que se encuentran genes con efecto antiviral como las enzimas 2'-5'- Oligoadenilato sintasas (OAS) que activan a la RNasa L para degradar ARN viral y celular lo que los hace eficientes en virus de ARN, genes como Mx2 que son GTPasas los

---

---

cuales bloquean la síntesis de ARN, los ISGs con efecto oxidante como iNOS que cataliza la oxidación de L-arginina para generar ON, genes que codifican para moléculas pro-apoptóticas de la familia de las caspasas, genes involucrados en procesos inflamatorios como MAP3K8, así como aquellos implicados en la presentación de antígenos como PSMB10. Por lo que el efecto de ISGs para contener y eliminar la infección es fundamental (De Veer, et al., 2001).

Un estudio de expresión génica realizado a partir de cepillados epiteliales de vías respiratorias y de muestras de sangre periféricas de pacientes con asma, demostró la sobre-expresión de genes de interferón, así como ISGs en comparación con paciente sanos (Bhakta, et al., 2015). En neutrófilos aislados de pacientes con COPD, también se ha demostrado la sobre-expresión de los ISGs RSAD2 (viperina) y MxA (Da Silva, et al., 2015). Lo que puede sugerir la implicación del IFN y los ISGs en enfermedades que se caracterizan por la hiperreactividad de vías respiratorias. También se ha relacionado con varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias como psoriasis, lupus sistémico eritematoso, artritis, esclerosis múltiple y la enfermedad inflamatoria del intestino (González-Navajas, et al., 2012). Sin embargo los mecanismos por los cuales el IFN actúa en estos padecimientos aún no se comprenden por completo.

Debido a sus efectos pro-apoptóticos, arresto del ciclo celular y de inhibición de la angiogénesis, el IFN-I también se ha empleado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Zitvogel et al., 2015).

### **2.7.3. Interleucina 6 (IL-6)**

Interleucina 6 es una glicoproteína de 184 aa. y 22kDa que es sintetizada por varios tipos de células del sistema inmune (linfocitos B y T, macrófagos, etc.) y no inmunes, en respuesta a la invasión por patógenos y a algunas citocinas como IFN-I, IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . La Interleucina 6 ejerce sus efectos a través de su unión con el receptor para IL-6 (IL-6R), también conocido como gp80, IL-6R $\alpha$  o CD126, que se asocia con un homodímero de la proteína gp130 (CD130), presente en la membrana plasmática de muchas células, formando un complejo IL-6/IL-6R/gp130

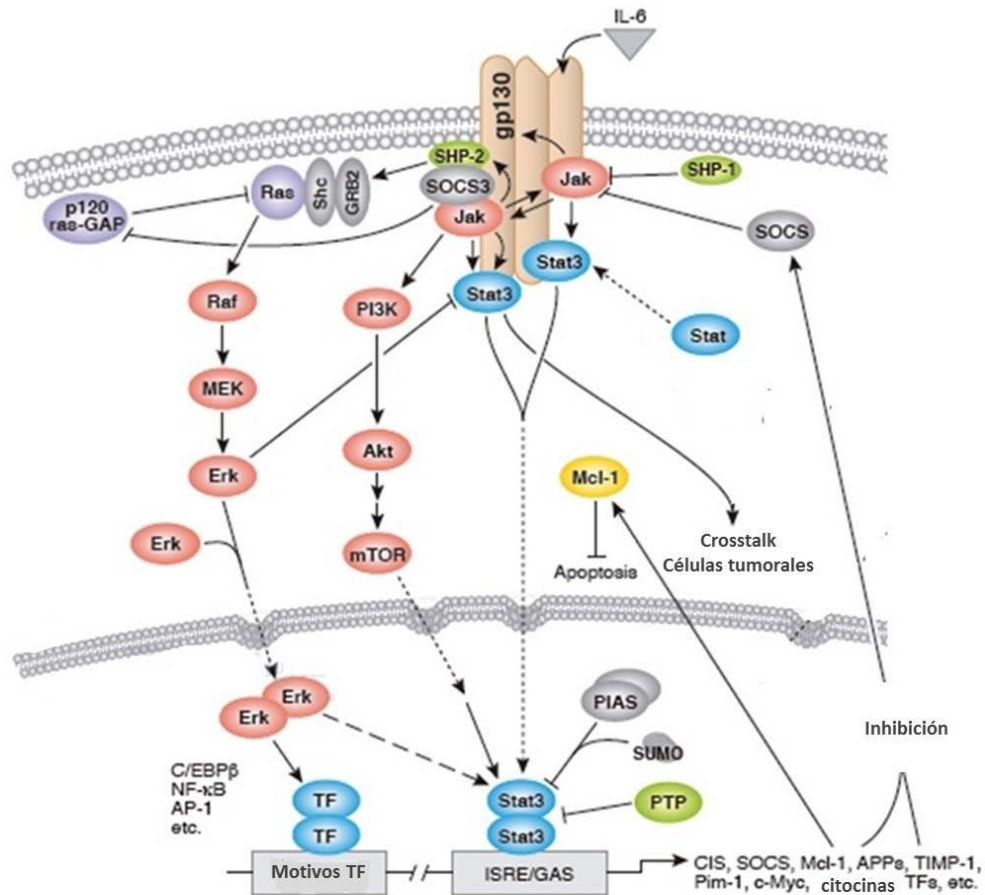
---

---

que activa diferentes cascadas de señalización. También existe la forma soluble del receptor para IL-6 (sIL-6R), a través del cual IL-6 desencadena la transducción de señales en células que no expresan IL-6R, pero que sí expresan la proteína gp130 en la membrana plasmática, formando un complejo de tres proteínas IL-6/sIL-6R/gp130 que inicia la señalización celular, a este mecanismo se le conoce como transeñalización (Mihara, et al., 2012).

El complejo proteico IL-6/IL-6R o sIL-6R/gp130 es activado por las cinasas Jak que fosforilan del dominio citoplasmático de gp130 en residuos tirosina (Tyr 759) y desencadena las vías de señalización ERK/MAPK y PI3K/AKT. Por otro lado la proteína gp130 fosforilada también activa la vía Jak/STAT reclutando el factor de transcripción STAT3, que una vez fosforilado por Jak forma homodímeros de STAT3 o heterodímeros con STAT1 lo que conduce a la expresión de una amplia gama de genes con múltiples funciones biológicas (Figura 6) (Haan, et al., 2005).

La actividad de IL-6 es modulada de manera negativa principalmente por SOCS3, pero también por SOCS1, que se asocian a gp130 y a Jak inhibiendo su actividad enzimática. Otros reguladores negativos, son la fosfatasa SHP-1, la proteína PIAS, SUMO y la fosfatasa PTP que inhiben a STAT (Figura 6) (Hodge, et al., 2005).



**Figura 6. Vías de señalización de IL-6.** Tomada y modificada de Ludwig, 2012 Jak/Stat Signaling Pathway Recuperado el 3 de junio del 2015, de <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-il6>.

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria secretada desde el inicio del proceso de inflamación, por lo que es importante durante la respuesta inmune del hospedero, modula el crecimiento, producción de proteínas de fase aguda y bloqueo de la apoptosis, además promueve la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M1. La producción de IL-6 se ha observado como consecuencia de la infección por patógenos y también está asociada con trastornos inflamatorios (Mihara, et al., 2012, Correa, et al., 2007).

Algunos de los genes regulados por efecto de IL-6 a través de STAT3 son mediadores de la inflamación como IL-6, IL-1β y COX2, genes que codifican para

---

---

proteínas de choque térmico como Hsp70, anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, survivin y c-Myc, genes de proliferación como el proto-oncogén c-Myc implicado en la progresión del ciclo celular especialmente en la transición de la fase G1 a S, Cdc25A, varias ciclinas como D1, D2, D3 y A, los proto-oncogenes Pim-1 y Pim-2 y el arresto del ciclo celular por p19 y p21, que mantienen una actividad conjunta para regular los efectos biológicos de IL-6 (Hirano, et al., 2000, Bromberg, et al., 2009). También, ejerce su actividad a través de la activación de AKT mediada por PI3K en respuesta a IL-6, que tiene como sustrato de los factores FKHR y Bad (antagonista de Bcl-2, Bcl-XL) para inhibir sus efectos proapoptóticos, inhibe p53, regula el crecimiento al inducir Mcl-1, participa en la defensa contra patógenos estimulando la actividad de NFκB e iNOS y también aumenta la síntesis de proteínas y el crecimiento celular a través de mTOR. (Hodge, et al., 2005). Por otro lado, la activación de Ras conduce a la transducción de señales mediada por MAPKs, que estimulan esencialmente la proliferación celular, por ejemplo a través de las ciclinas (Hodge, et al., 2005).

Los efectos de IL-6 se han asociado con enfermedades inflamatorias crónicas, autoinmunes y transformación maligna de las células que conduce al desarrollo de cáncer, probablemente por una mala regulación de sus actividades, en las que IL-6 contribuye a través de la promoción de la inflamación e inhibición de la apoptosis. En asma y COPD, se ha documentado la presencia de niveles elevados de IL-6, en suero, esputo y lavados bronquioalveolares de pacientes con estas enfermedades, además se ha sugerido que IL-6 no solo sea un subproducto de la inflamación, sino que participe en la patogénesis de estas enfermedades promoviendo la diferenciación a células TCD4<sup>+</sup> hacia un perfil TH2, que secreten IL-4 (Rincon, et al., 2012). En macrófagos se ha reportado que IL-6 promueve de manera indirecta la activación alternativa (M2) de las células debido a que induce la expresión del receptor de IL-4 (Mauer, et al., 2014).

---

---

#### 2.7.4. RANTES/CCL5

RANTES es una proteína de 68 aa. y 8 kDa que es secretada por muchos tipos de células como linfocitos T activados, macrófagos, plaquetas y células endoteliales. Ejerce sus funciones a través de su unión a receptores de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G (CCR1, CCR3, CCR5), así como receptores para glicosaminoglicanos (GAGs). Los GPCRs activan las proteínas Gas, Gai, Gαq y Gβγ, las cuales regulan vías de señalización a través de segundos mensajeros, entre los que se encuentran AMP cíclico y Ca<sup>2+</sup> intracelular (Appay et al., 2001). Los receptores para GAGs, también activan ERK dependiente de PKC (Maillard et al., 2014).

Por sus actividades biológicas RANTES es muy importante durante las respuestas inflamatorias, así como en la respuesta a infecciones virales. Funciona como quimioatrayente de una gran cantidad de células efectoras al sitio de inflamación, entre las que destacan macrófagos alveolares (O'Brien, et al., 1998), eosinófilos (Olszewska-Paz, et al., 1998) y basófilos. También, induce el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, en monocitos, eosinófilos, basófilos, así como la producción de histamina y leucotrienos en basófilos (Bischoff et al., 1993).

En monocitos, se ha demostrado que induce la expresión de genes que codifican para citocinas como MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, IL-8 (con funciones quimioatrayentes), receptores de membrana como CCR1, C5a, moléculas de la vía de señalización de las MAPK, la metaploproteinasa mmp9 que promueve la angiogénesis, así como proteínas que regulan la expresión de genes como las proteínas de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB) (Locati, et al., 2002).

En pacientes infectados con HVSR que además tienen asma o COPD, se ha documentado la presencia de RANTES en secreciones respiratorias (Sheeran, et al., 1999, McNamara, et al., 2005, Pérez-Yarza et al., 2007). También se ha reportado la presencia de RANTES en modelos *in vitro* e *in vivo* de infección con HVSR, tal es el caso de células epiteliales y macrófagos infectados con HVSR de



---

---

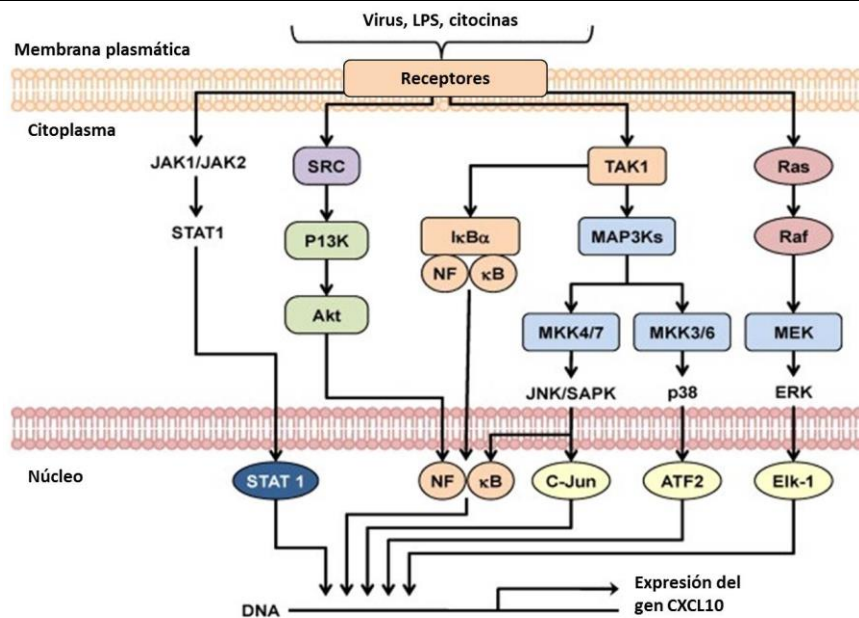
manera aguda y persistente (Herranz, et al., 2011, Zheng, et al., 2015), así como de ratones infectados con el virus y que posteriormente desarrollaron hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) (Jafri, et al., 2004). La importancia de la participación del RANTES en la AHR se ha reportado por la disminución de AHR después de la administración de anticuerpos neutralizantes contra CCL5 (Tekkanat, et al. 2002).

El incremento en la expresión de RANTES ha sido asociado con múltiples desordenes inflamatorios como arterioesclerosis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatitis atópica, inflamación de las vías respiratorias como asma, reacciones de hipersensibilidad, glomerulonefritis, endometriosis, enfermedades neurológicas como Alzheimer y la promoción de tumores. Su contribución al desarrollo de estos padecimientos se ha atribuido a su capacidad de reclutar una gran cantidad de células, así como a sus funciones pro-angiogénicas (Appay et al., 2001).

#### **2.7.5. Proteína-10 inducible por interferón gamma (IP-10/ CXCL10)**

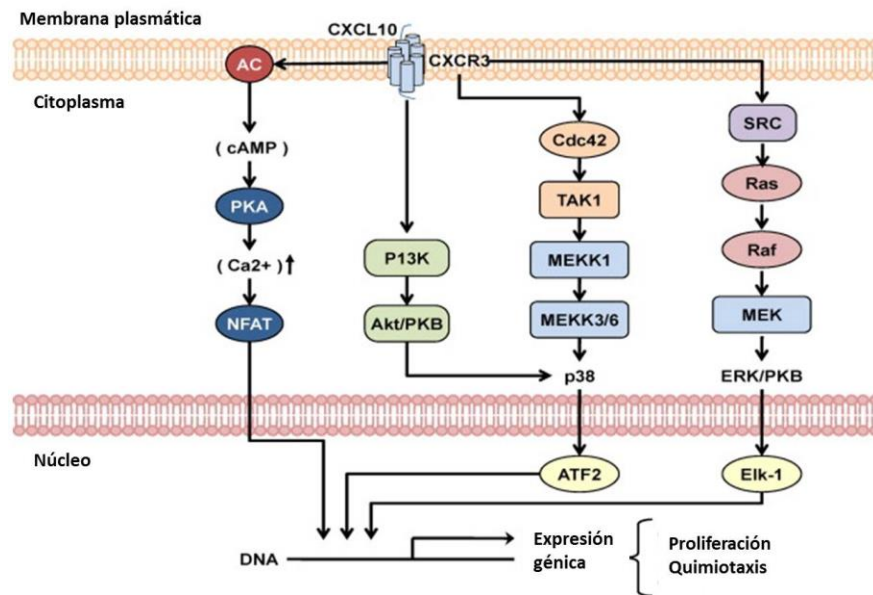
Es una proteína de 98 aa. y 10 kDa. La síntesis de IP-10 se induce en muchos tipos de células incluyendo macrófagos y células epiteliales de pulmón en respuesta a estímulos principalmente TH1, IFN $\gamma$ , IFN-I, infecciones virales, LPS, y citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12), a través de diferentes vías de señalización como Jak/STAT, PI3K/Akt, MAPK y NF $\kappa$ B (Figura 7) (Liu, et al., 2011).

IP-10 tiene funciones muy importantes para regular la respuesta inmune ante las infecciones contra patógenos, por lo que se produce desde etapas tempranas de la infección y promueve un fenotipo M1 en los macrófagos. Durante las infecciones virales, como la infección por HVSR se ha reportado el incremento de la expresión de IP-10 (Miller, et al., 2004, Herranz, et al., 2011, Zheng, et al., 2015).



**Figura 7. Síntesis de IP-10/ CXCL10.** Tomada y modificada de Liu, et al., 2011.

IP-10 ejerce sus funciones mediante la unión al GPCRs CXCR3 (Figura 8), con efectos que incluyen quimiotaxis, flujo intracelular de  $Ca^{2+}$ , proliferación celular y síntesis de ADN, a través de las vías de señalización PKA, MAPK y PI3K. También promueve la adhesión celular en linfocitos T a través de ICAM-I y VCAM-I, induce apoptosis por la vía de las caspasas y tiene potentes efectos angiostáticos que inhiben la tumorigénesis. Además, el receptor para IP-10, se ha visto expresado en la superficie de células del epitelio bronquial en la fase S y G2/M (Liu, et al., 2011). Las modificaciones en los niveles de expresión de esta citocina se han asociado con desórdenes inflamatorios, infecciones y el desarrollo de tumores, por ejemplo la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), que se caracteriza por bajos niveles de IP-10, mientras que los niveles elevados de esta citocina y su receptor, se relacionan con daños a tejidos, enfermedades autoinmunes, diabetes tipo I en la que predomina una condición pro-inflamatoria, fibrosis quística, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y COPD (Liu, et al., 2011).



**Figura 8. Vías de señalización de IP-10/ CXCL10.** Tomada y modificada de Liu, et al., 2011.

## 2.8. Análisis Transcriptómico

### 2.8.1. Microarreglos y sus aplicaciones

Un gen se define como la unidad funcional del ADN. La expresión génica es el proceso mediante el que la información contenida en el ADN es usada para dirigir la síntesis de un producto génico. El proceso de expresión génica de acuerdo con el dogma central de la biología molecular (Figura 9), incluye las fases de replicación, transcripción y traducción. La replicación consiste en la síntesis de una hebra de ADN a partir de una hebra molde. Este proceso es semiconservativo, ya que las hélices de ADN están conformadas por la hebra original o molde y por la hebra de nueva síntesis. Es un proceso secuencial, que se lleva a cabo por la acción de la ADN polimerasa, que comienza en sitios de ADN denominados origen de replicación y se lleva a cabo en dirección 5' → 3', por lo que la hebra 3'-5' se sintetiza en continuo y la hebra 5'-3' se sintetiza por fragmentos (fragmentos de Okasaki) (Luque, et al., 2001).

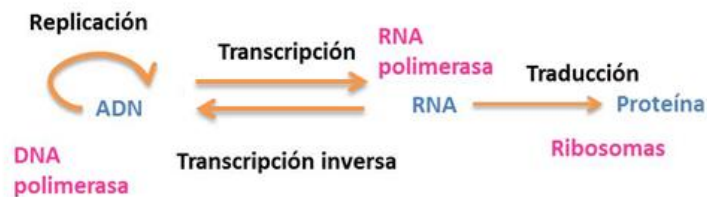
La transcripción es la síntesis de una molécula de ARN a partir de la información genética en la región codificante de ADN. A diferencia del ADN, el ARN es

---

---

sintetizado con nucleótidos de uracilo en lugar de timina. Este proceso se lleva a cabo por la ARN polimerasa dependiente de ADN, también conocida como transcriptasa, en el sentido 5'→3' después de la unión de la transcriptasa a un sitio promotor de un gen en el ADN. El ARN sintetizado es un pre-mARN (se transcriben tanto intrones como exones), que madura en el núcleo a mRNA (Luque, et al., 2001).

La traducción consiste en la síntesis de proteínas a partir de moléculas de mRNA, en el que intervienen principalmente ARN de transferencia, ribosomas, factores de inicio elongación y terminación de la síntesis. Consiste en la unión de aminoácidos para formar una proteína, de acuerdo a la información de nucleótidos contenida en el mRNA (Luque, et al., 2001).



**Figura 9. Dogma central de la biología molecular.**

En la práctica, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante las nuevas técnicas de la transcriptómica.

La transcriptómica, es el estudio de los transcritos, es decir moléculas de ARN de diferentes tipos como ARNm, ARNr, ARNt, ARNi, miARN, presentes en el genoma de un organismo. Los avances en el campo de la transcriptómica han llevado a mejorar las tecnologías con el objetivo de lograr métodos cada vez más completos que permitan estudiar la mayor proporción del genoma de un organismo de manera simultánea.

---

---

A finales de los 80's, surgió la tecnología basada en microarreglos, también conocidos como arrays, microarrays o biochips, que dio la posibilidad de analizar simultáneamente miles de genes. Actualmente, este método es el más utilizado para realizar análisis de expresión génica, análisis de polimorfismos SNP, splicing alternativo, toxicología de fármacos, farmacogenómica, seguimiento terapéutico y diagnóstico molecular (Jiménez, et al., 2002).

Existen diferentes tipos de microarreglos, como microarreglos de proteínas y microarreglos de ADN. Los arreglos de proteínas, permiten el estudio simultáneo de miles de proteínas y son generados mediante la inmovilización en bases sólidas de lisados celulares, tejidos, muestras de suero, anticuerpos o proteínas recombinantes.

Un microarreglo de ADN consiste en una gran cantidad de fragmentos de ADN ordenados y fijados sobre un sustrato sólido. Estos fragmentos pueden ser oligonucleótidos (20-25 pb), cDNA (>100pb) o productos de PCR (200 a 500 pb). La técnica de análisis, se basa en un proceso de hibridación de secuencias complementarias, entre los ácidos nucleicos de la muestra y las sondas contenidas en el microarreglo, que puede ser detectado por la intensidad de señal, ya que se emplean métodos químicos enzimáticos y radioactivos para el marcaje de muestras (Jiménez, et al., 2002). Generalmente se utiliza un microarreglo propio de cada especie a estudiar, sin embargo, como alternativa, también existe una técnica basada en microarreglos heterólogos que consisten en el uso de arrays de una especie estrechamente relacionada a la que se desea investigar, éstos son de especial interés en estudios de comparación evolutiva, sin embargo, pueden presentar con frecuencia errores técnicos

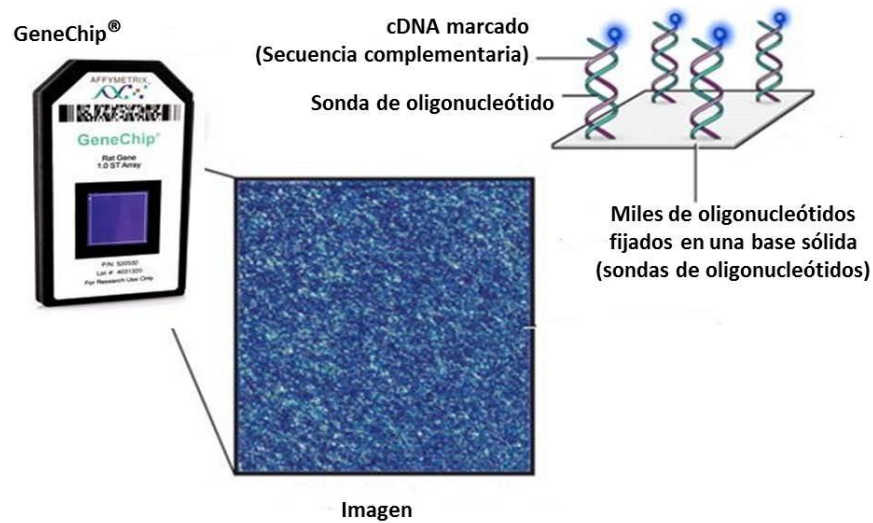
En la actualidad, los microarreglos de ADN más utilizados son los de Affimetrix (Jiménez, et al., 2002) que proveen arrays de alta y mediana densidad. Un tipo array de alta densidad utilizado para el análisis de la expresión génica en un organismo, son los conocidos Genechips de Affimetrix (Figura 10), diseñados a través de un proceso de fotolitografía que consiste en la síntesis de fragmentos de oligonucleótidos sobre la base del chip (síntesis in situ) a través de un haz de luz

---

---

que dirige la unión de los nucleótidos. Esta técnica permite obtener arreglos de alta densidad de integración de sondas (fragmentos de ADN) al soporte, por lo que ofrecen mayor cobertura del genoma de interés. Los transcritos que se analizan por estos arrays se encuentran referidos en el Genbank (Jiménez, et al., 2002).

Para el análisis e interpretación de los datos, existen muchas herramientas útiles disponibles en línea que consisten en bases de datos de genes contenidos en diversos organismos, a los que son referidos para elaborar diferentes clusterings, que proporcionan información acerca sus funciones.



**Figura 10. Ilustración del GeneChip® de Affymetrix.**

---

---

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1. Modelo de persistencia del HVSR en macrófagos

Los macrófagos son células importantes de la respuesta inmune, que participan durante la invasión por patógenos. En nuestro laboratorio se estableció un modelo *in vitro* de persistencia del HVSR, que consiste en una línea celular de macrófagos murinos P388D1 infectados persistentemente con el HVSR de la cepa Long (ATCC, VR-26). En este modelo, los cultivos persistentes muestran más del 90% de células que expresan los antígenos virales y la producción de bajas cantidades de virus infeccioso en el sobrenadante ( $1-3 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL) (Sarmiento, et al., 2002). En este cultivo persistente se ha estudiado el efecto del virus sobre la expresión de citocinas, la respuesta a Interferón, presentación de antígenos, apoptosis y otros procesos biológicos.

#### 3.2. Expresión de citocinas en la infección persistente de HVSR

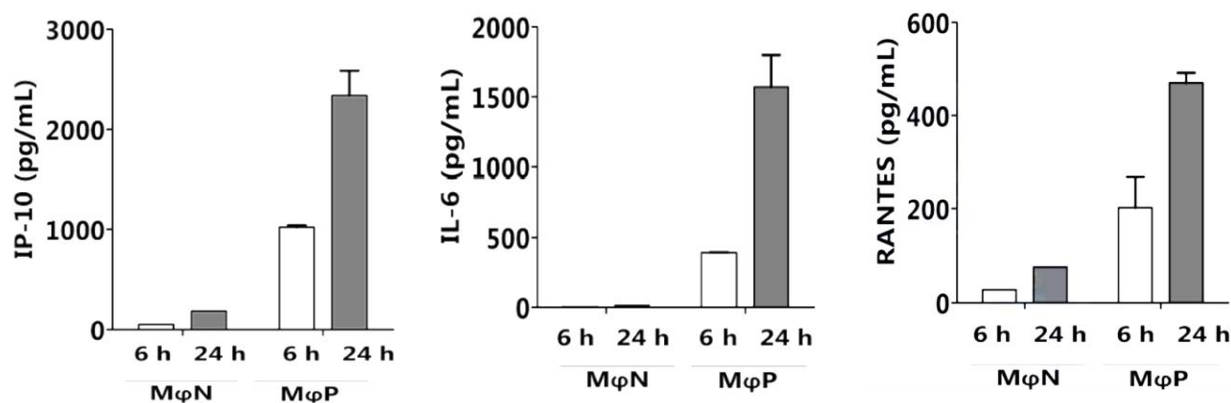
Diversos estudios realizados en humanos, modelos murinos y celulares, han reportado la producción de una variedad de citocinas, entre ellas de tipo pro-inflamatorio, debido a la infección por HVSR (Sheeran, et al., 1999, McNamara, et al., 2005, Bermejo-Martin, et al., 2007, Jafri, et al., 2004, Ravi, et al., 2013).

En nuestro modelo *in vitro* de persistencia por HVSR en macrófagos murinos, previamente se analizó la expresión de 10 citocinas IL-6, IP-10, RANTES, MCP-1, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12P70 y GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos), este ensayo se realizó utilizando sobrenadantes de cultivos de macrófagos infectados persistentemente por el HVSR (SN-M $\phi$ P) y de macrófagos no infectados (SN-M $\phi$ N) utilizados como control, mediante un ensayo tipo ELISA y utilizando la tecnología Merck Millipore MILLIPLEX® MAP kits. La concentración de estas citocinas se determinó en los sobrenadantes colectados a 6 h y 24 h. Como resultado se encontró que las citocinas IL-6, IP-10 y RANTES estaban significativamente incrementadas en los cultivos persistentes (M $\phi$ P) con respecto cultivos no infectados (M $\phi$ N), además la expresión de estas fue mayor en los sobrenadantes colectados a 24 h con respecto a los de 6h (Figura 11). Las

---

---

otras citocinas evaluadas (MCP-1, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12P70 y GM-CSF) se expresaron en concentraciones semejantes tanto en M $\phi$ N como en M $\phi$ P.



**Figura 11. Citocinas producidas durante la infección persistente por HVSR en macrófagos murinos (M $\phi$ P).**

### 3.3. Síntesis y respuesta a IFN- $\beta$ en la infección persistente de HVSR

La respuesta inicial a la infección viral se caracteriza por la producción temprana de los interferones de tipo I (IFN $\alpha/\beta$ ), que actúa de manera parácrina y autócrina induciendo ISGs. En células Hep-2 persistentemente infectadas por HVSR, se ha demostrado un aumento en la expresión de IFN- $\beta$  y una respuesta alterada de la vía de señalización JAK/STAT debido a la inhibición de la fosforilación de la proteína STAT1/2 (Zheng, et al., 2015).

En nuestro cultivo de M $\phi$ P previamente observamos la expresión constitutiva del IFN- $\beta$  a nivel de mRNA (Rivera-Toledo et al., 2015) y proteína (Figura 12) a través del análisis por q-RT-PCR y ELISA, respectivamente. En los cultivos de M $\phi$ N no hay expresión génica de IFN- $\beta$  y en los cultivos de M $\phi$ P el IFN- $\beta$  no induce la fosforilación de STAT1 (Rivera-Toledo et al., 2015).



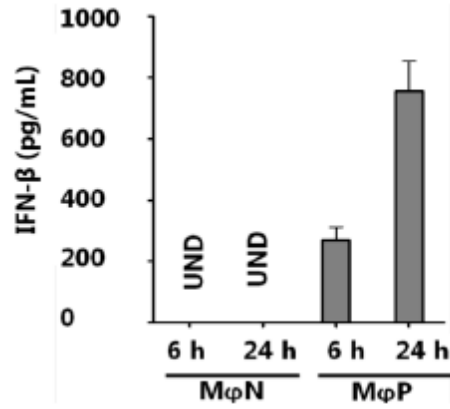


Figura 12. IFN-β en macrófagos murinos infectados persistentemente por HVSR (MφP).

---

---

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Una de las consecuencias de la persistencia del HVSR en macrófagos murinos es el incremento de la expresión de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias tales como IFN- $\beta$ , IL-6, IP-10 y RANTES y probablemente de una gran diversidad de moléculas que pueden ser secretadas en el sobrenadante de las células en cultivo (SN-M $\phi$ P). A partir de estas observaciones, hemos sugerido que los factores solubles presentes en el SN-M $\phi$ P podrían tener un efecto parácrino en células no infectadas alterando su perfil transcripcional como consecuencia de la activación de vías de señalización relacionadas con la respuesta a las citocinas presentes en el sobrenadante. De esta manera, la persistencia del HVSR puede tener consecuencias directas sobre la fisiología de las células infectadas e indirectas sobre células no infectadas al alterar su estado de activación como consecuencia de la exposición a un ambiente pro-inflamatorio, contribuyendo con la patogénesis por la infección por el HVSR.

#### **V. HIPÓTESIS**

El SN-M $\phi$ P modifica el estado de activación y el perfil transcripcional de macrófagos no infectados.

#### **VI. OBJETIVOS**

##### **6.1. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto del SN-M $\phi$ P, sobre la expresión génica de macrófagos no infectados.

##### **6.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el efecto del SN-M $\phi$ P sobre la vía de señalización Jak/STAT en M $\phi$ N, a través de la fosforilación del factor de transcripción STAT1.
- Evaluar si el SN-M $\phi$ P altera el perfil de expresión génica de M $\phi$ N a través de un microarreglo de ADN.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

MACRÓFAGOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS(M $\phi$ P)

MACRÓFAGOS NO INFECTADOS(M $\phi$ N)

>90% de células que expresan el antígeno viral  
24 h cultivo  
90% confluencia

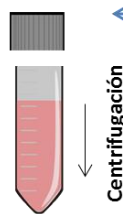
24 h cultivo  
90% confluencia



SN-M $\phi$ P

SN-M $\phi$ N

Colecta de sobrenadantes



Centrifugación

Tratamiento U.V.



Determinación del título viral  
TCID<sub>50</sub>

Tratamiento de  
M $\phi$ N con 2 mL  
de sobrenadante  
pre tratado con  
U.V

Tratamiento de  
M $\phi$ N con 2 mL  
de sobrenadante  
pre tratado con  
U.V

SN-M $\phi$ P

SN-M $\phi$ N (Control)

SN-M $\phi$ P

SN-M $\phi$ N (Control)



M $\phi$ N

M $\phi$ N

M $\phi$ N

M $\phi$ N

Tratamiento:  
30 min, 2,4,6,9,12 h

Tratamiento:  
3 y 12 h

Análisis por western blot  
de p-STAT1

Análisis por microarreglo

Figura 13. Esquema general de la metodología.

---

---

## **7.1. Cultivos celulares**

### **7.1.1 Macrófagos no infectados (M $\phi$ N)**

Se empleó la línea celular tipo macrófago P388D1 (M $\phi$ ), proveniente de una neoplasia linfoide de ratón DBA/2 inducido por metilclorantreno (Sarmiento, et al., 2002).

El cultivo se mantuvo en RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Grand Island, NY, USA), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Biowest, Veracruz, Mexico), 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina), y 1  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoethanol.

### **7.1.2. Macrófagos infectados persistentemente con el HVSR (M $\phi$ P)**

Se utilizaron macrófagos persistentemente infectados que fueron obtenidos previamente en el laboratorio como se describe a continuación.

Una subclona de macrófagos P388D1 fueron infectados a una m.o.i. de 1 con el HVSR de la cepa Long (ATCC, VR-26), posteriormente las células que sobrevivieron, se cultivaron por diez pases y luego se superinfectaron a una m.o. i. de 1. A partir de esos cultivos se obtuvieron células que expresaron entre el 90% y 95 % de antígeno viral que después de diez pases no mostraron la formación de sincitios, ni muerte celular y expresaron más del 90 % de antígeno viral (Sarmiento, et al., 2002).

El cultivo se mantuvo en RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Grand Island, NY, USA), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Biowest, Veracruz, Mexico), 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina), y 1  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoethanol.

### **7.1.3. Hep-2**

El cultivo de la línea celular epitelial humana derivada de un carcinoma laríngeo, Hep-2, se mantuvo en DMEM (GIBICO- BRL Grand Island, NY) suplementado con 10  $\mu$ M de HEPES (SIGMA, St. Louis, MO, USA) 5% de suero fetal bovino (Biowest, Veracruz, Mexico) y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina).

---

---

#### **7.1.4. VERO**

El cultivo de la línea celular derivada de riñón de mono verde africano, VERO, se mantuvo en DMEM (GIBICO-BRL Grand Island, NY) suplementado con 10  $\mu$ M de HEPES (SIGMA, St. Louis, MO, USA) 5% de suero fetal bovino (Biowest, Veracruz, Mexico), 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina).

#### **7.2. Virus Sincitial Respiratorio Humano(HVSR)**

Virus Sincitial respiratorio humano de la cepa Long propagado en células Hep-2 (VSR wild-type) y titulado por el método TCID<sub>50</sub>.

##### **7.2.1. Propagación de HVSR en células Hep-2**

Un cultivo de 20 x 10<sup>6</sup> células Hep-2 se lavó con PBS1 X (138 mM NaCl, 3 mM KCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) y fue infectado a una m.o.i de 0.1 con un stock de HVSR, el cual tenía un título de 10.5 x 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL. Después de 2h de adsorción a 37°C / 5%CO<sub>2</sub> se retiró el inóculo viral y se adicionó DMEM al 2% SFB. Posterior al periodo de incubación de 96 h a 37°C / 5% CO<sub>2</sub>, se recuperaron las células y el sobrenadante del cultivo, los cuales se sonicaron durante 10 min y se centrifugaron a 1,500 r.p.m. por 10 min. El sobrenadante fue recuperado y suplementado con MgSO<sub>4</sub> 0.1 $\mu$ M. Las alícuotas del virus se congelaron a -70°C hasta su uso.

##### **7.2.2. Titulación viral por el método del TCID<sub>50</sub>**

Se sembraron células HEp-2 a una confluencia del 80% en placas de 96 pozos, se lavaron con PBS 1X y posteriormente se infectaron con 50  $\mu$ L de diluciones seriadas 1:10 del virus en DMEM s/SFB. Después de 2 horas de adsorción a 37 °C/ 5% CO<sub>2</sub>, se retiró el inoculo y se adicionó DMEM al 2% SFB. A las 96 h post infección, las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS1X por 20 min a 4 °C y se tiñeron con cristal violeta al 0.5% en PBS 1X durante 30 min a T.A. en agitación constante. La placa se lavó con agua y se calculó el título del virus por el método de Kärber, basado en el efecto citopático (CPE) observado, expresado como dosis infectiva media por mL (TCID<sub>50</sub>/mL).

---

---

Ecuación del método de Kärber:

$$TCID_{50} = -\Delta - \delta (S-0.5)$$

Donde

$\Delta$  =  $\log_{10}$  de la dilución con 100% de CPE

$\delta$  =  $\log_{10}$  del factor de dilución

S = Suma por dilución de los cultivos con CPE positivo, incluyendo los cultivos pertenecientes a la dilución con 100% de CPE

### **7.3. Confirmación de la persistencia en cultivos de MφP**

#### **7.3.1. Citometría de flujo**

Las células provenientes de cultivos de MφP se lavaron y se resuspendieron en PBS 1X, posteriormente se centrifugaron a 1,400 r.p.m. y el pellet se fijó con paraformaldehído al 4% durante 15 min a 4°C con periodos de agitación de 5 min. A continuación se lavó con PBS 1X y se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 segundos, el pellet celular obtenido se permeabilizó con 0.3% de saponina en PBS 1X por 15 min a T.A., se lavó nuevamente con PBS 1 X y se centrifugó a 15,000 r.p.m. durante 10 segundos. El pellet celular se trató con una solución de bloqueo inespecífica de SNC (suero de neonato de cabra) al 5% en PBS 1X durante 20 min en hielo. Posterior al tratamiento de bloqueo la muestra se centrifugó a 15,000 rpm por 10 seg y se eliminó el exceso de la solución de bloqueo. El botón celular se trató por 40 min en hielo y en ausencia de luz, con 30  $\mu$ L del kit de inmunofluorescencia directa de IMAGEN<sup>TM</sup> Respiratory Syncyial Virus, que contiene tres anticuerpos monoclonales conjugados con FITC para detectar proteínas estructurales del HVSR, el concentrado de anticuerpos se utilizó a una dilución de (1:7) en solución de bloqueo (SNC 5%). Las muestras se lavaron dos veces y se resuspendieron con PBS 1X para su análisis por citometría de flujo en el equipo FACScan de Becton-Dickinson.

---

---

#### **7.4. Colecta de sobrenadantes de los cultivos de M $\phi$ P (SN-M $\phi$ P) y M $\phi$ N (SN-M $\phi$ N)**

Los sobrenadantes fueron colectados a partir de diferentes pases celulares de M $\phi$ P y M $\phi$ N, los cuales se mantuvieron con RPMI (GIBICO-BRL Grand Island, NY) suplementado con 5% de SFB (Biowest, Veracruz, Mexico), durante 24 h a 37°C/5% CO<sub>2</sub> y con 80 a 95 % de confluencia. La persistencia de los M $\phi$ P se monitoreó mediante el ensayo inmunofluorescencia directa de IMAGEN<sup>TM</sup> como se describió anteriormente y se utilizaron cultivos con más del 90 % de células que expresaban el antígeno de HVSR.

Los sobrenadantes se centrifugaron a 1,400 r.p.m. para eliminar los restos celulares y se congelaron a -20°C hasta su uso.

##### **7.4.1. Tratamiento del SN-M $\phi$ P con luz ultravioleta (U.V.)**

Volúmenes de 3mL de SN-M $\phi$ P se colocaron en cajas petri de plástico de 35 mm de diámetro, las cuales se mantuvieron sobre hielo y en agitación constante durante 40 min de exposición a una fuente de luz ultravioleta con longitud de onda de 253.7 nm (lámpara Phillips TUV 30W/G30T8 ultraviolet Hg), ubicada a 8 cm de distancia de las muestras. Como referencia de la efectividad del tratamiento, se trató el wtVSR con luz U.V. a las condiciones anteriormente descritas.

##### **7.4.2. Titulación del SN-M $\phi$ P por el método de TCID<sub>50</sub>**

Para evaluar la efectividad del tratamiento de inactivación con luz U.V. previamente descrito, el SN-M $\phi$ P y el wtVSR se titularon por el método de TCID<sub>50</sub>.

Se sembraron células Vero a una confluencia del 80% en placas de 96 pozos, se lavaron con PBS1X y posteriormente se infectaron con 50  $\mu$ L de diluciones seriadas 1:10 del SN-M $\phi$ P pre-tratado con U.V. o wtVSR pre-tratado con U.V. en DMEM s/SFB. Después de 2 horas de adsorción a 37 °C/ 5% CO<sub>2</sub> , se retiró el inculo y se adicionó DMEM al 2% SFB. A las 96 h post infección, las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS1X por 20 min. a 4 °C y se tiñeron con cristal violeta al 0.5% en PBS 1X durante 30 min. a T.A. en

---

---

agitación constante. La placa se lavó con agua y se calculó el título del SN-MφP por el método de Kärber.

## **7.5. Cinética de la fosforilación del factor de transcripción STAT1 (p-STAT1) en MφN, por efecto del SN-MφP**

### **7.5.1. Western Blot**

Se cultivaron MφN ( $3 \times 10^6$ ) en cajas petri de plástico de 60 mm de diámetro con RPMI 5%SFB a 37°C/5%CO<sub>2</sub>, los cuales al llegar a un 90-95% de confluencia se lavaron con 2 mL de PBS 1X y se trataron con 2 mL de SN-MφP, durante 30 min 2,4,6,9 y 12 h. Como control negativo las células se trataron con 2 mL de SN-MφN por 30 min 2, 4, 6, 9 y 12 h, y como control positivo se trataron con 2 mL de IFN-β recombinante de ratón (EMD Millipore, Single Oak Drive, Temecula, U.S.A) a una concentración de 100U/mL en RPMI s/SFB por 30 min, ya que se ha reportado que a ese tiempo de exposición ocurre la fosforilación de STAT1 (Rivera-Toledo et al., 2015).

Posterior al tiempo de tratamiento se extrajo proteína de los cultivos como se describe a continuación. Los cultivos se lavaron con 2 mL de PBS 1X, se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X y fueron centrifugados a 15,000 r.p.m. durante 6 seg. Las células se lisaron con buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 130 mM, Triton X-100 1%, Desoxicolato de sodio 0.5%, Dodecilsulfato sódico SDS 0.1%) suplementado con 1X de inhibidor de proteasas (Roche Applied Science, Manngem, Germany), se agitaron en vortex 10 seg y se incubaron 30 min en hielo. Los lisados celulares se centrifugaron a 13,000 r.p.m. por 25 min a 4°C para eliminar restos celulares y se colectó el sobrenadante. Se cuantificó la proteína por el método modificado de Lowry con el kit DC protein Assay de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Se tomaron 20 μg de proteína de los extractos, a los que se les adicionó 4.2 μL de buffer de carga (1μL de NuPAGE Reducing Agent por 2.5 μL de NuPAGE LDS Sample Buffer) y se ajustaron a un volumen de 20 μL con H<sub>2</sub>O destilada.



---

---

Posteriormente las muestras se trataron a 70-80°C por 10 min para desnaturalizar las proteínas.

Después del tratamiento de desnaturalización, las muestras se cargaron en un gel del sistema NuPAGE Novex Bis-Tris mini gels de life technologies (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que utiliza la técnica de electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) y se corrieron a 200 Volts durante 55 min. Posteriormente se hizo la transferencia en cámara semi-húmeda (Xcell SureLock™ Mini-cell, InvitrogenLife Technologies, Carlsbad, CA, USA) a una membrana de PVDF pre-tratada 1 min con metanol puro (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), bajo condiciones de 30 volts durante 60 min.

Posterior a la transferencia, la membrana se trató 1h 30 min con solución de bloqueo, BSA (albúmina sérica bovina) al 5% en TBS 1X-Tween 0.1% (TBS-T) (TBS 1X: 50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM NaCl) (en el caso del uso de anticuerpos anti-STAT1 y anti-p-STAT1) o leche descremada en polvo al 5 % en TBS-T (en el caso del uso de anticuerpos anti-β-tubulina). Después del tratamiento de bloqueo, la membrana se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante con anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-p-STAT1 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) a una dilución 1:1000 en BSA 5%, anti-STAT1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) a una dilución de 1:500 en BSA 5% y anti-β-tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) a una dilución 1:1000 en leche descremada al 5%. Después de incubar la membrana con el anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con TBS-T y se incubó 2 h en agitación constante a T.A. con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:3000 para detectar p-STAT1 y STAT1, o 1:7000 para detectar β-tubulina. Después del proceso de incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó 3 veces con TBS 1X y las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

---

---

## **7.6. Perfil de expresión transcripcional de MφN tratados con el SN-MφP**

Se sembraron  $3 \times 10^6$  MφN en cajas Petri de plástico de 35 mm de diámetro y se incubaron a 37°C/5%CO<sub>2</sub> hasta presentar 90-95 % de confluencia. Después los cultivos se lavaron dos veces con 2 mL de PBS 1X y se trataron por duplicado, con 2 mL de SN-MφP durante 3 y 12 h. Como control los MφN se trataron por duplicado con SN-MφN, a 3 y 12 h. A partir de estas muestras, se obtuvo ARN total como se describe a continuación.

### **7.6.1. Extracción de ARN**

Se obtuvieron muestras por duplicado de ARN total a partir de muestras de MφN tratados a 3 y 12h con SN-MφP y de MφN tratados 3 y 12h con SN-MφN, utilizando el kit AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep (Axygen Biosciences, Central Avenue Union City, CA, USA).

### **7.6.2. Análisis por microarreglo**

Las muestras de RNA total, se enviaron a la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión (UGAE) del Instituto Nacional de Medicina Genómica, para su análisis en microarreglo por el Q.F.B. Alberto Iván Salido Guadarrama y el Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes. El microarreglo que se usó fue el Mouse GeneChip® Gene 1.0 ST Array System de Affymetrix.

De acuerdo con la ficha técnica del GeneChip® Gene 1.0 ST Array<sup>1</sup>, el método consiste en realizar la síntesis de cDNA por transcripción inversa a partir de las muestras de ARN. El cDNA (hebra sentido o 5'-3') es marcado con biotina, cuantificado y fragmentado por acción enzimática. Después, el cDNA marcado es inyectado al biochip (en este estudio se utilizó un chip para cada muestra, en total fueron 8 chips), para que se lleve a cabo el proceso de hibridación, el cual ocurre en hornos de hibridación (la UGAE, emplea hornos de hibridación 640 y 645)<sup>2</sup>, posteriormente los chips se someten a lavados con la finalidad de eliminar

---

<sup>1</sup> <http://www.affymetrix.com/>

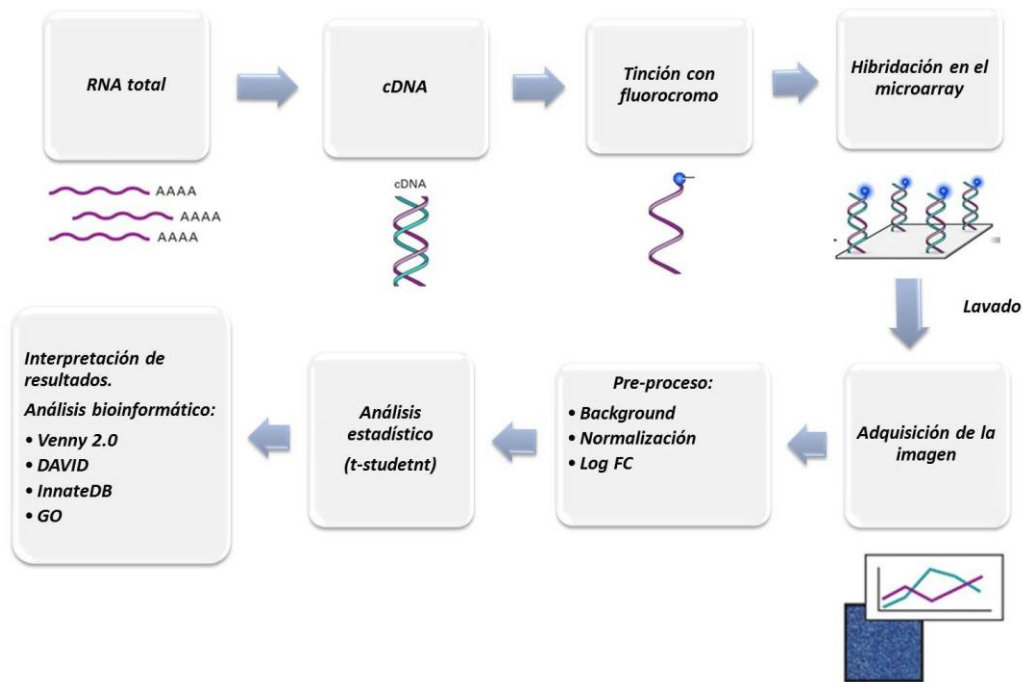
<sup>2</sup> [http://www.inmegen.gob.mx/tema/cms\\_page\\_media/813/AnalisisdeExpresion.pdf](http://www.inmegen.gob.mx/tema/cms_page_media/813/AnalisisdeExpresion.pdf)

---

---

secuencias no incorporadas. A continuación se procede al escaneo del chip para la adquisición de la imagen a través de la detección de la intensidad de fluorescencia debida a la hibridación de las muestras (la UGAE, cuenta con escáneres 30007G con autoloader y estación de trabajo)<sup>1</sup>.

Los datos obtenidos se pre-procesan mediante la corrección del background (minimiza el efecto que la hibridación no específica ocasiona sobre la señal de cada prueba), normalización de los datos (ajuste de la señal a un valor comparable) y finalmente la obtención de un valor cuantitativo de contraste entre dos biochips, denominado Log FC (log fold change), que es la tasa de cambio en la expresión de los genes entre dos muestras. Posteriormente, se realiza el análisis estadístico (t-student) y finalmente se hace la interpretación de los resultados a través de programas bioinformáticos como Venny 2.0 (Oliveros, 2007), GO (Gene Ontology) (Ashburner et al., 2000), DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Nature Protocols, 2009), InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond-recent updated and continuing curation (Breuer et al., 2014) y GeneCards.



**Figura 14. Método del análisis por microarreglo.** El microarreglo que se usó fue el Mouse GeneChip® Gene 1.0 ST Array System de Affymetrix.

### 7.6.2.1. Características del microarreglo

El GeneChip® Gene 1.0 ST Array System de Affymetrix consiste en un microarreglo de ADN empleado para el análisis de la expresión génica. Estos chips contienen secuencias de oligonucleótidos de 25-mer (pares de bases) y son elaborados por medio de fotolitografía (síntesis *in situ*), lo que los hace chips de alta densidad con una mayor cobertura del transcriptoma. El Mouse Gene 1.0 ST Array analiza aproximadamente 28,853 genes bien caracterizados y referidos en el Genbank, que pueden detectarse mediante 770,317 pruebas. También, contiene la tecnología perfect match, que consiste en tener un oligonucleótido complementario a la secuencia de la muestra y uno o dos oligonucleótidos que difieren del complementario por la sustitución de una base en la parte central de la secuencia, que ayuda a determinar la hibridación no específica de la muestra, de la cual se requiere aproximadamente 100ng de ARN.

ESPECIFICACIONES	
The Mouse GeneChip® Gene 1.0 ST Array System (Affymetrix)	
Longitud de los oligonucleótidos de prueba	25-mer
Hebra interrogada	Hebra sentido
Total de pruebas distintas	770,317
Resolución (número de pruebas por gen)	27 (media)
Número estimado de genes analizados.	28,853

**Tabla 3. Características del GeneChip® Gene 1.0 ST Array System de Affymetrix.**

#### 7.6.2.2. Análisis de datos

Los datos analizados por microarreglo se operan en escalas de logaritmo base dos ( $\text{Log}_2$ ). Para validar que un gen aumentó o disminuyó en una condición respecto a la otra, se obtiene  $\text{Log}_2$  del cociente entre las intensidades de fluorescencia, que proporciona las tasas de cambio de expresión de un gen, representadas a través de valores de log fold change (FC). El log FC mayor o igual a 1.0 unidad indica la sobre-expresión de un gen y menor o igual a -1.0 unidad la sub expresión de un gen.

El análisis anterior, se realizó en la UGAE y se obtuvieron diferentes contrastes que son comparaciones de genes expresados en una condición respecto a otra, los cuales fueron interpretados en el laboratorio a través de los programas Venny 2.0 (Oliveros, 2007), GO (Gene Ontology) (Ashburner et al., 2000), DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Nature Protocols, 2009), InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond-recent updated and continuing curation (Breuer et al., 2014) y GeneCards.

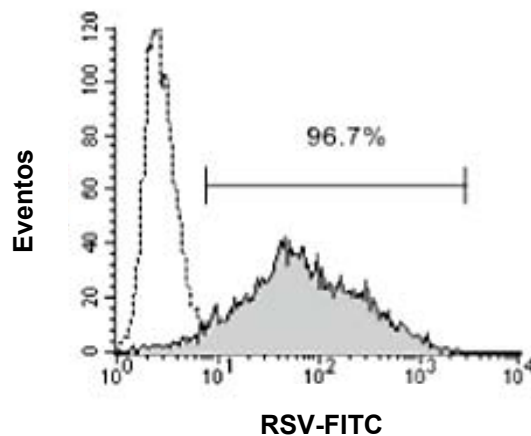
---

---

## VIII. RESULTADOS

### 8.1. Confirmación de la persistencia del HVSR en M $\phi$ P

Para evaluar el efecto del sobrenadante de M $\phi$ P (SN-M $\phi$ P) sobre el estado de activación y el perfil transcripcional de macrófagos no infectados (M $\phi$ N), en primer lugar se confirmó la persistencia del HVSR en los cultivos celulares a partir de los cuales se obtendrían los sobrenadantes. El análisis por inmunofluorescencia directa, evaluada por citometría de flujo indicó que más del 90% de los macrófagos expresan proteínas virales, confirmando la infección persistente por el HVSR (Figura 15).



**Figura 15. Persistencia del HVSR en macrófagos.** Se confirmó la persistencia del hVSR en los cultivos de M $\phi$ P mediante inmunofluorescencia directa con un anticuerpo anti-HVSR marcados con FITC y su análisis por citometría de flujo .El área bajo la curva de color gris representa la expresión del antígeno de HVSR en M $\phi$ P, mientras que el histograma con líneas discontinúas corresponde al control negativo (M $\phi$ N). Este experimento muestra un 96.7% de macrófagos que expresan antígeno viral.

---

---

## 8.2. Determinación del título viral del SN-MφP por el método TCID<sub>50</sub>

En los cultivos de MφP se ha reportado la producción de bajas cantidades de virus infeccioso que es liberado en el sobrenadante, con un rango de  $1-3 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL (Sarmiento, 2002). Los SN-MφP colectados para este estudio, mostraron virus infeccioso en cantidades de  $1-4 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL (Tabla 4). Dado que nuestro objetivo es determinar el efecto de los factores solubles presentes en el SN-MφP sobre los macrófagos no infectados, descartando el efecto de la infección viral, el virus infeccioso se inactivó mediante radiación con luz U.V. La efectividad del tratamiento se evaluó mediante el ensayo TCID<sub>50</sub> y se utilizó wtVSR como referencia de la efectividad del tratamiento. El wtVSR tratado con luz U.V., mostró seis logaritmos de diferencia respecto al no tratado, mientras que en los sobrenadantes, el tratamiento mostró efectividad total, ya que eliminó completamente la infectividad de las partículas virales (Tabla 4).

Muestra	TCID <sub>50</sub> / mL
WtVSR	$1.50 \times 10^7$
WtVSR tratado con U.V.	$6.32 \times 10^1$
SN-MφP	$1-4 \times 10^2 \pm 205.52$
SN-MφP tratado con U.V.	0

**Tabla 4. Tratamiento de los SN-MφP con luz U.V. para la inactivación viral.** El tratamiento con luz U.V. redujo seis logaritmos el título viral del wtVSR e inactivó el virus en el SN-MφP. La efectividad del tratamiento se evaluó mediante el método TCID<sub>50</sub>. El valor de TCID<sub>50</sub>/mL presentado para el SN-MφN y SN-MφP, se obtuvo de tres determinaciones independientes.

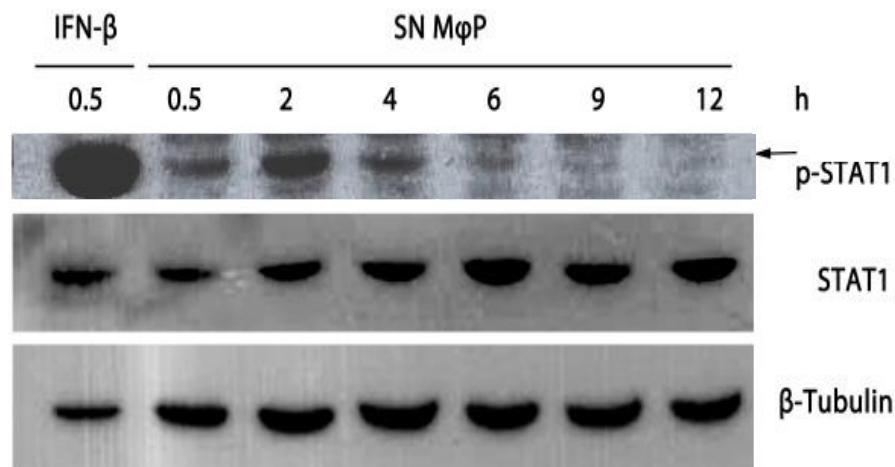
---

---

### 8.3. Cinética de la fosforilación del factor de transcripción STAT1 (p-STAT1) en MφN, por efecto del SN-MφP

Para estudiar el efecto del SN-MφP sobre la activación de MφN, se evaluó la fosforilación de STAT1 en las células tratadas durante 0.5, 2, 4, 6, 9 y 12 h, con los sobrenadantes inactivados con luz U.V. La elección de p-STAT1 como indicador de que el SN-MφP tiene efecto sobre los MφN se basó en el hecho de que hemos detectado la producción de IFN-β por parte de los MφP y STAT1 es un factor de transcripción que participa en la cascada de señalización en respuesta al IFN-I (Rivera-Toledo, et al., 2015).

El análisis por western blot mostró que STAT1 se expresa de manera constitutiva en los MφN (Figura 16) y que bajo el estímulo del SN-MφP se fosforila desde los primeros 30 min de tratamiento, alcanzando un máximo a las 2 h (Figura 16). Después de 4 h, los niveles de p-STAT1 comenzaron a disminuir de manera gradual hasta las 12h. Estos resultados sugieren que p-STAT1, podría inducir la expresión de ISGs en los MφN.



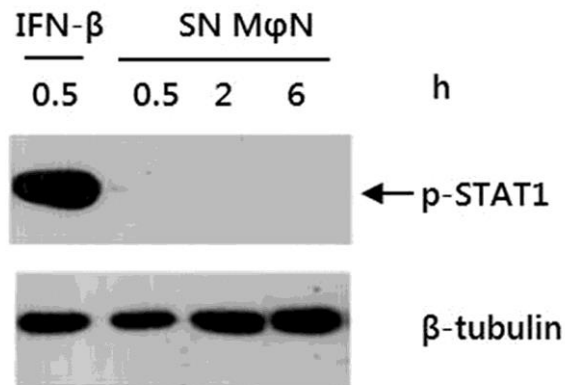
**Figura 16. Cinética de la fosforilación de STAT1 por efecto del SN-MφP.** Los MφN tratados a 0.5, 2, 4, 6, 9 y 12 h con el SN-MφP, mostraron la fosforilación de STAT1. Como control positivo de fosforilación de STAT1, las células fueron tratadas con IFN-β recombinante de ratón a una concentración de 100U/mL.



---

---

Como un control negativo los M $\phi$ N se trataron con sobrenadantes provenientes de los mismos cultivos (SN-M $\phi$ N) y se evaluó si STAT1 se fosforila bajo estas condiciones, después de 0.5, 3 y 6h de tratamiento. En este caso, no se observó la fosforilación de STAT1 en ningún punto de la cinética, lo que indica que los SN-M $\phi$ N no tienen los componentes necesarios para estimular a la célula no infectada (Figura 17).



**Figura 17. Control de la cinética en respuesta al SN-M $\phi$ N.** El tratamiento de las células (M $\phi$ N) con el SN-M $\phi$ N no mostró la fosforilación de STAT1. Como control positivo de la fosforilación de STAT1, las células fueron tratadas con IFN- $\beta$  recombinante de ratón a una concentración de 100U/mL.

#### 8.4. Estudio del perfil transcripcional de M $\phi$ N tratados con el SN-M $\phi$ P

Una vez determinado que los SN-M $\phi$ P tienen la capacidad de activar por lo menos una vía de señalización en los M $\phi$ N, se llevó a cabo un estudio de su perfil transcripcional global, a través de un microarreglo de ADN.

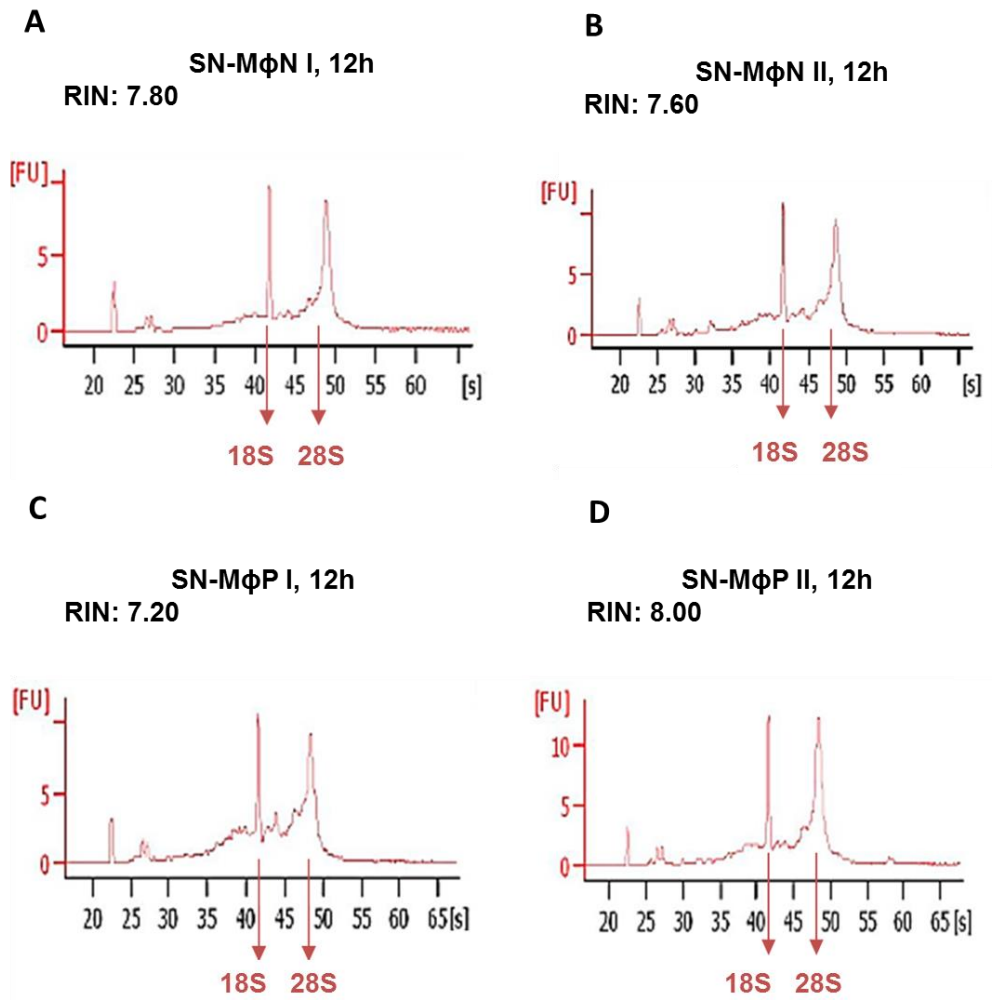
##### 8.4.1. Análisis de la calidad del ARN

En primer lugar, se obtuvo ARN total a partir de M $\phi$ N tratados con SN-M $\phi$ P durante 3 y 12h. Como control negativo se obtuvo ARN total de M $\phi$ N tratados con SN-M $\phi$ N bajo las mismas condiciones. Todas las muestras se corrieron como duplicados biológicos. Las muestras se enviaron a la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión (UGAE) del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en

donde se evaluó si el ARN cumplía con las características necesarias de concentración, pureza e integridad para ser analizadas en el microarreglo de ADN. En la tabla 5 se muestra la pureza y concentración de las 8 muestras de ARN utilizadas para este estudio y la figura 18 corresponde al análisis por electroferogramas que validaron que las muestras tenían la integridad necesaria para el ensayo, definida por los dos máximos bien definidos en 18S y 28S, además de un valor mínimo de RIN de 8.

Muestras	Concentración (ng/mL)	Relación ARN/Proteínas (260/280)	Relación ARN/solventes orgánicos (260/230)
SN-MφN I, 3h	371.2	2.00	2.14
SN-MφN II, 3h	396.3	2.03	2.16
SN-MφN I, 12h	232.0	1.97	2.95
SN-MφN II, 12h	216.6	1.99	1.27
SN-MφP I, 3h	397.2	1.99	2.11
SN-MφP II, 3h	292.8	2.02	2.11
SN-MφP I, 12h	269.2	1.98	2.17
SN-MφP II, 12 h	208.0	1.94	2.11

**Tabla 5. Concentración y pureza de las muestras de ARN total.** Cada tratamiento se realizó por duplicado y está indicado con números romanos I y II. Los resultados se obtuvieron del análisis en el equipo NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, U.S.A.).



**Figura 18. Electroferogramas de las muestras de ARN total.** Se analizó la integridad del ARN a través de electroferogramas. Cada tratamiento se realizó por duplicado y esta indicado con números romanos I y II. **A)** muestra I del tratamiento con SN-MφN 12h, valor de RIN de 7.80; **B)** muestra II del tratamiento con SN-MφN 12h, valor de RIN 7.60; **C)** muestra I del tratamiento con SN-MφP 12h, valor de RIN 7.20; **D)** muestra II del tratamiento con SN-MφP 12h, valor de RIN 8.00. Se muestran los ARN ribosomales 28S:18S en los cuatro gráficos. **RIN:** número de integridad de ARN.

---

---

#### 8.4.2. Perfil transcripcional de M $\phi$ N tratados con el SN-M $\phi$ P

Para estudiar la alteración de la expresión de genes en M $\phi$ N por efecto del tratamiento con SN-M $\phi$ P, se hizo un análisis transcripcional a través de un microarreglo de ADN con el chip de Affymetrix, GeneChip® Gene 1.0 ST Array System, diseñado para evaluar aproximadamente 28,853 genes, referidos en el GenBank.

Las muestras analizadas fueron: M $\phi$ N tratados durante 3 y 12h con SN-M $\phi$ P y M $\phi$ N tratados durante 3 y 12h con SN-M $\phi$ N (muestras control). Se analizaron duplicados biológicos, teniendo un total de ocho muestras, cada una en un chip independiente.

El pre-proceso y análisis estadístico (ver figura 14, sección de materiales y métodos) de los datos crudos obtenidos a partir del equipo Affymetrix, fue realizado por expertos del INMEGEN. Este análisis primario nos proporcionó una base de datos en el programa Exel, que consiste en una lista de genes alterados con sus valores correspondientes a las “veces de cambio” en logaritmo base 2 (logFC). Este valor se obtiene a partir de la relación entre la intensidades de fluorescencia (que definen el nivel de expresión de los genes) de la muestra problema y la muestra control. Un valor de logFC igual a 1.0, indica que un gen se sobre-expresó al doble, mientras que un valor igual a -1.0 indica que un gen se sub-expresó a la mitad.

En este trabajo, la muestras problema fueron los M $\phi$ N tratados durante 3 y 12h con los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos infectados persistentemente con el HVSR (SN-M $\phi$ P) y las control fueron los M $\phi$ N tratados durante 3 y 12h con los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos no-infectados (SN-M $\phi$ N). A partir de esta consideración, se realizaron “contrastos” entre las diferentes condiciones experimentales para determinar diferencialmente, los genes que fueron alterados en cuanto a su expresión. La base de datos de Exel nos proporcionó los contrastes descritos en la tabla 6.

Contrastes	
<b>P3h-N3h:</b>	Genes diferencialmente expresados en el tratamiento con SN-MφP 3h respecto a los expresados en el tratamiento con SN-MφN 3h.
<b>N12-N3h:</b>	Genes diferencialmente expresados en el tratamiento con SN-MφN 12h respecto a los expresados en el tratamiento con SN-MφN 3h.
<b>P12-P3h:</b>	Genes diferencialmente expresados por el tratamiento con SN-MφN 12h respecto a los expresados en el tratamiento con SN-MφN 3h.

**Tabla 6. Contrastes entre tratamientos.** Genes diferencialmente expresados en un tratamiento respecto a otro.

El contraste P3h – N3h, se realizó para determinar los genes alterados después de 3 h de estímulo con el sobrenadante de los cultivos infectados, descartando el efecto propio del cultivo celular: SN-MφP3h– SN-MφN3h.

El contraste N12h – N3h, se realizó para determinar los genes alterados después de 12h de tratamiento con el sobrenadante de los cultivos no infectados, descartando el efecto del cultivo celular con respecto al tiempo: SN-MφN12h– SN-MφN3h.

El contraste P12h – P3h, se realizó para determinar los genes alterados después de 12h de estímulo con el sobrenadante de los cultivos infectados, es decir, se consideró únicamente el efecto del sobrenadante de los cultivos infectados: SN-MφP12h- SN-MφP3h.

#### 8.4.3. Análisis bioinformático

Los diferentes contrastes nos proporcionaron una lista de genes alterados, que fueron analizados mediante la base de datos DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Nature Protocols, 2009), para determinar su función y participación en diferentes procesos biológicos. En el anexo I, se presenta la lista completa de los 718 genes que alteraron su expresión, con el símbolo y el nombre del gen.

Después de 3 h de tratamiento con el SN-MφP, se sobre-expresaron 19 genes, mientras que un solo gen fue sub-expresado<sup>3</sup>, la lista de estos genes se muestra en la siguiente (Tabla7). El hecho de que a las 3h de tratamiento casi todos los genes alterados fueran por su regulación positiva, sugiere la activación de los MφN por efecto del sobrenadante.

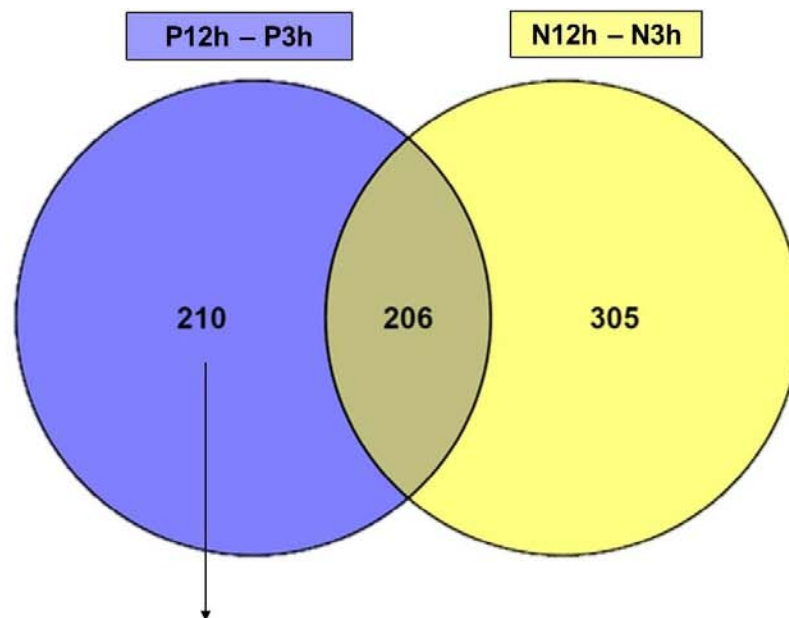
Genes expresados a 3h por efecto del SN-MφP					
19 genes sobre-expresados			1 gen sub-expresado		
Símbolo	Log FC	Nombre	Símbolo	Log FC	Nombre
Usp18	2.18022429	activating transcription factor 3	Mup20	-1.256835	predicted gene 12560; predicted gene 13516; predicted gene 12556
Parp14	1.92707296	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14			
Mx2	4.26334247	myxovirus (influenza virus) resistance 2			
AI607873	2.23352418	expressed sequence AI607873			
Igtp	1.5840779	interferon gamma induced GTPase			
Cd274	2.34304736	CD274 antigen			
Rnf213	1.66931425	ring finger protein 213			
Chac1	2.23253086	ChaC, cation transport regulator-like 1 (E. coli)			
Mitd1	1.27470838	MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1			
Atf3	1.29991163	activating transcription factor 3			
Sifn4	1.3425306	schlafen 4			
Parp9	1.02327193	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9			
Stat2	1.89710898	signal transducer and activator of transcription 2			
Nupr1	1.3154531	nuclear protein 1			
Ccr12	1.62931784	chemokine (C-C motif) receptor-like 2			
Oas3	1.57001923	2'-5' oligoadenylate synthetase 3			
Ddit3	1.41639778	DNA-damage inducible transcript 3			
Sesn2	1.73107297	sestrin 2			
Gm20559	1.69000367	unclassified non-coding RNA gene			

**Tabla 7. Genes alterados a 3h por efecto del SN-MφP.** Se clasifican en genes sobre-expresados ( $\text{Log FC} \geq 1.0$ ) y genes sub expresados ( $\text{Log FC} \leq -1.0$ ). El nombre de los genes se obtuvo del programa DAVID (Nature Protocols, 2009).

Para conocer los genes diferencialmente expresados a las 12h respecto a las 3h de tratamiento con SN-MφP, descartando el efecto del cultivo celular, se analizaron las coincidencias y diferencias entre el conjunto de genes en el

<sup>3</sup> Para validar que un gen se sobre-expresó, el valor de Log FC debe ser mayor o igual a 1 unidad y menor o igual a -1 unidad si se sub expresó.

contraste P12h-P3h y el conjunto de genes en el contraste N12h-N3h, mediante el programa bioinformático Venny 2.0 (Oliveros, 2007). De esta manera, los genes independientes (fuera del conjunto N12h-N3h y de la intersección N12h-N3h y P12h-P3h), serán aquellos que se alteraron exclusivamente por efecto del SN-MφP. El diagrama de Venn, que se presenta a continuación (Figura 19), muestra 210 genes alterados exclusivamente por efecto del SN-MφP y 511 genes que se alteran por efecto propio del cultivo celular. De los 210 genes expresados a las 12h de tratamiento con SN-MφP, 49 genes se sobre-expresaron y 161 genes se sub expresaron.



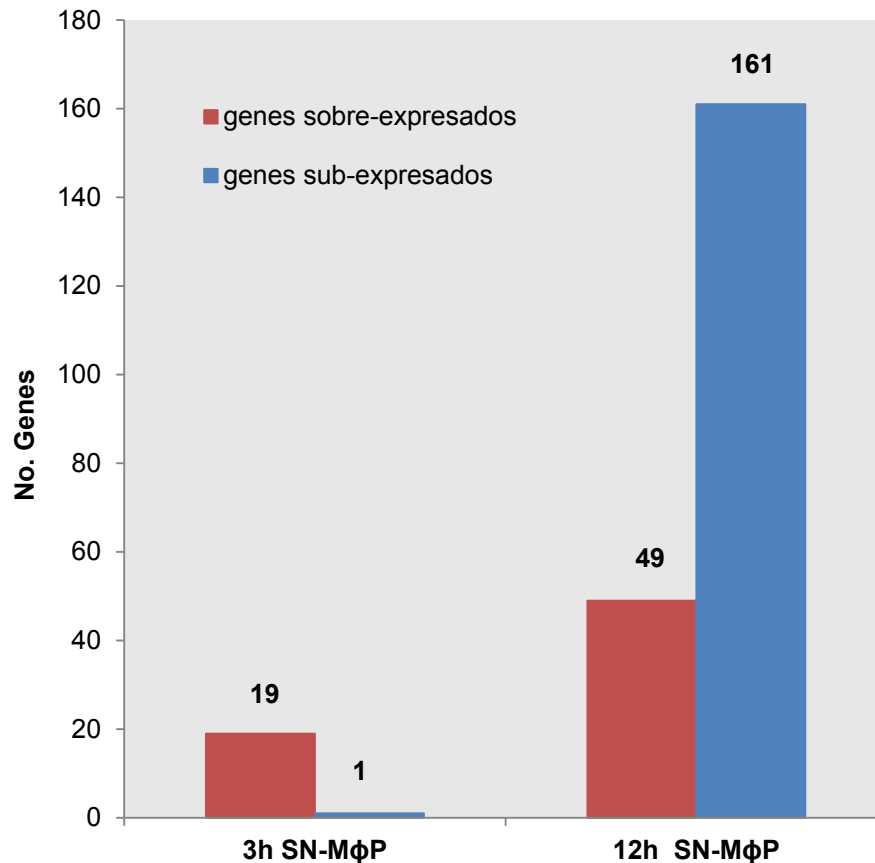
Genes expresados a 12h por efecto del SN-MφP									
49 genes sobre-expresados			161 genes sub-expresados						
Trp53inp1	Clec4a1	1700001F09Rik	Nsdhl	Il18rap	Rbbp7	Zfp948	9830132P13Rik	Uchl3	Stard4
Ascc2	Leprotl1	Kiz	Pfkl	Il1rl2	P4hb	Gyk	Themis2	Nxpe3	Sema4a
Cdsn	Wfs1	P2rx3	Chaf1b	Dck	Parp9	Mitd1	Uap1	Arl6ip6	Map3k8
Tenm4	Prdm15		Plau	Pik3r3	Ifi30	Tmem119	Fam162a	Nt5e	Stat1
Erlin1	Aoah		Lss	Topbp1	Tspo	Slc16a3	Ldha	Mybl2	Stat2
Nr1d2	Napb		Mcm6	Ugdh	Cyth4	Plaur	Rnpep	Rad54l	A630033H20Rik
Bcas3	Fpgt		Pgm2	Naa20	Ccnd3	Impa2	Slc44a3	Nos2	Gm5127
Ccp1os	Impact		Slc36a2	Id1	Spcs3	Fam102b	Tk1	Ctla2b	LOC102639841
Maf1	Pl16		Dhcr7	Acot7	Prim1	Tipin	Nfkbia	Marcks1	Gbp3
Rnf13	Slc29a3		Mmp9	Idl1	Balap2l1	Pdia6	Ly75	Cd52	Trim30a
Slc46a3	Tubd1		Fdft1	Dpysl2	Cd38	Fkbp1b	Pstpip2	Gmnn	Herc6
Taf4b	Paqr3		Glipr2	Parp14	Magt1	Gstm1	Alg6	Helz2	Isg15
Car6	Scara5		Fdps	Icosl	Tmem120b	S100a10	Plk3	Tnnt2	Abcb1b
Ptgir	Cyp4v3		Micall2	Sod2	Rgs16	Prelid2	Srgap3	Parp12	Tnfsf10
Avil	Tarm1		Slc25a5	Srd5a1	Creb3l2	Vimp	Fancb	Fbxo36	Tlr3
Ylpm1	Dnajb9		Creld2	Selplg	Cd5	Tlr2	Ptprj	Gm4583	Casp6
Lgmn	F5		Ehd4	Actg1	Pnpt1	Csrnp1	Sifn4	Gbp7	Ifit2
Plekha1	Mamdc2		Fads2	Tiam1	Acly	COX1	Enpp4	Psmb10	Nlrp3
Cnppd1	Ccdc54		Mikl	Arl5a	Cysltr1	Gpr56	Id2	Epsti1	Dyrk3
Gice	Kbtbd12		Slc15a3	Stxbp1	Ptgs1	Ccnyl1	Cxcl10	Il1rl1	Mx2
Dner	Ifnz		Igtp	Il1a	Higd1a	Hmga2-ps1	Ier2	Prss46	Irgm2
Ago2	Il6		Slc2a1	Hk2	Hsp90b1	Lig1	Mphosph6	5730508B09Rik	Myh9
Syne1	Gm12258		Calr	Ssr1	Rasgrp3	C5ar1	Jmjd6	Sifn9	Tpm4

---

---

**Figura 19. Genes alterados a 12h por efecto SN-M $\phi$ P.** El color azul representa el contraste P12h-P3h y en color amarillo el contraste N12h-N3h. Se muestran 210 genes expresados exclusivamente por efecto del SN-M $\phi$ P a 12h. En la tabla se organizaron los genes sobre-expresados y sub-expresados. Coincidencias de genes analizadas y representadas mediante el programa Venny 2.0 (Oliveros, 2007).

En resumen a lo anterior, la siguiente gráfica (Figura 20) permite observar en conjunto, la cantidad de genes sobre-expresados y sub-expresados a 3h y 12h por efecto del SN M $\phi$ P. A 3h se muestra una mayor cantidad de genes sobre-expresados, mientras que a las 12h hay más genes sub-expresados.



**Figura 20. Número de genes alterados a 3h y 12h por efecto del SN-M $\phi$ P.**



---

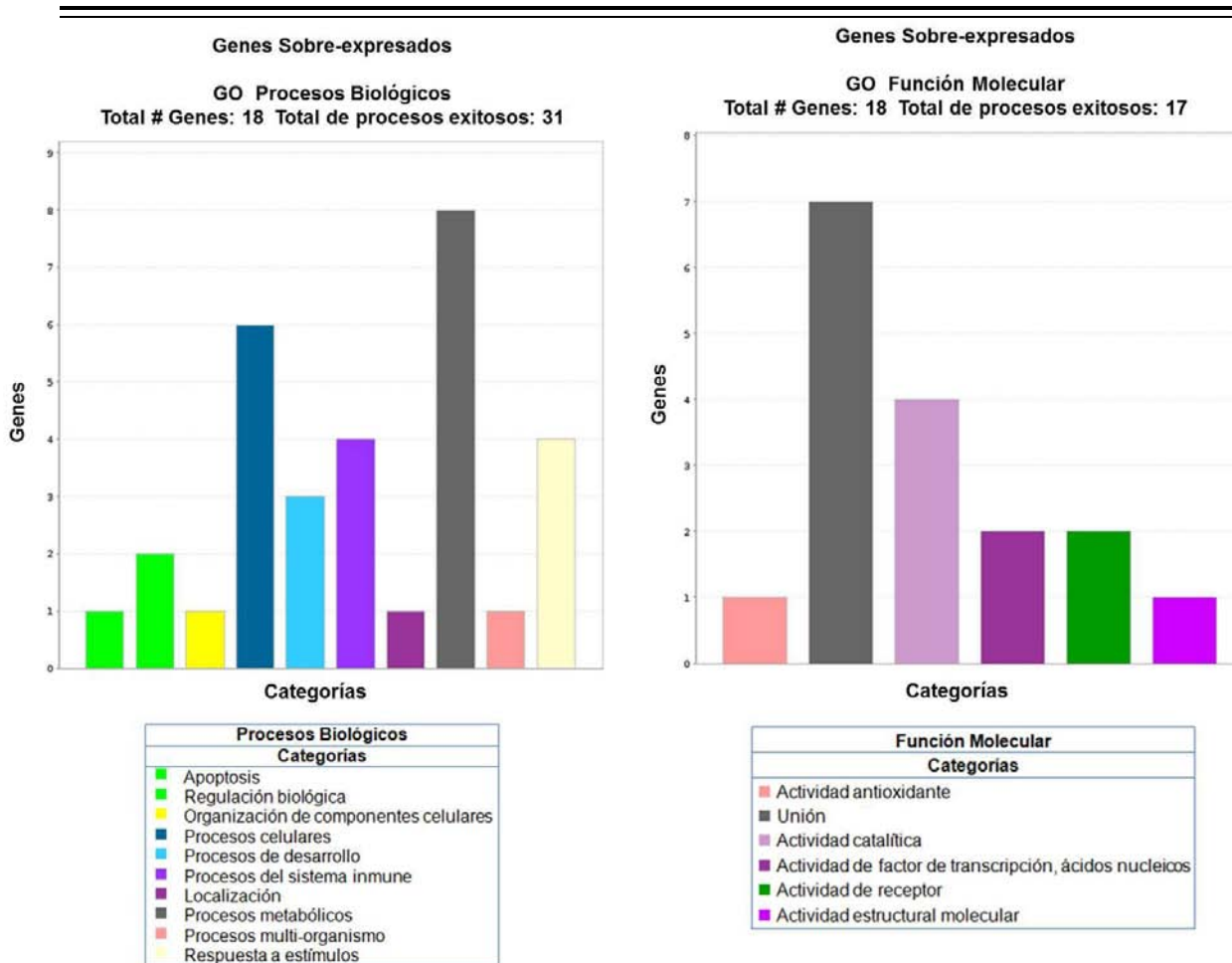
---

#### **8.4.3.1. Clasificación de los genes en categorías funcionales**

Los genes expresados a las 3h y 12h por efecto del SN-MφP, se analizaron en el programa GO (Gene Ontology) (Ashburner et al., 2000), que los clasifica en distintas categorías de acuerdo a su función.

Para el objetivo de este estudio, en las siguientes figuras, se presentan los diferentes procesos biológicos (PB) y funciones moleculares (FM) a los que se encontraron asociados estos genes. Cada barra representa una categoría y su altura indica el número de genes agrupados en esta categoría, además un mismo gen podía ser clasificado en varias categorías.

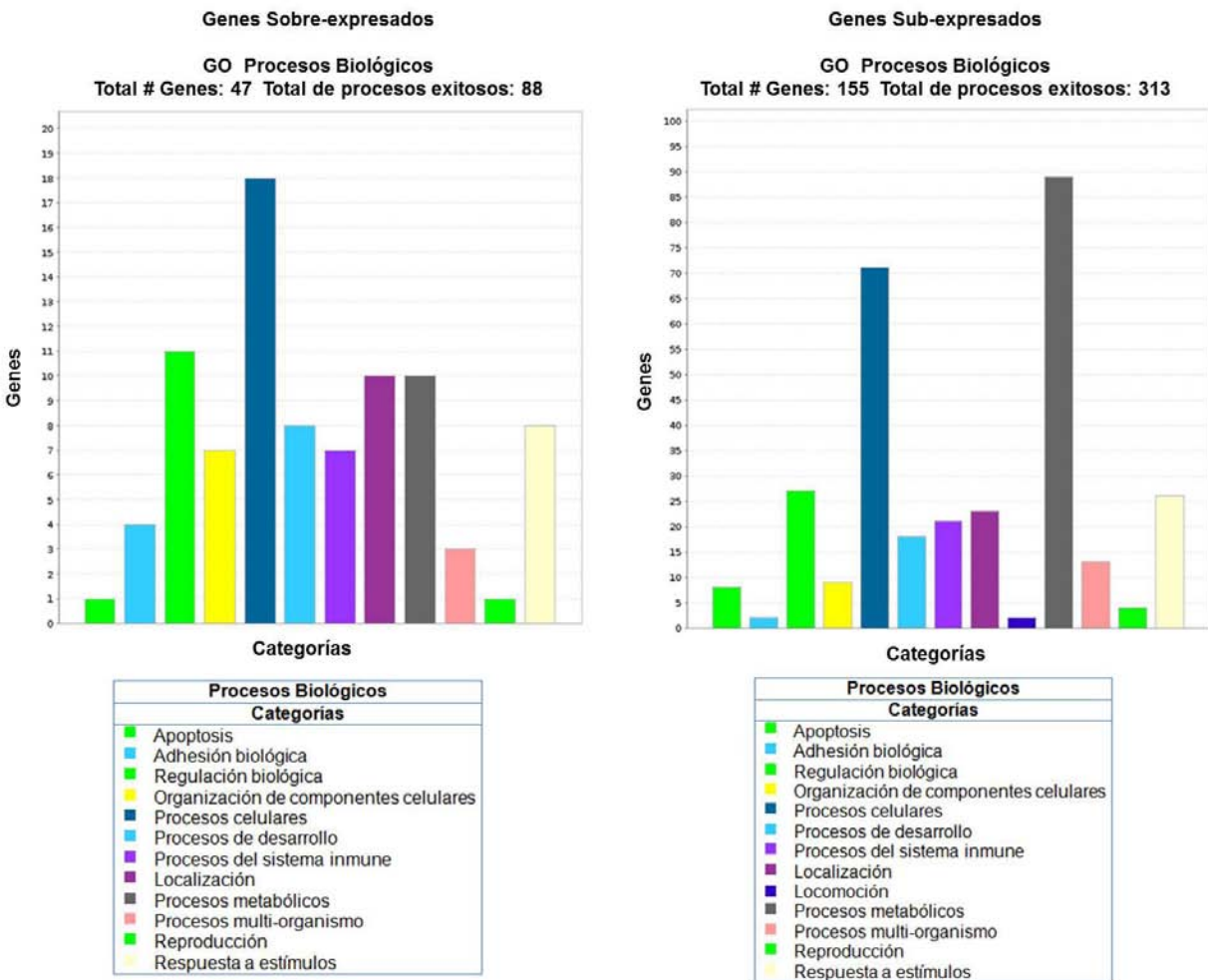
Los genes que mostraron una modificación en su expresión a las 3h por efecto del SN-MφP, principalmente se sobre-expresaron y solo uno se sub-expresó por lo que no se pudo elaborar el análisis de este gen en el programa GO. La mayor proporción de los genes sobre-expresados se asociaron a los PB (Figura 21) de procesos celulares (cualquier proceso que únicamente se lleva a cabo a nivel celular) y metabólicos (actividades biosintéticas y catabólicas) que se refieren al desempeño de funciones vitales, seguidos por los procesos del sistema inmune y de respuesta a estímulos, mientras que de acuerdo a la FM (Figura 21), se relacionaron mayoritariamente con moléculas de unión (proteínas integrales de membrana) y de actividad catalítica (enzimas).



**Figura 21. Clasificación de acuerdo a los procesos biológicos y la función molecular de genes alterados a 3h por efecto del SN-MφP.** Interpretación de los genes del contraste P3h-N3h a través del programa GO (Ashburner et al., 2000).

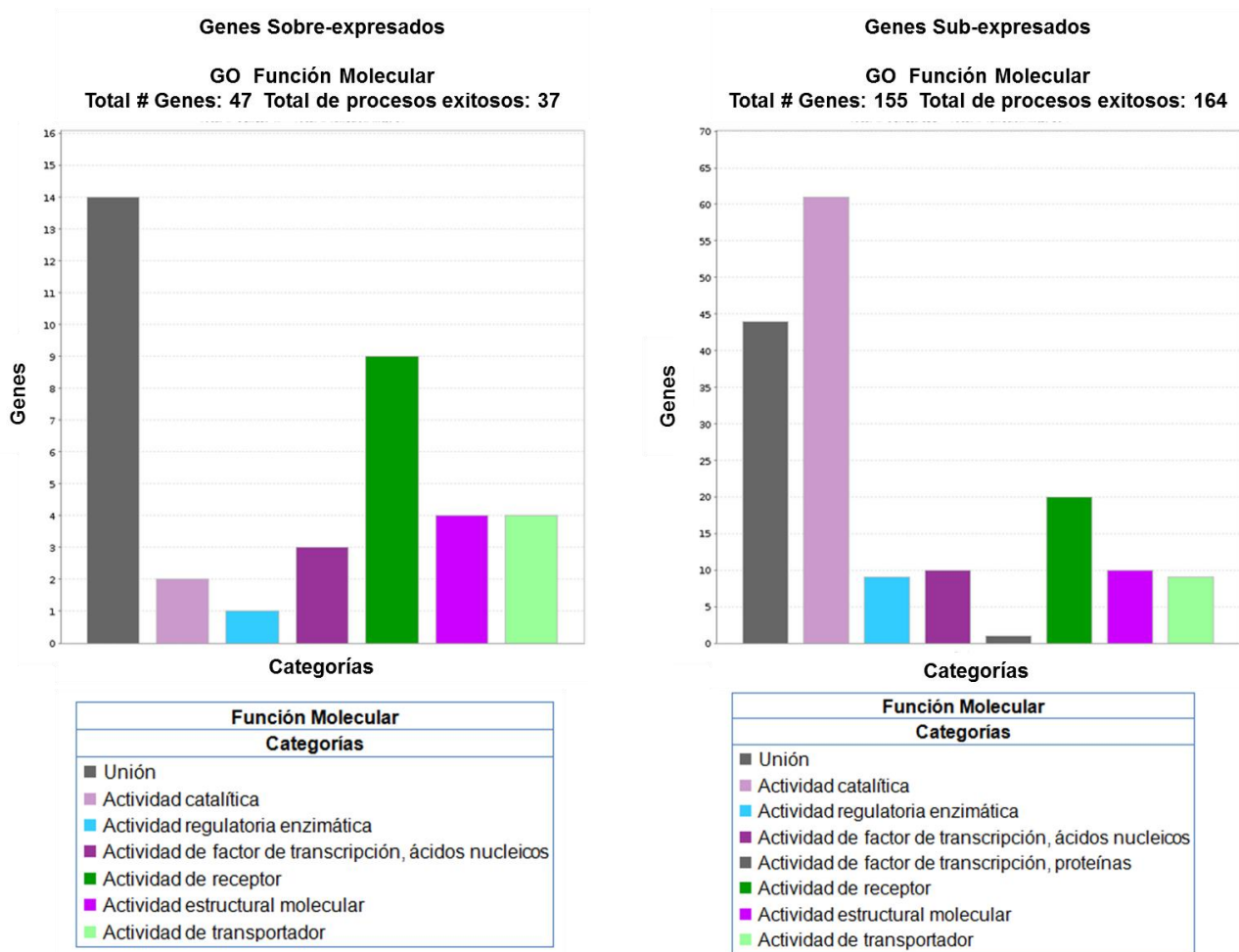
Por otra parte, los 210 genes expresados a 12h por efecto del SN-MφP, se analizaron en grupos de genes sobre-expresados y sub-expresados.

En ambos grupos los PB celulares y de metabolismo incluyeron la mayor cantidad de genes (Figura 22), debido a que se refieren al desempeño de funciones vitales para la supervivencia de la célula. También se puede observar que tanto en los genes sobre-expresados como sub-expresados, los PB asociados son los mismos excepto por el de locomoción que se relacionó con el gen sub expresado IP-10.



**Figura 22. Clasificación de acuerdo al proceso biológico de los genes alterados a 12h por efecto del SN-MφP.** Interpretación de los 210 genes expresados a 12h respecto a 3h de tratamiento con SN-MφP, a través del programa GO (Ashburner et al., 2000).

De acuerdo a la clasificación por FM que se muestra en la figura 23, los genes sobre-expresados a las 12h por efecto del SN-MφP, se asociaron principalmente a actividades de unión y de receptor, mientras que los sub-expresados a actividades de unión y actividad catalítica (entre los que se encontraron principalmente fosfoproteínas).



**Figura 23. Clasificación de acuerdo a la función biológica de los genes aletrados a 12h por efecto del SN-M $\phi$ P.** Interpretación de los 210 genes expresados a 12h respecto a 3h de tratamiento con SN-M $\phi$ P, a través del programa GO (Ashburner et al., 2000).

---

---

#### **8.4.3.2. Genes involucrados en procesos del sistema inmune, apoptosis y ciclo celular**

Con el objetivo de conocer la participación de los genes alterados en nuestro estudio en procesos relacionados con la respuesta inmune, apoptosis y ciclo celular, se consultaron las bases de datos DAVID (Nature Protocols, 2009), InnateDB (Breuer et al., 2014) y GeneCards. Los genes se agruparon de acuerdo con su participación en estos procesos, utilizando la clasificación del programa GO (Ashburner et al., 2000) y la información obtenida de la base de datos DAVID (Nature Protocols, 2009).

Con respecto al proceso de apoptosis a las 3h de tratamiento con el SN-M $\phi$ P, se identificó alterado solo el gen Nupr1. A las 12h se encontraron 11 genes relacionados con apoptosis, de los cuales, Trp53inp1 e IL-6 se regularon positivamente, en contraste con los genes Casp6, Nfkbia, Tnfsf10, Topbp1 P4hb y Nlrp3 se regularon negativamente. La participación de cada gen en el proceso de apoptosis esta descrita en la tabla 8.

APOPTOSIS			
Genes expresados por efecto del SN-MφP			
3h		12h	
Gen	Función	Gen	Función
SOBRE-EXPRESADOS	Nupr1 nuclear protein 1 Inhibe la apoptosis.	Trp53inp1	<b>transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1</b> Induce apoptosis.
		Il6	<b>Interleukin 6</b> Inhibe apoptosis
SUB-EXPRESADOS		P4hb	<b>programmed cell death 4</b> Codifica para la subunidad beta de la prolil 4-hidroxilasa, una enzima multifuncional. Forma y reorganiza enlaces disulfuro de proteínas nacientes. También, funciona como una chaperona que inhibe la agregación de las proteínas mal plegadas de una manera dependiente de la concentración.
		Casp6	<b>caspase 6</b> Codifica para una proteína de la familia de las caspasas, es esencial en el proceso de apoptosis. Estas proteínas se encuentran como pro-enzimas inactivas que después de un proceso proteolítico forman las enzimas activas.
		Nlrp3	<b>NLR family, pyrin domain containing 3</b> Activador corriente arriba de la señalización de NFκB.
		Jmjd6	<b>jumonji domain containing 6</b> Codifica para una proteína receptora implicada en la fagocitosis de células apoptóticas.
		Topbp1	<b>topoisomerase (DNA) II binding protein 1</b> Inhibe la apoptosis durante la transición de la fase G1/S.
		Nfkbia	<b>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</b> Codifica para un miembro de la familia de inhibidores de NFκB. Induce apoptosis
		Tnfsf10	<b>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</b> Codifica para una proteína de la familia de TNF que principalmente induce apoptosis a través de los receptores de muerte DR3 y DR4/5.

Tabla 8. Genes alterados a 3 y 12h por efecto del SN-MφP, involucrados en apoptosis.

En relación al proceso de regulación del ciclo celular, a las 3 y 12h se expresaron genes que arrestan el ciclo celular. A las 3h, solo el gen *Sesn2* se sobre-expresó. A las 12h *Trp53inp1* se sobre-expresó, mientras que los genes *Gmnn* y *Ccnd3* se sub-expresaron. La participación de cada gen en el proceso de regulación del ciclo celular esta descrita en la tabla 9.

CICLO CELULAR			
Genes expresados por efecto del SN-MφP			
3h		12h	
Gen	Función	Gen	Función
SOBRE-EXPRESADOS	<b>Sesn2</b> sestrin 2 Involucrado en el arresto del ciclo celular.	<b>Trp53inp1</b>	<b>transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1</b> Involucrado en el arresto del ciclo celular.
		<b>Gmnn</b>	<b>geminin</b> Codifica para una proteína que se expresa durante la fase S y G2 del ciclo celular. Inhibe la replicación del ADN.
SUB-EXPRESADOS		<b>Ccnd3</b>	<b>similar to Cyclin D3</b> Codifica para la ciclina D3, que en conjunto con otras proteínas, induce la transición de la fase G1/S del ciclo celular.

**Tabla 9. Genes alterados a 3 y 12h por efecto del SN-MφP, involucrados en la regulación del ciclo celular.**

Con respecto a la respuesta inmune, a las 3h de tratamiento con el SN-MφP, se encontraron 10 genes sobre-expresados, entre los que se identificaron genes estimulados por IFN (ISGs) como *Oas3*, *Igtp*, *Slfn4*, *Mx2*, así como los factores de transcripción *Ddit3* y *STAT2* (que activa la transcripción de ISGs). También, se expresó el receptor *Ccr12* y la proteína de membrana *CD274* que funciona como una señal coestimuladora para la activación celular. La participación de cada uno de estos genes en el proceso de regulación de la respuesta inmune esta descrita en la tabla 9.

PROCESOS DEL SISTEMA INMUNE	
Genes expresados a 3h por efecto del SN-MφP	
Gen	Función
<b>Mx2</b>	<b>myxovirus (influenza virus) resistance 2</b> Involucrado en la respuesta antiviral, bloquea la síntesis de ARN.
<b>Igtp</b>	<b>interferon gamma induced GTPase</b> GTPasa inducida por interferón gamma.
<b>Stat2</b>	<b>signal transducer and activator of transcription 2</b> Factor de transcripción involucrado en la vía de señalización Jak/STAT, promueve la transcripción de genes estimulados por interferón y citocinas pro-inflamatorias.
<b>Slfn4</b>	<b>schlafen 4</b> Regulado en respuesta al tratamiento con IFN.
<b>Ccr12</b>	<b>chemokine (C-C motif) receptor-like 2</b> Codifica para un receptor de quimiocinas de siete dominios transmembranales, puede participar en la modulación de la respuesta inmune
<b>Oas3</b>	<b>2'-5' oligoadenylate synthetase 3</b> Codifica para la proteína 2'-5'-oligoadenilato sintetasa que participa en la respuesta inmune innata durante una infección viral. Es inducida por la respuesta a interferones y se encarga de sintetizar oligómeros de adenina a partir de ATP que activan la RNasaL lo que conduce a la degradación de ARN viral y celular que resulta en la inhibición en la síntesis de proteínas.
<b>Cd274</b>	<b>CD27 antigen</b> Codifica para un antígeno de superficie y participa en la señal coestimuladora de linfocitos durante la respuesta inmune.
<b>Ddit3</b>	<b>DNA-damage inducible transcripta 3</b> Codifica para un factor de transcripción que participa en la vía de señalización p38 MAPK.
<b>Nupr1</b>	<b>nuclear protein 1</b> Involucrada en la fase aguda de la inflamación, respuesta inmune, inducción de la apoptosis y regulación negativa de la progresión del ciclo celular.
<b>Usp18</b>	<b>ubiquitin specific peptidase 18</b> Codifica para una proteasa ubiquitina-específica, relacionada funcionalmente con ISG-15. Es un inhibidor de la respuesta de IFN-I

**Tabla 10. Genes alterados a 3h por efecto del SN-MφP, involucrados en procesos del sistema inmune.**

Por otro lado a las 12h de tratamiento con el SN-MφP, se encontraron 34 genes involucrados en la respuesta inmune, de los cuales 9 estaban sobre-expresados y 25 sub-expresados. Se identificaron genes que codifican para citocinas, proteínas de membrana como receptores, moléculas coestimuladoras y de adhesión, genes que participan en el procesamiento y presentación de antígenos a través de



---

---

moléculas del MHC clase I y II, genes asociados a respuesta antiviral, involucrados en vías de señalización y reparación de tejidos.

Las citocinas sobre-expresadas a 12h de tratamiento fueron la IL-6 e IFN $\gamma$ , mientras que las sub expresadas fueron IP-10 e IL-1 $\alpha$ , además de los receptores para citocinas IL1r1, IL1r2 e IL18rap. Otros genes que se sobre-expresaron a las 12h fueron Scara5 que es un receptor tipo scavenger, el gen F5, algunos que codifican para proteínas de membrana como Tram1, Clec4a1, el inhibidor de proteasas Pi16, el factor de transcripción Ddit3 y los genes Dner y Trp53inp. La participación de cada uno de estos genes en el proceso de regulación de la respuesta inmune esta descrita en la tabla 11.

Dentro de los genes sub-expresados, se encontraron los factores de transcripción STAT1 y STAT2. Los ISGs como Ifi30, Abcb1b, Calr, Igtp e Isg15, los genes Nos2 y Sod2, el gen Tnfsf10, genes que codifican para moléculas con actividad GTPasa como Gbp7 y MX2, así como los genes Rasgrp3 y Mapk3k8 que estan involucrados en la vía de señalización de las MAPK. Otros genes sub-expresados codifican para proteínas de superficie como Cd38, Cd5, Gpr56 y Sema4a, receptores tipo Toll como Tlr2 y Tlr3, los genes Ly75 y S100a10, genes involucrados en las vías de señalización, MAPK, NF $\kappa$ B, PI3K y de los factores de crecimiento, como los genes Tiam1, Nfkbia, Rasgrp3, Map3k8, Dner y Nlrp3. La participación de cada uno de estos genes en el proceso de regulación de la respuesta inmune esta descrita en la tabla 12.

PROCESOS DEL SISTEMA INMUNE	
Genes expresados a 12h por efecto del SN-MφP	
Gen	Función
SOBRE-EXPRESADOS	<p><b>Scara5</b></p> <p><b>scavenger receptor class A, member 5 (putative)</b>            Codifica para una glicoproteína integral de la membrana plasmática de la célula, que forma un complejo trimérico con función receptora. Media el transporte de iones, como iones metálicos, cationes y específicamente iones de hierro. Algunos de los mecanismos de transporte en los que está involucrado son endocitosis, transporte mediado por vesículas.</p>
	<p><b>F5</b></p> <p><b>coagulation factor V; similar to Murine coagulation factor V</b>            Regulador de la hemostasia. Codifica para un cofactor esencial de la cascada de coagulación de la sangre. F5 es el factor de coagulación V, funciona como un cofactor para activar la protrombina en trombina.</p>
	<p><b>Il6</b></p> <p><b>Interleukin 6</b>            Codifica para la interleucina 6. Tiene una amplia actividad durante la respuesta inmune, se produce en sitios de inflamación aguda y crónica, promoviendo la inflamación. Regula de manera positiva la vía de señalización MAPK. Promueve la activación y proliferación de leucocitos, de las células B y T y regula la respuesta tipo TH2. Está involucrada en estados de enfermedad asociados a inflamación.</p>
	<p><b>Clec4a1</b></p> <p><b>C-type lectin domain family 4, member a1</b>            Codifica para la proteína integral de membrana de la familia de las lectinas tipo C. Se une a carbohidratos, funcionan en procesos de adhesión celular, comunicación célula-célula, respuesta inmune e inflamación. Modulan la diferenciación y/o maduración de células dendríticas (DC). Participan en la vía de señalización de los receptores tipo NOD.</p>
	<p><b>Pi16</b></p> <p><b>peptidase inhibitor 16</b>            Inhibidor de la serín proteasa. Codifica para una proteína integral de membrana.</p>
	<p><b>Tarm1</b></p> <p><b>predicted gene 9904</b>            Codifica para un receptor de leucocitos que coestimula la liberación de citocinas pro-inflamatorias en neutrófilos y macrófagos.</p>
	<p><b>Ifnz</b></p> <p><b>interferon zeta</b>            Codifica para el interferón tipo zeta, un interferón de tipo I que participa en la respuesta antiviral. Se une al receptor para interferón de tipo I y está involucrado en la activación celular, muerte celular, diferenciación de linfocitos B y regulación del ciclo celular.</p>
	<p><b>Dner</b></p> <p><b>delta/notch-like EGF-related receptor</b>            Activador de la vía Notch. Participa en procesos de proteólisis.</p>
	<p><b>Trp53inp1</b></p> <p><b>transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1</b>            Función de ubiquitin-protein transferasa. Involucrada en la vía de presentación de antígenos vía MHC I</p>

Figura Tabla 11. Genes sobre-expresados a 12h por efecto del SN-MφP, involucrados en procesos del sistema inmune.

PROCESOS DEL SISTEMA INMUNE	
Genes expresados a 12h por efecto del SN-MφP	
Gen	Función
SUB-EXPRESADOS	<p><b>G protein-coupled receptor 56</b> Codifica para un receptor integral de la membrana acoplado a proteína G, involucrado en la regulación de la respuesta inmune y en la vía de señalización de neuropéptidos.</p>
	<p><b>chemokine (C-X-C motif) ligand 10</b> Codifica para la citocina IP10, con efecto pleiotrópico. Es reguladora positiva del proceso inflamatorio, induce la proliferación celular, regula la movilidad celular, estimula la activación y quimiotaxis de monocitos, migración de linfocitos, células T y modula la expresión de moléculas de adhesión.</p>
	<p><b>plasminogen activator, urokinase</b> Codifica para una serina proteasa, que contribuye a la activación de la enzima plasmina (conversión del plasminógeno en plasmina). Implicada en la degradación de la matriz celular y la migración celular.</p>
	<p><b>Guanylate Binding Protein 7</b> Proteína inducida por interferón, hidrolizan GTP a GDP y GMP. Promueve la defensa por especies reactivas de oxígeno.</p>
	<p><b>complement component 5a receptor 1</b> Componente del sistema del complemento C5a, estimula la quimiotaxis, liberación de gránulos de enzimas, de calcio intracelular y la producción de anión superóxido.</p>
	<p><b>NLR family, pyrin domain containing 3</b> Activador corriente arriba de la señalización de NFκB. Participa en la regulación de la inflamación, respuesta inmune y apoptosis. Activa caspasa 1.</p>
	<p><b>signal transducer and activator of transcription 2</b> Factor de transcripción, involucrado en la vía de señalización Jak/STAT, promueve la transcripción de genes estimulados por interferón y citocinas pro-inflamatorias.</p>
	<p><b>interleukin 1 alpha</b> Citocina pro-inflamatoria que participa en la respuesta inmune, procesos inflamatorios, hematopoyesis, producida principalmente por monocitos y macrófagos. Asociadas a respuestas de tipo TH1.</p>
	<p><b>interleukin 1 receptor-like 1</b> Codifica para el receptor tipo 1 de interleucina 1, inducido por estímulos pro-inflamatorios, su activación recluta MYD88, IRAK1, IRAK4 y TRAF6</p>
	<p><b>interleukin 1 receptor-like 2</b> Codifica para el receptor tipo 2 de interleucina 1</p>
	<p><b>interleukin 18 receptor accessory protein</b> Codifica para la subunidad accesoria del receptor heterodimérico para IL-18(citocina pro-inflamatoria), la unión con su ligando activa NFκB y JNK</p>
	<p><b>myxovirus (influenza virus) resistance 2</b> Involucrado en la respuesta antiviral, bloquea la síntesis del ARN</p>
	<p><b>plasminogen activator, urokinase receptor</b> Codifica para el receptor del activador de plasminógeno y promueve la formación de plasmina</p>
	<p><b>polo-like kinase 3 (Drosophila)</b> Codifica para una proteína cinasa involucrada en la regulación del ciclo celular.</p>

SUB-EXPRESADOS	<b>Slfn9</b>	<b>schlafen 9</b> Codifica para una proteína de unión a nucleótidos.
	<b>Tiam1</b>	<b>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</b> Codifica para un receptor de la membrana plasmática de tipo tirosina cinasa. Realiza la transducción de señales mediada por GTPasa. Involucrada en la vía de señalización FGFR y Ras. Modula la actividad de las proteínas Rho. Involucrada en la regulación positiva de la diferenciación celular.
	<b>S100a10</b>	<b>S100 calcium binding protein A10 (calpactin)</b> Codifica para una proteína miembro de la familia de las proteínas S100 que contiene dos motivos de unión a calcio. Localizadas en citoplasma y/o núcleo de muchos tipos de células. Participan en la regulación de la progresión del ciclo celular, la diferenciación celular y procesos de endocitosis y exocitosis.
	<b>Nfkbia</b>	<b>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</b> Codifica para un miembro de la familia de inhibidores de NFκB. Interactúa con dímeros del retículo endoplásmico liso (REL) para inhibir los complejos NFκB/REL. Induce la síntesis de ADN y la proliferación de macrófagos, involucrado en la vía de señalización MAPK y la vía de señalización CD40L. También induce la apoptosis a través de los receptores de muerte DR3 y DR4/5.
	<b>Ly75</b>	<b>lymphocyte antigen 75</b> Gen del antígeno de linfocitos 75, que codifica para una proteína integral de membrana, que se une a carbohidratos. Está involucrada en procesos de transporte mediado por vesículas, endocitosis e invaginación de antígenos. Se asocia a la enfermedad neumonía lipídica.
	<b>Cd38</b>	<b>CD38 antigen</b> Codifica para una proteína integral de membrana. Es una ectoenzima expresada en varias células y tejidos, especialmente en leucocitos. Funciona en la adhesión celular, la transducción de señales y la señalización de calcio, regula positivamente la proliferación celular de linfocitos B. Induce segundos mensajeros como NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y molécula cíclica de ADP-ribosa.
	<b>Abcb1b</b>	<b>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B</b> Codifica para una proteína de transporte de unión a ATP. Transportan varias moléculas extra e intracelulares a través de la membrana. Es un miembro de la subfamilia MDR/TAP involucrada en la resistencia a fármacos. Involucrada en el procesamiento de antígenos.
	<b>Stat1</b>	<b>signal transducer and activator of transcription 1</b> Codifica para el factor de transcripción STAT1. Se unen a las secuencias ISRE, promoviendo la transcripción de ISGs. Pueden ser activados por IFN-I, IFN-γ, EGF, PDGF e IL-6. STAT1 está involucrado en vía de señalización Jak/STAT, en la vía anti-inflamatoria de IL-10, en la de p38 MAPk, en la de PDGF, TPO y EGF.
	<b>Creb3l2</b>	<b>cAMP responsive element binding protein 3-like 2</b> Codifica para un factor de transcripción de la familia oasis bZIP. Se induce en la fase tardía en respuesta al estrés en ER, generado por la acumulación en ER de proteínas dañadas o mal plegadas y evita su acumulación, acelera el transporte de proteínas del ER al aparato de Golgi.

SUB-EXPRESADOS	<b>Map3k8</b>	<p><b>mitogen-activated protein kinase 8</b></p> <p>Codifica para una proteína que puede activar las vías de señalización MAPK/ERK y JNK. Induce la activación de NFκB y promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias.</p> <p><b>(semaphorin) 4A</b></p> <p>Codifica para una proteína integral de membrana de la familia de las semaforinas. Está expresada en células del sistema inmune, involucrada en la inmunomodulación, en señalización célula-célula, participa durante el reconocimiento antigénico por células T, promueve la diferenciación a un perfil Th1 y contribuye a la respuesta inmune innata. También, inhibe la angiogénesis.</p>
	<b>Sema4a</b>	<p><b>toll-like receptor 3</b></p> <p>Codifica para un receptor tipo Toll. Participa en el reconocimiento de patógenos y la activación de la respuesta inmune innata. Induce la activación de NFκB e IRF3 y en consecuencia la producción de citocinas pro-inflamatorias e IFN-I</p>
	<b>Tlr3</b>	<p><b>nitric oxide synthase 2, inducible</b></p> <p>Codifica para una enzima que cataliza la producción de óxido nítrico, se induce en respuesta a ciertas citocinas y a patógenos. El óxido nítrico es un radical libre con función antimicrobiana, participa en la respuesta inflamatoria y es producida por macrófagos. También participa en procesos tumorales.</p>
	<b>Nos2</b>	<p><b>superoxide dismutase 2, mitochondrial</b></p> <p>Es un miembro de la familia superóxido dismutasa hierro/magnesio. En células fagocíticas, sirve para la síntesis principalmente de especies reactivas de oxígeno. Produce peróxido de hidrógeno a partir del radical superóxido, que sirve como sustrato para oxidar compuestos y generar moléculas altamente tóxicas para los microorganismos.</p>
	<b>Sod2</b>	<p><b>interferon gamma inducible protein 30</b></p> <p>Expresada de manera constitutiva en células presentadoras de antígeno e inducida por interferón gamma en otros tipos de células. Codifica para una enzima que participa en el procesamiento de antígenos asociados a las moléculas de MHC clase II, cataliza la reducción de enlaces disulfuro de las proteínas.</p>
	<b>Ifi30</b>	<p><b>CD5 antigen</b></p> <p>Codifica para una molécula de superficie. Funciona como molécula coestimuladora en linfocitos T. Tiene dominios de los receptores tipo scavenger.</p>
	<b>Cd5</b>	<p><b>RAS, guanyl releasing protein 3</b></p> <p>Codifica para una proteína de la familia Ras, funciona en la transducción de señales. Está involucrada en la vía de señalización de MAPK.</p>
	<b>Rasgrp3</b>	<p><b>calreticulin</b></p> <p>Codifica para una proteína chaperona implicada en el ensamblaje de la molécula de MHC clase I y su asociación con el péptido antigénico.</p>
	<b>Calr</b>	<p><b>dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3</b></p> <p>Codifica para una proteína cinasa que cataliza la autofosforilación de residuos serina/treonina y tirosina. Participa en la regulación de varias vías de señalización en la célula.</p>
	<b>Dyrk3</b>	<p><b>ISG15 ubiquitin-like modifier</b></p> <p>Codifica para una proteína semejante a las ubiquitinas. Es inducida por IFN-I. Participa en la respuesta inmune antiviral. Forma parte del proceso de ISGylación. Cuando IRF3 es isoglinada inhibe su degradación. Induce la vía de señalización Jak/STAT.</p>
	<b>Isg15</b>	

<b>SUB-EXPRESADOS</b>	<b>Tlr2</b>	<b>toll-like receptor 2</b> Codifica para el receptor tipo Toll (TLR) 2, para el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata. Inicia cascadas de señalización que involucra a MyD88, Trap, Tam, PI3K y NFκB.
	<b>lgtp</b>	<b>interferon gamma induced GTPase</b> GTPasa inducida por interferón gamma
	<b>Tnfsf10</b>	<b>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</b> Codifica para una proteína de la familia de TNF que principalmente induce apoptosis a través de los receptores de muerte DR3 y DR4/5 en células tumorales. Se une a varios receptores de la familia TNF y activa la vía de señalización MAPK8/JNK, caspasa 8 y caspasa 3.
	<b>slfn2</b>	<b>schlafen 2</b> Codifica para una proteína que regula de manera negativa la proliferación celular.

**Tabla 12. Genes sub-expresados a 12h por efecto del SN-MφP, involucrados en procesos del sistema inmune.**

---

---

## IX. DISCUSIÓN

La persistencia viral es un estado de balance entre el virus y la célula infectada, que modifica algunas funciones celulares, tales como la respuesta inmune, de tal manera que el virus mantiene su genoma sin inducir la muerte de su hospedero (Oldstone, 2006). En el modelo de persistencia de HVSR en macrófagos murinos P388D1 establecido en el laboratorio, se ha encontrado previamente un aumento en la expresión de las citocinas pro-inflamatorias RANTES, IP-10, IL-6 (Figura 11) e IFN- $\beta$  (Figura 12) en el sobrenadante de M $\phi$ P (SN-M $\phi$ P). Asimismo, se ha observado que la respuesta frente al IFN- $\beta$  mediada por p-STAT1, se encuentra inhibida en M $\phi$ P (Rivera-Toledo, et al., 2015). Debido a esto, se planteó que el SN-M $\phi$ P puede estimular de manera parácrina a células no infectadas, por lo que este trabajo se centró en evaluar la alteración del perfil transcripcional en macrófagos no infectados (M $\phi$ N) debido al efecto del SN-M $\phi$ P. Con estos resultados se busca explorar de manera general los efectos indirectos de la infección persistente por el HVSR sobre células no infectadas, como parte de la patogénesis de la infección por este virus respiratorio.

El SN-M $\phi$ P utilizado en este trabajo se colectó a partir de cultivos de M $\phi$ P que mostraron más del 90% de células que expresaban proteínas del HVSR (Figura 15). De acuerdo con lo reportado anteriormente (Sarmiento, et al., 2002), este es un indicador de la persistencia viral. Además, se encontró la presencia de partículas virales infecciosas  $1-4 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL (Tabla 4) en el SN-M $\phi$ P que también se ha reportado antes (Sarmiento, et al., 2002), con lo que se verificó que las características del modelo de persistencia se conservan. El efecto de las partículas virales infecciosas presentes en el SN-M $\phi$ P para este trabajo, se descartó a través del pre-tratamiento de los SN-M $\phi$ P con radiación U.V. (Tabla 4). El tratamiento con radiación U.V. no dañó la actividad biológica del SN-M $\phi$ P ya que se conservó su capacidad para inducir la fosforilación de STAT1 (p-STAT1) en los M $\phi$ N (Figura 16). En cambio el SN-M $\phi$ N no tuvo efecto sobre la activación de STAT1 en los M $\phi$ N (Figura 17), lo que sugiere que todos los factores solubles secretados por los macrófagos infectados persistentemente activan la vía de

---

---

señalización Jak/STAT. La IL-6 y el IFN- $\beta$  que previamente hemos cuantificado en el sobrenadante podrían ser los inductores de esta respuesta, ya que se sabe que inducen la fosforilación de STAT1 (Haan, et al., 2005, Pertsovskaya, et al., 2013), además en nuestro laboratorio se ha reportado que en M $\phi$ N pre-tratados con anticuerpos anti-IFNAR (bloqueo del receptor para IFN-I) el SN-M $\phi$ P no induce la fosforilación de STAT1 en estos M $\phi$ N (Rivera-Toledo et al., 2015).

En la cinética de fosforilación de STAT1 (Figura 16), se detectó la proteína desde de los 30 minutos de estímulo y hasta las 12 h, lo que indica la estimulación de la vía Jak/STAT, desde tiempos muy tempranos del tratamiento. A las 2h, se observó un máximo de fosforilación de STAT1 que decreció gradualmente a partir de las 4h y hasta las 12h, lo que sugiere que la máxima actividad de STAT1 como factor de transcripción para inducir la expresión de transcritos podría ser a las 3h y su disminución a las 12h. Una actividad similar de STAT1 a la propuesta, se ha reportado en macrófagos RAW, con el aumento de la expresión del transcrito IRF1 (ISG) entre las 2 y 4h y un decremento gradual después de las 4 h, en respuesta al IFN- $\beta$  (Pertsovskaya, et al., 2013). Por otro lado, se ha reportado que la IL-6 puede afectar el perfil transcripcional de células primarias mieloides después de 6 y 12 h de tratamiento (Mauer, et al., 2014). De acuerdo con los resultados obtenidos de la cinética de p-STAT1 y lo reportado en la literatura, consideramos 3 y 12h de estímulo con el SN-M $\phi$ P como el tiempo adecuado para evaluar el perfil transcripcional de los M $\phi$ N.

Los resultados obtenidos del análisis transcripcional a las 3 h de estímulo con SN-M $\phi$ P mostraron una mayor cantidad de genes sobre-expresados (19 genes) y solo uno sub-expresado (Tabla 7 y Figura 19), mientras que a las 12h se encontraron más genes sub-expresados (161 genes) que sobre-expresados (49 genes) (Figura 20 y 21). Este resultado se correlaciona con la actividad transcripcional esperada de p-STAT1, de acuerdo con la cinética de fosforilación de STAT1 (Figura 16). La abundancia de los genes sub-expresados a las 12h puede deberse a que después de la activación de las células a tiempos tempranos ante los estímulos del SN-M $\phi$ P, que pudo estar mediada principalmente por IFN-I, las



---

---

células activaron diferentes mecanismos de regulación negativa para limitar la respuesta al SN-M $\phi$ P y regresar a su homeostasis.

A fin de encontrar un sentido biológico a los genes obtenidos, se empleó la base de datos Gene Ontology para agruparlos en categorías funcionales. La cual hace asociaciones con los genes anotados en esta base de datos, que están sustentados en una gran cantidad de trabajos científicos en los que se han estudiado sus funciones biológicas. Se encontró que a las 3 y 12 h, la mayor cantidad de genes fueron asociados a PB celulares y metabólicos (Figura 21 y 22), donde se clasifican aquellos genes que regulan el funcionamiento celular de manera general, es decir todas las enzimas, factores de transcripción, receptores de membrana, componentes de membrana como la tubulina y otros. A las 3h los genes activados están principalmente involucrados en la regulación del sistema inmune y respuesta a estímulos (Figura 21). Por otro lado, a las 12h los genes sobre-expresados se asociaron principalmente a PB de regulación biológica, procesos del sistema inmune, disminución de la apoptosis (Figura 22) y disminución de la actividad catalítica (Figura 23). Los genes que se “apagaron” a las 12h, estaban principalmente relacionados con actividades catalíticas, entre los que se encontraron genes que codifican para cinasas, genes con FM de actividad de receptor (Figura 23), regulación de la respuesta inmune, regulación biológica, y respuesta a estímulos (Figura 22).

Al hacer una agrupación más específica de los genes involucrados en funciones apoptóticas, ciclo celular y respuesta inmune, se encontró lo siguiente.

En apoptosis, a las 3h (Tabla 8), solo se encontró sobre-expresado el gen Nupr1, que codifica para una proteína inducida por estrés, que inhibe la apoptosis. Se ha descrito que Nupr1 se asocia con gran estabilidad a ProT $\alpha$  que también limita la apoptosis y la ausencia de la expresión de ambos genes conduce a la activación de la caspasas y la formación de núcleos apoptóticos (Malicet, et al., 2006). Se ha documentado que Nupr1, se induce ante LPS (Jiang et al., 1999), un estímulo muy potente y muy estudiado para la activación de la inflamación. La inflamación es un mecanismo que sucede en varias etapas y en etapas tempranas la inhibición de la

---

---

apoptosis puede ser importante para mantener los mecanismos efectores de las células y contribuir a la eliminación de patógenos.

A las 12 h (Tabla 8) los genes sobre-expresados, tienen efectos pro-apoptóticos por Trp53inp1, y anti-apoptóticos por IL-6. Ambos genes se han visto inducidos en respuesta a estímulos tóxicos para las células (Altun, et al., 2014). Sin embargo parece que Trp53inp1 tiene un papel importante de inhibir el desarrollo de tumores, ya que ratones deficientes de este gen se ha observado el aumento de la cantidad de tumores (Gommeaux, et al., 2007), mientras que IL-6 se conoce por su participación en el desarrollo de tumores. Los genes sub expresados a las 12h son principalmente pro apoptóticos como casp 6, Nfkbia, P4hb, Tnfsf10 y Jmjd6 que es un gen implicado en la remoción de células apoptóticas.

Pocos genes asociados al ciclo celular se vieron modificados por efecto del SN-M $\phi$ P (Tabla 9). A las 3h (Tabla 9) se sobre-expresó Sesn2, un gen que arresta el ciclo celular y que se induce en respuesta a varios tipos de estrés. Se ha reportado que inhibe la señal pro inflamatoria como citocinas y ROS inducida por LPS en macrófagos RAW a través de la inhibición de p38/MAPK, por lo que se propone como un protector celular de la reacción inflamatoria (Yang, et al., 2015). A las 12h (Tabla 9) se sobre-expresó Trp53inp1 que arresta el ciclo celular e inhibe apoptosis, mientras que los genes sub-expresados a las 12h fueron Ccnd3 que promueve la progresión del ciclo celular G1/S y Gmnn que inhibe la replicación de ADN.

La respuesta inmune fue una de las funciones que más se vió modificada por efecto del SN-M $\phi$ P, con 44 genes asociados en total (Tabla 10, 11 y 12). Se identificó que tanto a las 3h como a las 12h, la gran mayoría de ellos, son genes estimulados por interferón (ISGs), por lo que el IFN- $\beta$  del sobrenadante pudiera tener el mayor efecto sobre la regulación de la respuesta inmune. La sobre-expresión de ISGs a las 3 y la sub-expresión de este tipo de genes a las 12h, correlaciona con la cinética de fosforilación de STAT1 debida al SN-M $\phi$ P (figura 16). Varias investigaciones han reportado la importancia de STAT1 en respuesta al INF $\beta$  y la expresión de ISGs (De Veer, et al., 2001). También muchos genes

---

---

agrupados en la respuesta inmune a las 3 y 12h, se han reportado en macrófagos alveolares infectados de manera aguda con HVSR (Ravi et al., 2013).

A las 3h se sobre-expresó Stat2 (Tabla 10), un factor de transcripción que se asocia con Stat1, lo que se relaciona con la expresión génica de varios ISGs a 3h como Igtp, Oas3, Mx2, ifnz Usp18 y Sifn4. Los genes Igtp, Oas3 y Mx2 tienen principalmente actividad antiviral y se han reportado en M $\phi$  de pulmón infectados con HVSR (Ravi et al., 2013). También se sobre-expresó el gen Sifn4 (Tabla 10), que es inducido en respuesta a agonistas de los receptores tipo Toll y en respuesta a IFN-I mediante la vía STAT y MAPK (Mavrommatis, et al., 2013), también tiene funciones antivirales e inhibe la proliferación celular. El gen Nupr1 (Tabla 10) también se sobre-expresó a las 3h que induce apoptosis e inhibe la proliferación celular. Otros genes sobre-expresados fueron el receptor para citocinas Ccr12 y Cd274 (Tabla 10) que funcionan para transducir señales coestimuladoras para la activación celular. La estimulación de los genes antivirales, a pesar de que no hay infección viral en M $\phi$ N (ya que el SN-M $\phi$ P se trató con radiación U.V., tabla 4), puede deberse a que el sobrenadante proviene de células infectadas y al efecto del IFN- $\beta$ , ya que en distintos tipos de células tratadas con IFN- $\beta$  se ha reportado la inducción de los genes antivirales de la familia Oas y Mx2 (De Veer, et al., 2001).

También el gen Usp18 se sobre-expresó a las 3h (tabla 10), el cual es inducido por IFN y participa como regulador negativo de la respuesta de IFN, ya que limita la actividad de las cinasas Jak y la vía de señalización de NF $\kappa$ B en macrófagos humanos (Yang, et al., 2015). Otro gen sobre-expresado a las 3h que inhibe la señal pro-inflamatoria como la producción de citocinas y ROS a través de p38/MAPK, es Sesn2 (Yang, et al., 2015). Probablemente, estos genes se induzcan para limitar estas vías en tiempos posteriores de la respuesta al estímulo.

A las 12h, muchos más genes que activan la respuesta inmune se sub-expresaron, lo que puede deberse al control de la respuesta inmune ante los estímulos del SN-M $\phi$ P por mecanismos de regulación negativa.

---

---

Dentro de los genes-sub expresados a las 12h (Tabla 12), se encontraron Stat1 y Stat2, que son activados en respuesta a IFN-I, y por la tanto se identificaron varios ISGs entre los que se incluyen Ifi30, Abcb1b y Calr que participan en el procesamiento y presentación de antígenos, los genes Nos2 y Sod2 que participan en los mecanismos oxidativos de muerte, Tnfsf10 que induce apoptosis, genes que codifican para moléculas con actividad GTPasa como Gbp7 y MX2 que tiene actividad antiviral, los genes Rasgrp3 y Mapk3k8 involucrados en la vía de señalización de las MAPK, además de Igtp e Isg15 que también son ISGs. Otros genes sub expresados, codifican para proteínas de superficie como Cd38, Cd5, Gpr56 y Sema4a (promueve una respuesta Th1), también, genes que codifican para receptores tipo Toll como Tlr2 y Tlr3, los genes Ly75 y S100a10 que participan en el transporte mediado por vesículas y genes involucrados en las vías de señalización de MAPK, NFκB, PI3K o de los factores de crecimiento VEGF y FGF como Tiam1, Nfkbia, Rasgrp3, Map3k8, Dner y Nlrp3. El gen C5ar1, que codifica para un receptor de una proteína del complemento C5a, la cual se ha visto inducida en macrófagos tratados con RANTES (Locati, et al., 2002). Las citocinas sub-expresadas a las 12h fueron las pro-inflamatorias IP-10 e IL-1α, y los receptores para citocinas pro-inflamatorias IL1rl1, IL1rl2 e IL18rap (Tabla 12).

Entre los genes sobre-expresados a las 12h (Tabla 11) se encontró Tarm1, un receptor de leucocitos que se ha visto inducido 24h después del estímulo con LPS y su estimulación induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 (Radjabova, 2015). También IL-6 se sobre-expresó a las 12h (Tabla 11), que es una citocina pro-inflamatoria implicada en la transducción de señales vía MAPK, PI3K que activa NFκB y la vía Jak/STAT que activa STAT3. Entre sus funciones bloquea la apoptosis, induce la respuesta inflamatoria y polarización de macrófagos a un fenotipo M1, promueve la síntesis de IL-6 y modula la proliferación celular (Hodge, et al., 2005, Hirano, et al., 2000, Bromberg, et al., 2009). Se ha visto implicada un muchas enfermedades inflamatorias crónicas, entre las que se incluyen enfermedades de las vías respiratorias como asma y COPD, en los que se han encontrado niveles elevados de esta citocina en suero,

---

---

lavados broncoalveolares, esputo de pacientes con estos padecimientos (Rincon, et al., 2012).

Otro gen que, se sobre-expresó a las 12h fue Scara5 (Tabla 11) que es un receptor tipo scavenger expresado de manera ubicua en macrófagos e inducido en macrófagos activados, participa en el reconocimiento de PAMP's como dsRNA y agonistas de TLRs. Este receptor, activa las vías de señalización PLC (fosfolipasa C) y PI3K para inducir citocinas pro-inflamatorias (Limmon, et al., 2008).

También el ifnz se sobre-expresó a las 12h (Tabla 11), el cual es un interferón de tipo I que se expresa en ratones. El gen Usp18, que codifica para un regulador negativo de Jak y NFκB que a las 3h estaba sobre-expresado, a las 12h se reguló de manera negativa.

Como se mostró en este estudio, la expresión de genes es transitoria y caracterizada por distintas fases de inducción e inhibición. De acuerdo con los datos obtenidos, el conjunto de moléculas presentes en el SN-MφP modificaron la expresión de genes en MφN. El fenotipo de los MφN inducido después de las 3h de estímulo con el SN-MφP podría considerarse como M1, mediador de una respuesta inflamatoria. En tanto, aunque a las 12h se observó una disminución importante en la expresión de genes como un posible mecanismo de recuperación de la homeostasis, los MφN aún fueron capaces de responder al SN-MφP y mantener la expresión de genes con actividad pro-inflamatoria.

La asociación entre el desarrollo a largo plazo de enfermedades respiratorias crónicas como asma y la posible persistencia del HVSR se ha observado con frecuencia. No obstante, la persistencia de este virus no se ha comprobado en humanos. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden sugerir un mecanismo de patogénesis relacionado con las consecuencias directas e indirectas de la infección persistente del HVSR, relacionado con la expresión crónica de moléculas que favorecen un proceso inflamatorio. La persistencia de estímulos pro-inflamatorios y su relación con el desarrollo de enfermedades respiratorias

---

---

crónicas, en individuos totalmente recuperados después de la infección por HVSR ya ha sido propuesta con anterioridad (Bermejo-Martin, et al., 2007).

---

---

## X. CONCLUSIONES

- El SN-M $\phi$ P modifica el estado de activación de los M $\phi$ N, ya que induce la fosforilación del factor de transcripción STAT1.
- El SN-M $\phi$ P altera el perfil transcripcional de los M $\phi$ N, e induce la expresión de diversos genes, entre los que destacan genes con actividad pro-inflamatoria.

---

---

## XI. REFERENCIAS

Appay, V., & Rowland-Jones, S. L. (2001). RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends in immunology*, 22(2), 83-87.

Ashburner et al. Gene ontology: tool for the unification of biology (2000) *Nat Genet* 25(1):25-9.

Altun, Z., Olgun, Y., Ercetin, P., Aktas, S., Kirkim, G., Serbetcioglu, B., & Guneri, E. A. (2014). Protective effect of acetyl-L-carnitine against cisplatin ototoxicity: role of apoptosis-related genes and pro-inflammatory cytokines. *Cell proliferation*, 47(1), 72-80.

Bangham, C. R., & McMichael, A. J. (1986). Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(23), 9183-9187.

Barik, S. (2013). Respiratory syncytial virus mechanisms to interfere with type 1 interferons. In *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines*. Springer Berlin Heidelberg, 173-191

Barnes, P. J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(3), 183-192.

Bentzen, E. L., House, F., Utley, T. J., Crowe, J. E., & Wright, D. W. (2005). Progression of respiratory syncytial virus infection monitored by fluorescent quantum dot probes. *Nano letters*, 5(4), 591-595

Bermejo-Martin, J. F., Garcia-Arevalo, M. C., Alonso, A., De Lejarazu, R. O., Pino, M., Resino, S., & Arranz, E. (2007). Persistence of proinflammatory response after severe respiratory syncytial virus disease in children. *Journal of allergy and clinical immunology*, 119(6), 1547-1550.

Bhakta, N. R., Nerella, S., Pollack, J. L., Barbeau, R. A., Barczak, A. J., Solberg, O. D., & Christenson, P. G. S. A. (2015). Rna-Sequencing Of Airway Epithelial



---

---

Brushings Identifies Interferon-Driven Gene Expression Changes In Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 191, A3626.

Bischoff, S. C., Krieger, M., Brunner, T., Rot, A., Tscherner, V. V., Baggiolini, M., & Dahinden, C. A. (1993). RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *European journal of immunology*, 23(3), 761-767.

Bloom-Feshbach, K., Alonso, W. J., Charu, V., Tamerius, J., Simonsen, L., Miller, M. A., & Viboud, C. (2013). Latitudinal variations in seasonal activity of influenza and respiratory syncytial virus (RSV): a global comparative review. *PloS one*, 8(2), e54445.

Bramley, A. M., Vitalis, T. Z., Wiggs, B. R., & Hegele, R. G. (1999). Effects of respiratory syncytial virus persistence on airway responsiveness and inflammation in guinea-pigs. *European Respiratory Journal*, 14(5), 1061-1067.

Breuer et al., InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond - recent updates and continuing curation. *Nucl. Acids Res.* (2013) 41 (D1).

Cane, P. (2006). *Respiratory syncytial virus* (Vol. 14). Elsevier.

Bromberg, J., & Wang, T. C. (2009). Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer cell*, 15(2), 79-80.

Capobianchi, M. R., Uleri, E., Caglioti, C., & Dolei, A. (2015). Type I IFN family members: Similarity, differences and interaction. *Cytokine & growth factor reviews*, 26(2), 103-111.

Castagné, N., Barbier, A., Bernard, J., Rezaei, H., Huet, J. C., Henry, C., & Eléouët, J. F. (2004). Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *Journal of general virology*, 85(6), 1643-1653.

---

---

Collins, P. L. and J.E.J. Crowe, Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, In Fields Virology, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors 6th ed. 2013 Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA. p. 1087-1123

Collins, P. L., Huang, Y. T., & Wertz, G. W. (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(24), 7683-7687.

Correa, M. D., & López, M. R. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, 26(2), 73-86.

Cubie, H. A., Duncan, L. A., Marshall, L. A., & Smith, N. M. (1997). Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants. *Pediatric Pathology & Laboratory Medicine*, 17(6), 927-938.

Curran, J., Marq, J. B., & Kolakofsky, D. (1995). An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *Journal of virology*, 69(2), 849-855.

Da Silva, J., Henket, M., Moermans, C., Corhay, J. L., Edwards, M., Johnston, S. L., & Hilzendeger, C. (2015). Expression Of Interferons And Interferon-Stimulated Genes In Peripheral-Blood Neutrophils From COPD Patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 191, A2729.

De Veer, M. J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J. M., & Williams, B. R. (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *Journal of leukocyte biology*, 69(6), 912-920.

SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de la Infancia en México 2010. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P\\_EPI\\_DE\\_LA\\_INFANCIA\\_EN\\_MEXICO\\_2010.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DE_LA_INFANCIA_EN_MEXICO_2010.pdf) (consultado el 4 de diciembre del 2014)

---

---

Fearns, R., Peeples, M. E., & Collins, P. L. (1997). Increased expression of the N protein of respiratory syncytial virus stimulates minigenome replication but does not alter the balance between the synthesis of mRNA and antigenome. *Virology*, 236(1), 188-201.

Fearns, R., Peeples, M. E., & Collins, P. L. (2002). Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus. *Journal of virology*, 76(4), 1663-1672.

Feldman, S. A., Hendry, R. M., & Beeler, J. A. (1999). Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *Journal of virology*, 73(8), 6610-6617.

Fensterl, V., & Sen, G. C. (2009). Interferons and viral infections. *Biofactors*, 35(1), 14-20.

Gaona, J., Santiago-Olivares, C., Ortega, E., & Gómez, B. (2014). Respiratory Syncytial Virus Persistence in Macrophages Upregulates Fcγ Receptors Expression. *Viruses*, 6(2), 624-639.

Ghildyal, R., Mills, J., Murray, M., Vardaxis, N., & Meanger, J. (2002). Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *Journal of General Virology*, 83(4), 753-757.

Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L., & Kasel, J. A. (1986). Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *American journal of diseases of children*, 140(6), 543-546.

Gommeaux, J., Cano, C., Garcia, S., Gironella, M., Pietri, S., Culcasi, M., & Carrier, A. (2007). Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Molecular and cellular biology*, 27(6), 2215-2228.

González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., & Raz, E. (2012). Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 125-135.

---

---

Goritzka, M., Durant, LR, Pereira, C., Salek-Ardakani, S., Openshaw, PJM, y Johansson, C. (2014). Alfa / beta interferón receptor de señalización Amplifica Temprano citoquinas proinflamatorias Producción en el pulmón durante respiratorio sincitial infección por el virus. *Journal of Virology*, 88 (11), 6128-6136.

Griffiths, P., Baraniak, I., & Reeves, M. (2015). The pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of pathology*, 235(2), 288-297.

Guerrero-Plata, A., Ortega, E., & Gomez, B. (2001). Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral immunology*, 14(1), 19-30.

Haan, S., Keller, J. F., Behrmann, I., Heinrich, P. C., & Haan, C. (2005). Multiple reasons for an inefficient STAT1 response upon IL-6-type cytokine stimulation. *Cellular signalling*, 17(12), 1542-1550.

Herranz, C., Melero, J. A., & Martínez, I. (2011). Reduced innate immune response, apoptosis, and virus release in cells cured of respiratory syncytial virus persistent infection. *Virology*, 410(1), 56-63.

Hirano, T., Ishihara, K., & Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 19(21), 2548-2556.

Hobson, L., & Everard, M. L. (2008). Persistent of respiratory syncytial virus in human dendritic cells and influence of nitric oxide. *Clinical & Experimental Immunology*, 151(2), 359-366.

Hodge, D. R., Hurt, E. M., & Farrar, W. L. (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European journal of cancer*, 41(16), 2502-2512.

lañez, E. (1999). Curso de Inmunología General: 14. Citoquinas. Recuperado el 8 de octubre del 2015 de [https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap\\_14.htm](https://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_14.htm).

Isaia, G., Teodosiu, O., Popescu, G., Athanasiu, P., Sternberg, I., & Dumitriu, Z. (1984). Persistence of viruses in the nasopharynx of apparently healthy children

---

---

aged 0-5 years. Results of investigations performed in 1982-83. *Virologie*, 36(3), 175-179.

Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 36-49.

Jafri, H. S., Chávez-Bueno, S., Mejías, A., Gómez, A. M., Ríos, A. M., Nassi, S. S., & Ramilo, O. (2004). Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 189(10), 1856-1865.

Jiang, Y. F., Vaccaro, M. I., Fiedler, F., Calvo, E. L., & Iovanna, J. L. (1999). Lipopolysaccharides induce p8 mRNA expression in vivo and in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 260(3), 686-690.

Jiménez, M. L., García, M. V., & Mallorquín, P. (2002). Microarrays y biochips de ADN: informe de vigilancia tecnológica.

Korppi, M.; Piippo-Savolainen, E.; Korhonen, K.; Remes, S. Respiratory morbidity 20 years after RSV infection in infancy. *Pediatr Pulmonol*, 2004, 38, 155-160.

Langer, J. A. (2007). Interferon at 50: new molecules, new potential, new (and old) questions. *Science Signaling*, 2007(405), pe53-pe53.

Lay, M. K., González, P. A., León, M. A., Céspedes, P. F., Bueno, S. M., Riedel, C. A., & Kalergis, A. M. (2013). Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes and Infection*, 15(3), 230-242.

Lee, N., Lui, G. C. Y., Wong, K. T., Li, T. C. M., Tse, E. C. M., Chan, J. Y. C., & Chan, P. K. S. (2013). High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. *Clinical infectious diseases*, 57(8), 1069-1077.

---

---

Liu, M., Guo, S., Hibbert, J. M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N. O., & Stiles, J. K. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(3), 121-130.

Limmon, G. V., Arredouani, M., McCann, K. L., Minor, R. A. C., Kobzik, L., & Imani, F. (2008). Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA. *The FASEB Journal*, 22(1), 159-167.

Locati, M., Deuschle, U., Massardi, M. L., Martinez, F. O., Sironi, M., Sozzani, S., & Mantovani, A. (2002). Analysis of the gene expression profile activated by the CC chemokine ligand 5/RANTES and by lipopolysaccharide in human monocytes. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3557-3562.

Ludwig, 2012 Jak/Stat Signaling Pathway Recuperado el 3 de junio del 2015, de <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-il6>.

Luque, J., & Herráez, A. (2001). Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la salud.

Maillard, L., Saito, N., Hlawaty, H., Friand, V., Suffee, N., Chmilewsky, F., & Charnaux, N. (2014). RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC $\alpha$  signaling pathway. *Biology open*, BIO20148227.

Malicet, C., Giroux, V., Vasseur, S., Dagorn, J. C., Neira, J. L., & Iovanna, J. L. (2006). Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin  $\alpha$  complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2671-2676.

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*, 6.

Martínez, I., Lombardía, L., Herranz, C., García-Barreno, B., Domínguez, O., & Melero, J. A. (2009). Cultures of HEP-2 cells persistently infected by human respiratory syncytial virus differ in chemokine expression and resistance to

---

---

apoptosis as compared to lytic infections of the same cell type. *Virology*, 388(1), 31-41.

Marty, A., Meanger, J., Mills, J., Shields, B., & Ghildyal, R. (2003). Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. *Archives of virology*, 149(1), 199-210.

Mauer, J., Chaurasia, B., Goldau, J., Vogt, M. C., Ruud, J., Nguyen, K. D., & Brünig, J. C. (2014). Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nature immunology*, 15(5), 423-430.

Mauer, J., Denson, J. L., & Brünig, J. C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in immunology*, 36(2), 92-101.

Mavrommatis, E., Fish, E. N., & Plataniias, L. C. (2013). The schlafen family of proteins and their regulation by interferons. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 33(4), 206-210.

McNamara, P. S., Flanagan, B. F., Hart, C. A., & Smyth, R. L. (2005). Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of Infectious Diseases*, 191(8), 1225-1232.

Mejías, A., Chávez-Bueno, S., Gómez, A. M., Somers, C., Estripeaut, D., Torres, J. P., & Ramilo, O. (2008). Respiratory syncytial virus persistence: evidence in the mouse model. *The Pediatric infectious disease journal*, 27(10), S60-S62.

Mejias, A., & Ramilo, O. (2002). Asma y virus respiratorio sincitial: ¿mito o realidad?. In *Anales de Pediatría*, 57(3), 199-204

Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical science*, 122(4), 143-159.

---

---

Miller, A. L., Bowlin, T. L., & Lukacs, N. W. (2004). Respiratory syncytial virus-induced chemokine production: linking viral replication to chemokine production in vitro and in vivo. *Journal of Infectious Diseases*, 189(8), 1419-1430.

Mills, B. G., Singer, F. R., Weiner, L. P., & Holst, P. A. (1981). Immunohistological demonstration of respiratory syncytial virus antigens in Paget disease of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(2), 1209-1213.

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology*, 8(12), 958-969.

Murray, P. J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *The Journal of Immunology*, 178(5), 2623-2629.

Nair, H., Nokes, D. J., Gessner, B. D., Dherani, M., Madhi, S. A., Singleton, R. J., & Campbell, H. (2010). Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 375(9725), 1545-1555.

Nakamura-Lopez, Y., Villegas-Sepúlveda, N., & Gómez, B. (2015). RSV P-protein impairs extrinsic apoptosis pathway in a macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus. *Virus research*, 204, 82-87.

Nature Protocols 2009; 4(1):44 & *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(1):1 DAVID DATABASE.

O'Brien, A. D., Standiford, T. J., Christensen, P. J., Wilcoxon, S. E., & Paine, R. (1998). Chemotaxis of alveolar macrophages in response to signals derived from alveolar epithelial cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 131(5), 417-424.

Oldstone, M. B. (2006). Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology*, 344(1), 111-118.

Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.



---

---

Olszewska-Pazdrak, B., Casola, A., Saito, T., Alam, R., Crowe, S. E., Mei, F., & Garofalo, R. P. (1998). Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1 $\alpha$  by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *Journal of virology*, 72(6), 4756-4764.

Pérez-Yarza, E. G., Moreno, A., Lázaro, P., Mejías, A., & Ramilo, O. (2007). The association between respiratory syncytial virus infection and the development of childhood asthma: a systematic review of the literature. *The Pediatric infectious disease journal*, 26(8), 733-739.

Pertsovskaya, I., Abad, E., Domedel-Puig, N., Garcia-Ojalvo, J., & Villoslada, P. (2013). Transient oscillatory dynamics of interferon beta signaling in macrophages. *BMC systems biology*, 7(1), 59.

P'ringale, C. R., Shirodaria, P. V., Cash, P., Chiswell, D. J., & Malloy, P. (1978). Initiation and maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus. *Journal of virology*, 28(1), 199-211.

Radjabova, V., Mastroeni, P., Skjødt, K., Zacccone, P., de Bono, B., Goodall, J. C., & Barrow, A. D. (2015). TARM1 Is a Novel Leukocyte Receptor Complex–Encoded ITAM Receptor That Costimulates Proinflammatory Cytokine Secretion by Macrophages and Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 195(7), 3149-3159.

Ravi, L. I., Li, L., Sutejo, R., Chen, H., San Wong, P., Tan, B. H., & Sugrue, R. J. (2013). A systems-based approach to analyse the host response in murine lung macrophages challenged with respiratory syncytial virus. *BMC genomics*, 14(1), 190.

Reina, J., & López, C. (2013). Infecciones respiratorias causadas por el virus respiratorio sincitial en la población adulta: descripción de 16 casos. *Medicina Clínica*, 141(4), 163-166.

Rincon, M., & Irvin, C. G. (2012). Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *International journal of biological sciences*, 8(9), 1281.

---

---

Rivera-Toledo, E., Torres-González, L., & Gómez, B. (2015). Respiratory Syncytial Virus Persistence in Murine Macrophages Impairs IFN- $\beta$  Response but Not Synthesis. *Viruses*, 7(10), 5361-5374.

Rodríguez-Auad, J. P., Nava-Frías, M., Casasola-Flores, J., Johnson, K. M., Nava-Ruiz, A., Pérez-Robles, V., & Caniza, M. A. (2012). The epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in children at a public pediatric referral hospital in Mexico. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(7), e508-e513.

Rodríguez, L., Cuesta, I., Asenjo, A., & Villanueva, N. (2004). Human respiratory syncytial virus matrix protein is an RNA-binding protein: binding properties, location and identity of the RNA contact residues. *Journal of general virology*, 85(3), 709-719.

Sang, Y., Miller, L., & Blecha, F. (2015). Macrophage polarization in virus-host interactions. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 6(2).

Sarmiento, R. E., Tirado, R., & Gómez, B. (2002). Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. *Virus research*, 84(1), 45-58

Satake, M., Coligan, J. E., Elango, N., Norrby, E., & Venkatesan, S. (1985). Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure. *Nucleic acids research*, 13(21), 7795-7812

Schlender, J., Zimmer, G., Herrler, G., & Conzelmann, K. K. (2003). Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *Journal of virology*, 77(8), 4609-4616.

Sheeran, P., Jafri, H., Carubelli, C., Saavedra, J., Johnson, C., Krisher, K., & Ramilo, O. (1999). Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *The Pediatric infectious disease journal*, 18(2), 115-122

---

---

Sigurs, N., Aljassim, F., Kjellman, B., Robinson, P. D., Sigurbergsson, F., Bjarnason, R., & Gustafsson, P. M. (2010). Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*, 65(12), 1045-1052.

Sikkel, M. B., Quint, J. K., Mallia, P., Wedzicha, J. A., & Johnston, S. L. (2008). Respiratory syncytial virus persistence in chronic obstructive pulmonary disease. *The Pediatric infectious disease journal*, 27(10), S63-S70.

Spann, K. M., Tran, K. C., Chi, B., Rabin, R. L., & Collins, P. L. (2004). Suppression of the induction of alpha, beta, and gamma interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *Journal of virology*, 78(8), 4363-4369.

Teng, M. N., Whitehead, S. S., & Collins, P. L. (2001). Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology*, 289(2), 283-296.

Tekkanat, K. K., Maassab, H., Miller, A., Berlin, A. A., Kunkel, S. L., & Lukacs, N. W. (2002). RANTES (CCL5) production during primary respiratory syncytial virus infection exacerbates airway disease. *European journal of immunology*, 32(11), 3276-3284.

Tripp, R. A., Oshansky, C., & Alvarez, R. (2005). Cytokines and respiratory syncytial virus infection. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(2), 147-149.

Valle Mendiola, A., & Soto Cruz, I. (2005). Vía Jak-stat: una visión general. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 8(1-2).

Verweij, M. C., Horst, D., Griffin, B. D., Luteijn, R. D., Davison, A. J., Rensing, M. E., & Wiertz, E. J. (2015). Viral Inhibition of the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP): A Striking Example of Functional Convergent Evolution.

---

---

Wilkinson, T. M., Donaldson, G. C., Johnston, S. L., Openshaw, P. J., & Wedzicha, J. A. (2006). Respiratory syncytial virus, airway inflammation, and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 173(8), 871-876.

Wright, P. F., & Cutts, F. T. (2000). Generic protocol to examine the incidence of lower respiratory infection due to respiratory syncytial virus in children less than five years of age: field test version

Yang, J. H., Kim, K. M., Kim, M. G., Seo, K. H., Han, J. Y., Ka, S. O., & Ki, S. H. (2015). Role of sestrin2 in the regulation of proinflammatory signaling in macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 78, 156-167.

Yang, Z., Xian, H., Hu, J., Tian, S., Qin, Y., Wang, R. F., & Cui, J. (2015). USP18 negatively regulates NF- $\kappa$ B signaling by targeting TAK1 and NEMO for deubiquitination through distinct mechanisms. *Scientific reports*, 5.

Zeng, R., Li, C., Li, N., Wei, L., & Cui, Y. (2011). The role of cytokines and chemokines in severe respiratory syncytial virus infection and subsequent asthma. *Cytokine*, 53(1), 1-7.

Zheng, J., Yang, P., Tang, Y., & Zhao, D. (2015). A respiratory syncytial virus persistent-infected cell line system reveals the involvement of SOCS1 in the innate antiviral response. *Virologica Sinica*, 30(3), 190-199.

Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J., & Kroemer, G. (2015). Type I interferons in anticancer immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(7), 405-414.

---

---

## XI. ANEXOS

### AI. Símbolo y nombre de los genes expresados en el análisis por microarreglo.

Símbolo del gen	Nombre del gen
<b>1110032A03Rik</b>	RIKEN cDNA 1110032A03 gene; hypothetical protein LOC100048251
<b>1190002N15Rik</b>	hypothetical protein LOC100044725; RIKEN cDNA 1190002N15 gene
<b>1500002C15Rik</b>	RIKEN cDNA 1500002C15 gene
<b>1700001F09Rik</b>	predicted gene 3573; predicted gene 3543; predicted gene, ENSMUSG00000072605; cDNA sequence BC061237; RIKEN cDNA 1700001F09 gene; predicted gene 3676; predicted gene 4181; predicted gene 3486; hypothetical protein LOC100042130
<b>1700067K01Rik</b>	RIKEN cDNA 1700067K01 gene
<b>2010016I18Rik</b>	RIKEN cDNA 2010016I18 gene
<b>2610015P09Rik</b>	RIKEN cDNA 2610015P09 gene
<b>2610209C05Rik</b>	RIKEN cDNA 2610209C05 gene
<b>2610524H06Rik</b>	RIKEN cDNA 2610524H06 gene
<b>2700038G22Rik</b>	RIKEN cDNA 2700038G22 gene
<b>3010003L21Rik</b>	RIKEN cDNA 3010003L21 gene
<b>4833418N02Rik</b>	RIKEN cDNA 4833418N02 gene
<b>4930486L24Rik</b>	RIKEN cDNA 4930486L24 gene
<b>4930579G24Rik</b>	RIKEN cDNA 4930579G24 gene
<b>5430416N02Rik</b>	RIKEN cDNA 5430416N02 gene
<b>5430435G22Rik</b>	RIKEN cDNA 5430435G22 gene
<b>5730508B09Rik</b>	RIKEN cDNA 5730508B09 gene
<b>5830472F04Rik</b>	RIKEN cDNA 5830472F04 gene
<b>9230112E08Rik</b>	RIKEN cDNA 9230112E08 gene
<b>9330161L09Rik</b>	RIKEN cDNA 9330161L09 gene
<b>A630033H20Rik</b>	RIKEN cDNA A630033H20 gene
<b>A930018M24Rik</b>	RIKEN cDNA A930018M24 gene
<b>AI607873</b>	expressed sequence AI607873
<b>AW549877</b>	expressed sequence AW549877
<b>Abca1</b>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
<b>Abcb1b</b>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
<b>Abcg1</b>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
<b>Acaa2</b>	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)
<b>Acat2</b>	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2
<b>Acly</b>	ATP citrate lyase
<b>Acot2</b>	acyl-CoA thioesterase 2
<b>Acot7</b>	acyl-CoA thioesterase 7

<b>Acpp</b>	acid phosphatase, prostate
<b>Actg1</b>	predicted gene 8543; actin-like 8; predicted gene 7505; predicted gene 12715; predicted gene 12003; predicted gene 8399; predicted gene 6375; actin, gamma, cytoplasmic 1; similar to gamma-actin; predicted gene 4667; similar to cytoplasmic beta-actin; predicted gene 16385
<b>Adh7</b>	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide
<b>Aff1</b>	AF4/FMR2 family, member 1
<b>Agfg2</b>	ArfGAP with FG repeats 2
<b>Agpat9</b>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9
<b>Aimp2</b>	aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2
<b>Akap3</b>	A kinase (PRKA) anchor protein 3
<b>Akap8</b>	A kinase (PRKA) anchor protein 8
<b>Aldh18a1</b>	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1
<b>Aldh1l2</b>	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2
<b>Alg6</b>	asparagine-linked glycosylation 6 homolog (yeast, alpha-1,3,-glucosyltransferase)
<b>Amotl1</b>	angiomin-like 1
<b>Angptl4</b>	angiopoietin-like 4
<b>Ankrd10</b>	ankyrin repeat domain 10
<b>Aoah</b>	acyloxyacyl hydrolase
<b>Aph1c</b>	anterior pharynx defective 1c homolog (C. elegans)
<b>Apobec1</b>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
<b>Aqp9</b>	aquaporin 9
<b>Arhgap12</b>	Rho GTPase activating protein 12
<b>Arhgap19</b>	Rho GTPase activating protein 19
<b>Arhgap22</b>	Rho GTPase activating protein 22
<b>Arhgef3</b>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3
<b>Arid5b</b>	similar to modulator recognition factor 2; AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)
<b>Arl5a</b>	ADP-ribosylation factor-like 5A
<b>Arl6ip6</b>	similar to ADP-ribosylation-like factor 6-interacting protein 6; ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 6
<b>Arl9</b>	ADP-ribosylation factor-like 9
<b>Arntl</b>	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
<b>Ascc2</b>	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2
<b>Asns</b>	asparagine synthetase
<b>Atad5</b>	ATPase family, AAA domain containing 5
<b>Atf3</b>	activating transcription factor 3
<b>Atf4</b>	activating transcription factor 4
<b>Atf6</b>	activating transcription factor 6

<b>Atg12</b>	autophagy-related 12 (yeast)
<b>Atg2a</b>	ATG2 autophagy related 2 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>Atp13a4</b>	ATPase type 13A4
<b>Atxn3</b>	ataxin 3
<b>Avil</b>	advillin
<b>B230325K18Rik</b>	RIKEN cDNA B230325K18 gene
<b>B3galt5</b>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5
<b>B3gnt3</b>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3
<b>B4galt6</b>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6; similar to Beta-1,4-galactosyltransferase 6 (Beta-1,4-GalTase 6) (Beta4Gal-T6) (b4Gal-T6) (UDP-galactose:beta-N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase 6) (UDP-Gal:beta-GlcNAc beta-1,4-galactosyltransferase 6)
<b>Baiap211</b>	BAI1-associated protein 2-like 1
<b>Bcas3</b>	breast carcinoma amplified sequence 3
<b>Bcl2a1a</b>	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a
<b>Bcl2l11</b>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
<b>Bcl6</b>	B-cell leukemia/lymphoma 6
<b>Bhlhe40</b>	basic helix-loop-helix family, member e40
<b>Bsdc1</b>	BSD domain containing 1
<b>Btg2</b>	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative
<b>C130050O18Rik</b>	RIKEN cDNA C130050O18 gene
<b>C5ar1</b>	complement component 5a receptor 1
<b>COX1</b>	Cytochrome c oxidase subunit 1
<b>Calcoco1</b>	calcium binding and coiled coil domain 1
<b>Cald1</b>	caldesmon 1
<b>Calr</b>	calreticulin
<b>Camkk1</b>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha
<b>Car6</b>	carbonic anhydrase 6
<b>Card14</b>	caspase recruitment domain family, member 14
<b>Cars</b>	cysteinyl-tRNA synthetase
<b>Casp4</b>	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase; hypothetical protein LOC100044206
<b>Casp6</b>	caspase 6
<b>Cbr4</b>	carbonyl reductase 4
<b>Cbx5</b>	chromobox homolog 5 ( <i>Drosophila</i> HP1a)
<b>Ccdc130</b>	coiled-coil domain containing 130
<b>Ccdc28a</b>	coiled-coil domain containing 28A
<b>Ccdc54</b>	coiled-coil domain containing 54
<b>Ccl12</b>	chemokine (C-C motif) ligand 12; similar to monocyte chemoattractant protein-5
<b>Ccl7</b>	chemokine (C-C motif) ligand 7

<b>Ccnd1</b>	cyclin D1
<b>Ccnd3</b>	similar to Cyclin D3; cyclin D3
<b>Ccne1</b>	cyclin E1
<b>Ccne2</b>	cyclin E2
<b>Ccng2</b>	cyclin G2
<b>Ccnyl1</b>	cyclin Y-like 1; similar to cyclin Y-like 1
<b>Ccr1</b>	chemokine (C-C motif) receptor 1
<b>Ccr12</b>	chemokine (C-C motif) receptor-like 2
<b>Cd200r1</b>	CD200 receptor 1
<b>Cd274</b>	CD274 antigen
<b>Cd28</b>	CD28 antigen; similar to CD28 antigen
<b>Cd300ld</b>	similar to RIKEN cDNA 4732429D16 gene; RIKEN cDNA 4732429D16 gene
<b>Cd33</b>	CD33 antigen
<b>Cd38</b>	CD38 antigen
<b>Cd5</b>	CD5 antigen
<b>Cd52</b>	CD52 antigen
<b>Cd97</b>	CD97 antigen
<b>Cdc25a</b>	cell division cycle 25 homolog A ( <i>S. pombe</i> )
<b>Cdc6</b>	cell division cycle 6 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ); predicted gene 9430; similar to cell division cycle 6 homolog
<b>Cdca7</b>	cell division cycle associated 7
<b>Cdk2</b>	cyclin-dependent kinase 2
<b>Cdsn</b>	corneodesmosin; hypothetical protein LOC100043961
<b>Cebpg</b>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma
<b>Cenpq</b>	centromere protein Q
<b>Cep290</b>	centrosomal protein 290
<b>Chac1</b>	ChaC, cation transport regulator-like 1 ( <i>E. coli</i> )
<b>Chaf1a</b>	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)
<b>Chaf1b</b>	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
<b>Chd2</b>	chromodomain helicase DNA binding protein 2
<b>Chek1</b>	checkpoint kinase 1 homolog ( <i>S. pombe</i> )
<b>Chml</b>	choroideremia-like
<b>Cir1</b>	RIKEN cDNA 1700023B02 gene; predicted gene 5605; similar to CBF1 interacting corepressor; predicted gene 13803; predicted gene 2810
<b>Ckap4</b>	cytoskeleton-associated protein 4
<b>Clec4a1</b>	C-type lectin domain family 4, member a1
<b>Clec4d</b>	C-type lectin domain family 4, member d
<b>Clptm1l</b>	CLPTM1-like
<b>Cmpk2</b>	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial
<b>Cnr2</b>	cannabinoid receptor 2 (macrophage)
<b>Cox6a2</b>	cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 2
<b>Cpeb4</b>	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4
<b>Creb3l2</b>	cAMP responsive element binding protein 3-like 2



<b>Crel2</b>	cysteine-rich with EGF-like domains 2
<b>Crtap</b>	cartilage associated protein
<b>Crybg3</b>	beta-gamma crystallin domain containing 3
<b>Cspg5</b>	chondroitin sulfate proteoglycan 5
<b>Csrnp1</b>	cysteine-serine-rich nuclear protein 1
<b>Ctage5</b>	CTAGE family, member 5
<b>Ctdspl</b>	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like
<b>Cth</b>	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
<b>Ctla2b</b>	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta
<b>Ctsk</b>	cathepsin K
<b>Cttb2nl</b>	CTTNBP2 N-terminal like
<b>Cxcl10</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10; similar to Small inducible cytokine B10 precursor (CXCL10) (Interferon-gamma-induced protein CRG-2) (Gamma-IP10) (IP-10) (C7)
<b>Cxcl2</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
<b>Cxcl3</b>	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
<b>Cyb5r1</b>	cytochrome b5 reductase 1
<b>Cyp11a1</b>	cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1
<b>Cyp4v3</b>	cytochrome P450, family 4, subfamily v, polypeptide 3
<b>Cyp51</b>	cytochrome P450, family 51
<b>Cysl1r1</b>	cysteinyl leukotriene receptor 1
<b>Cyth4</b>	cytohesin 4
<b>D6Wsu163e</b>	DNA segment, Chr 6, Wayne State University 163, expressed
<b>D730003I15Rik</b>	RIKEN cDNA D730003I15 gene
<b>Daam1</b>	dishevelled associated activator of morphogenesis 1
<b>Dapk1</b>	death associated protein kinase 1
<b>Dck</b>	deoxycytidine kinase
<b>Ddit3</b>	DNA-damage inducible transcript 3
<b>Ddit4</b>	DNA-damage-inducible transcript 4
<b>Dennd2d</b>	DENN/MADD domain containing 2D
<b>Dennd4a</b>	DENN/MADD domain containing 4A
<b>Dhcr7</b>	7-dehydrocholesterol reductase
<b>Dnaja3</b>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3
<b>Dnajb1</b>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1
<b>Dnajb9</b>	predicted gene 6568; DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9
<b>Dnajc25</b>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 25
<b>Dnajc3</b>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3
<b>Dner</b>	delta/notch-like EGF-related receptor
<b>Dock10</b>	dedicator of cytokinesis 10
<b>Dpysl2</b>	dihydropyrimidinase-like 2
<b>Dscc1</b>	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae)

<b>Dus4l</b>	dihydrouridine synthase 4-like ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>Dusp1</b>	dual specificity phosphatase 1
<b>Dusp10</b>	dual specificity phosphatase 10
<b>Dusp16</b>	dual specificity phosphatase 16
<b>Dusp4</b>	dual specificity phosphatase 4
<b>Dusp7</b>	dual specificity phosphatase 7; similar to dual specificity phosphatase 7
<b>Dyrk3</b>	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3
<b>E230016K23Rik</b>	RIKEN cDNA E230016K23 gene
<b>E330020D12Rik</b>	predicted gene 6648
<b>Efr3b</b>	EFR3 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>Egln1</b>	EGL nine homolog 1 ( <i>C. elegans</i> )
<b>Ehd4</b>	EH-domain containing 4
<b>Eif4ebp1</b>	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
<b>Elmo1</b>	engulfment and cell motility 1, ced-12 homolog ( <i>C. elegans</i> )
<b>Elovl3</b>	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3
<b>Emp2</b>	epithelial membrane protein 2
<b>Emr1</b>	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1
<b>Endod1</b>	endonuclease domain containing 1
<b>Enpp4</b>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4
<b>Epas1</b>	endothelial PAS domain protein 1; similar to Endothelial PAS domain protein 1
<b>Epsti1</b>	epithelial stromal interaction 1 (breast)
<b>Erlin1</b>	ER lipid raft associated 1
<b>Ern1</b>	endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1
<b>Exo1</b>	exonuclease 1
<b>Ezh1</b>	enhancer of zeste homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )
<b>F13a1</b>	coagulation factor XIII, A1 subunit
<b>F5</b>	coagulation factor V; similar to Murine coagulation factor V
<b>Fads2</b>	fatty acid desaturase 2
<b>Fam102b</b>	family with sequence similarity 102, member B
<b>Fam129a</b>	family with sequence similarity 129, member A
<b>Fam162a</b>	family with sequence similarity 162, member A
<b>Fam175a</b>	family with sequence similarity 175, member A
<b>Fam186b</b>	family with sequence similarity 186, member B
<b>Fam57a</b>	family with sequence similarity 57, member A
<b>Fancc</b>	Fanconi anemia, complementation group B
<b>Fasn</b>	fatty acid synthase
<b>Fbxl20</b>	F-box and leucine-rich repeat protein 20
<b>Fbxo32</b>	F-box protein 32

<b>Fbxo36</b>	F-box protein 36
<b>Fcgr2b</b>	Fc receptor, IgG, low affinity IIb
<b>Fdft1</b>	predicted gene 6781; farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1
<b>Fdps</b>	similar to farnesyl diphosphate synthetase; farnesyl diphosphate synthetase; predicted gene 5873; predicted gene 8163; predicted gene 3571
<b>Fgd4</b>	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4
<b>Fkbp1b</b>	FK506 binding protein 1b
<b>Fnip2</b>	folliculin interacting protein 2
<b>Foxd1</b>	forkhead box D1
<b>Foxk1</b>	forkhead box K1
<b>Fpgt</b>	fucose-1-phosphate guanylyltransferase
<b>Fstl1</b>	folliculin-like 1
<b>Gab2</b>	growth factor receptor bound protein 2-associated protein 2
<b>Gabarapl1</b>	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor-associated protein-like 1
<b>Gadd45a</b>	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
<b>Gars</b>	glycyl-tRNA synthetase
<b>Gas7</b>	growth arrest specific 7
<b>Gbp3</b>	guanylate binding protein 3
<b>Gch1</b>	GTP cyclohydrolase 1
<b>Gda</b>	guanine deaminase
<b>Gdf15</b>	growth differentiation factor 15
<b>Gigyf1</b>	GRB10 interacting GYF protein 1
<b>Gins1</b>	GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)
<b>Glce</b>	glucuronyl C5-epimerase
<b>Glipr2</b>	GLI pathogenesis-related 2
<b>Gm10069</b>	predicted gene 10069
<b>Gm11974</b>	predicted gene 11974
<b>Gm12258</b>	predicted gene 12258
<b>Gm12814</b>	hypothetical LOC630887
<b>Gm15340</b>	predicted gene 15340
<b>Gm15628</b>	predicted gene 15628
<b>Gm3948</b>	predicted gene 3948
<b>Gm4583</b>	predicted gene 4583
<b>Gm5127</b>	predicted gene 5127
<b>Gm5176</b>	predicted gene 5176
<b>Gm5433</b>	predicted gene 5433; predicted gene 6950; predicted gene 4425
<b>Gm7609</b>	similar to putative G-protein coupled receptor; predicted gene 2635; component of Sp100-rs; predicted gene 2666; predicted gene 7582; predicted gene 7592; predicted gene 7609
<b>Gm8995</b>	predicted gene 1966; predicted gene 8995; GTPase,

	very large interferon inducible 1
<b>Gmn</b>	geminin
<b>Gnpat1</b>	glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1; predicted gene 7623
<b>Gnrh1</b>	gonadotropin releasing hormone 1
<b>Golga5</b>	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 5
<b>Gpr137b</b>	similar to Gpr137b protein; G protein-coupled receptor 137B
<b>Gpr141</b>	G protein-coupled receptor 141
<b>Gpr56</b>	G protein-coupled receptor 56
<b>Gpr84</b>	G protein-coupled receptor 84
<b>Gpt2</b>	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2
<b>Gstm1</b>	similar to Glutathione S-transferase Mu 1 (GST class-mu 1) (Glutathione S-transferase GT8.7) (pmGT10) (GST 1-1); predicted gene 5562; glutathione S-transferase, mu 1
<b>Gstt2</b>	glutathione S-transferase, theta 2
<b>Gtpbp2</b>	GTP binding protein 2
<b>Gyk</b>	glycerol kinase
<b>Hbp1</b>	high mobility group box transcription factor 1
<b>Hdac4</b>	histone deacetylase 4
<b>Heca</b>	headcase homolog (Drosophila); similar to headcase homolog
<b>Hells</b>	helicase, lymphoid specific
<b>Higd1a</b>	HIG1 domain family, member 1A
<b>Hist1h1b</b>	histone cluster 1, H1b
<b>Hist1h1c</b>	histone cluster 1, H1c
<b>Hist1h2bk</b>	histone cluster 1, H2bk
<b>Hivep2</b>	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2
<b>Hk2</b>	hexokinase 2
<b>Hmga2-ps1</b>	high mobility group AT-hook 2, pseudogene 1
<b>Hmgcr</b>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
<b>Hmgcs1</b>	similar to Hmgcs1 protein; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
<b>Hpse</b>	heparanase
<b>Hs1bp3</b>	HCLS1 binding protein 3
<b>Hsd17b7</b>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7
<b>Hsp90b1</b>	heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1
<b>Hspa1a</b>	heat shock protein 1B; heat shock protein 1A; heat shock protein 1-like
<b>Hspa1b</b>	heat shock protein 1B; heat shock protein 1A; heat shock protein 1-like
<b>Hsph1</b>	heat shock 105kDa/110kDa protein 1
<b>I830077J02Rik</b>	RIKEN cDNA I830077J02 gene
<b>lars</b>	isoleucine-tRNA synthetase

<b>Icosl</b>	icos ligand
<b>Id1</b>	inhibitor of DNA binding 1
<b>Id2</b>	inhibitor of DNA binding 2
<b>Idi1</b>	isopentenyl-diphosphate delta isomerase; similar to Isopentenyl-diphosphate delta isomerase; predicted gene 7655
<b>Ier2</b>	immediate early response 2
<b>Ifi2712a</b>	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A
<b>Ifi30</b>	interferon gamma inducible protein 30
<b>Ifit1</b>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
<b>Ifit2</b>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
<b>Ifitm6</b>	interferon induced transmembrane protein 6
<b>Ifnz</b>	interferon zeta
<b>Ift81</b>	intraflagellar transport 81 homolog (Chlamydomonas)
<b>Igtp</b>	interferon gamma induced GTPase
<b>Il16</b>	interleukin 16
<b>Il18rap</b>	interleukin 18 receptor accessory protein
<b>Il1a</b>	interleukin 1 alpha
<b>Il1b</b>	interleukin 1 beta
<b>Il1rl1</b>	interleukin 1 receptor-like 1
<b>Il1rl2</b>	interleukin 1 receptor-like 2
<b>Il23a</b>	interleukin 23, alpha subunit p19
<b>Il6</b>	interleukin 6
<b>Impa2</b>	inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 2
<b>Impact</b>	imprinted and ancient
<b>Inpp4b</b>	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II
<b>Insig1</b>	insulin induced gene 1
<b>Ipmk</b>	inositol polyphosphate multikinase
<b>Irak2</b>	interleukin-1 receptor-associated kinase 2
<b>Irg1</b>	immunoresponsive gene 1
<b>Irgm1</b>	immunity-related GTPase family M member 1
<b>Irgm2</b>	immunity-related GTPase family M member 2
<b>Isg15</b>	ISG15 ubiquitin-like modifier; predicted gene 9706
<b>Itpri1l1</b>	inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein-like 1
<b>Jdp2</b>	Jun dimerization protein 2
<b>Jmjd6</b>	jumonji domain containing 6
<b>Jmy</b>	junction-mediating and regulatory protein
<b>Kbtbd12</b>	kelch domain containing 6
<b>Kdm4a</b>	lysine (K)-specific demethylase 4A
<b>Kdm5b</b>	lysine (K)-specific demethylase 5B
<b>Kdm6b</b>	KDM1 lysine (K)-specific demethylase 6B
<b>Kdr</b>	kinase insert domain protein receptor
<b>Kif21b</b>	kinesin family member 21B

<b>Klf11</b>	Kruppel-like factor 11
<b>Klhl24</b>	kelch-like 24 (Drosophila)
<b>Klra2</b>	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2
<b>Krcc1</b>	lysine-rich coiled-coil 1
<b>Lat</b>	linker for activation of T cells
<b>Lcp2</b>	lymphocyte cytosolic protein 2
<b>Ldha</b>	predicted gene 7997; lactate dehydrogenase A; predicted gene 5452
<b>Ldlr</b>	low density lipoprotein receptor
<b>Leprotl1</b>	leptin receptor overlapping transcript-like 1
<b>Letm2</b>	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 2
<b>Lfng</b>	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
<b>Lgals3bp</b>	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
<b>Lgm1</b>	legumain
<b>Lgr4</b>	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4
<b>Lig1</b>	ligase I, DNA, ATP-dependent
<b>Lix1</b>	limb expression 1 homolog (chicken)
<b>Lmo4</b>	LIM domain only 4
<b>Lpar2</b>	lysophosphatidic acid receptor 2
<b>Lphn2</b>	latrophilin 2
<b>Lpin1</b>	lipin 1
<b>Lpxn</b>	leupaxin
<b>Lrp8</b>	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor
<b>Lss</b>	lanosterol synthase
<b>Lxn</b>	latexin
<b>Ly75</b>	lymphocyte antigen 75
<b>Maf1</b>	MAF1 homolog (S. cerevisiae)
<b>Mafb</b>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)
<b>Maged2</b>	similar to melanoma antigen family D, 2; melanoma antigen, family D, 2
<b>Magt1</b>	magnesium transporter 1
<b>Mak</b>	male germ cell-associated kinase
<b>Mamdc2</b>	MAM domain containing 2
<b>Manf</b>	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
<b>Map2k6</b>	mitogen-activated protein kinase kinase 6
<b>Map3k5</b>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5; similar to mitogen activated protein kinase kinase kinase 5
<b>Map3k8</b>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
<b>Marcks1</b>	MARCKS-like 1; predicted gene 9106
<b>Mat2a</b>	methionine adenosyltransferase II, alpha
<b>Mbnl2</b>	muscleblind-like 2

<b>Mcm4</b>	minichromosome maintenance deficient 4 homolog (S. cerevisiae)
<b>Mcm5</b>	minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae)
<b>Mcm6</b>	minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)
<b>Mfsd7a</b>	major facilitator superfamily domain containing 7A
<b>Mgat2</b>	mannoside acetylglucosaminyltransferase 2
<b>Mib2</b>	mindbomb homolog 2 (Drosophila)
<b>Micall2</b>	MICAL-like 2
<b>Mir19a</b>	microRNA 19a
<b>Mir27a</b>	microRNA 27a
<b>Mir677</b>	microRNA 677
<b>Mirlet7f-1</b>	microRNA let7f1
<b>Mitd1</b>	MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1
<b>Mixl1</b>	Mix1 homeobox-like 1 (Xenopus laevis)
<b>Mknk1</b>	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 1
<b>Mlh3</b>	mutL homolog 3 (E coli)
<b>Mikl</b>	mixed lineage kinase domain-like
<b>Mmp13</b>	matrix metalloproteinase 13
<b>Mmp9</b>	matrix metalloproteinase 9
<b>Mnt</b>	max binding protein
<b>Mob2</b>	multigenic obesity 2
<b>Mphosph6</b>	M phase phosphoprotein 6; predicted gene 11448
<b>Ms4a6d</b>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D
<b>Msh6</b>	mutS homolog 6 (E. coli)
<b>Mthfd2</b>	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
<b>Mthfr</b>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
<b>Mtmr3</b>	predicted gene 5043; myotubularin related protein 3
<b>Mtus1</b>	mitochondrial tumor suppressor 1
<b>Mup20</b>	predicted gene 12560; predicted gene 13516; predicted gene 12556
<b>Mx2</b>	myxovirus (influenza virus) resistance 2
<b>Mybl2</b>	myeloblastosis oncogene-like 2
<b>Myh9</b>	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle
<b>N4bp2l1</b>	NEDD4 binding protein 2-like 1
<b>Naa20</b>	similar to N-acetyltransferase 5; predicted gene 7984; N-acetyltransferase 5 (ARD1 homolog, S. cerevisiae)
<b>Naip1</b>	NLR family, apoptosis inhibitory protein 4; NLR family, apoptosis inhibitory protein 7; NLR family, apoptosis inhibitory protein 1; baculoviral IAP repeat-containing 1f
<b>Napb</b>	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein beta

<b>Narf</b>	nuclear prelamin A recognition factor
<b>Nbr1</b>	neighbor of Brca1 gene 1
<b>Ndrp1</b>	N-myc downstream regulated gene 1
<b>Neat1</b>	RIKEN cDNA 2310043N10 gene
<b>Necab3</b>	N-terminal EF-hand calcium binding protein 3
<b>Neil1</b>	nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)
<b>Neurl3</b>	neuralized homolog 3 homolog (Drosophila)
<b>Nfe2l1</b>	nuclear factor, erythroid derived 2,-like 1
<b>Nfkb1a</b>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
<b>Nfkb1b</b>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta
<b>Nfkb1d</b>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, delta
<b>Nipal3</b>	NIPA-like domain containing 3; similar to NIPA-like domain containing 3
<b>Nlrp3</b>	NLR family, pyrin domain containing 3
<b>Nnat</b>	neuronatin
<b>Nos2</b>	nitric oxide synthase 2, inducible
<b>Nr1d1</b>	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
<b>Nr1d2</b>	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2; predicted gene 5827
<b>Nradd</b>	neurotrophin receptor associated death domain
<b>Nrn1</b>	neurtin 1
<b>Nsdhl</b>	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like
<b>Nt5e</b>	5' nucleotidase, ecto
<b>Nuak2</b>	NUAK family, SNF1-like kinase, 2
<b>Nup85</b>	nucleoporin 85
<b>Nupr1</b>	nuclear protein 1
<b>Oaf</b>	OAF homolog (Drosophila)
<b>Oas1b</b>	2'-5' oligoadenylate synthetase 1B
<b>Oas3</b>	2'-5' oligoadenylate synthetase 3
<b>Oasl1</b>	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1
<b>Oit3</b>	oncprotein induced transcript 3
<b>Osbpl2</b>	oxysterol binding protein-like 2
<b>Osbpl9</b>	oxysterol binding protein-like 9
<b>Osgin2</b>	oxidative stress induced growth inhibitor family member 2
<b>Otub2</b>	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2
<b>P2rx3</b>	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3
<b>P2ry6</b>	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
<b>P4hb</b>	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
<b>Paqr3</b>	progesterone and adiponectin receptor family member III
<b>Parp12</b>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12
<b>Parp14</b>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
<b>Parp9</b>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9



<b>Pax6</b>	paired box gene 6
<b>Pcdh7</b>	protocadherin 7
<b>Pck2</b>	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
<b>Pcmt2</b>	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2
<b>Pdcd1</b>	programmed cell death 1
<b>Pdcd4</b>	programmed cell death 4
<b>Pde7b</b>	phosphodiesterase 7B
<b>Pdia6</b>	similar to Protein disulfide isomerase associated 6; protein disulfide isomerase associated 6
<b>Peli1</b>	pellino 1
<b>Pfkl</b>	phosphofructokinase, liver, B-type
<b>Pgm2</b>	phosphoglucomutase 2
<b>Phf10</b>	PHD finger protein 10
<b>Phf21a</b>	PHD finger protein 21A
<b>Pi16</b>	peptidase inhibitor 16
<b>Pid1</b>	prior incubation determinant 1; RIKEN cDNA 5033414K04 gene
<b>Pik3ap1</b>	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1
<b>Pik3r3</b>	phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55)
<b>Pilrb2</b>	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 2; zinc finger, CW type with PWWP domain 1
<b>Pla2g4c</b>	phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)
<b>Plau</b>	plasminogen activator, urokinase
<b>Plaur</b>	plasminogen activator, urokinase receptor
<b>Plekha1</b>	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1
<b>Plekhm1</b>	pleckstrin homology domain containing, family M (with RUN domain) member 1
<b>Plekhm3</b>	pleckstrin homology domain containing, family M, member 3
<b>Plk2</b>	polo-like kinase 2 (Drosophila)
<b>Plk3</b>	polo-like kinase 3 (Drosophila)
<b>Pnpla8</b>	patatin-like phospholipase domain containing 8
<b>Pnpt1</b>	similar to polynucleotide phosphorylase-like protein; polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1
<b>Pnrc1</b>	proline-rich nuclear receptor coactivator 1
<b>Pole2</b>	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)
<b>Pot1a</b>	protection of telomeres 1A
<b>Ppif</b>	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)
<b>Ppp1r15a</b>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A; myeloid differentiation primary response gene 116
<b>Prdm15</b>	PR domain containing 15
<b>Preli2</b>	PRELI domain containing 2

<b>Prim1</b>	DNA primase, p49 subunit
<b>Prkch</b>	protein kinase C, eta
<b>Prr11</b>	proline rich 11
<b>Prss46</b>	RIKEN cDNA 1700112C13 gene
<b>Psmb10</b>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10
<b>Psph</b>	phosphoserine phosphatase
<b>Pstpip2</b>	proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2
<b>Ptafr</b>	platelet-activating factor receptor
<b>Ptgir</b>	prostaglandin I receptor (IP)
<b>Ptgs1</b>	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
<b>Ptpn21</b>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21
<b>Ptpn6</b>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
<b>Ptprj</b>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J; predicted gene 13768; predicted gene 13767
<b>Pxmp4</b>	peroxisomal membrane protein 4
<b>Rab32</b>	RAB32, member RAS oncogene family
<b>Rad54l</b>	RAD54 like ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>Ralgds</b>	ral guanine nucleotide dissociation stimulator
<b>Ranbp10</b>	RAN binding protein 10
<b>Rasgef1b</b>	RasGEF domain family, member 1B; hypothetical protein LOC100044232
<b>Rasgrp3</b>	RAS, guanyl releasing protein 3
<b>Rb1cc1</b>	RB1-inducible coiled-coil 1
<b>Rbbp7</b>	retinoblastoma binding protein 7; predicted gene 6382
<b>Rbm15b</b>	RNA binding motif protein 15B
<b>Rcn1</b>	reticulocalbin 1
<b>Rffl</b>	ring finger and FYVE like domain containing protein
<b>Rgs1</b>	regulator of G-protein signaling 1
<b>Rgs16</b>	regulator of G-protein signaling 16
<b>Rheb1l</b>	Ras homolog enriched in brain like 1
<b>Rhobtb3</b>	Rho-related BTB domain containing 3
<b>Rhof</b>	ras homolog gene family, member f
<b>Ribc1</b>	RIB43A domain with coiled-coils 1
<b>Rnf13</b>	ring finger protein 13
<b>Rnf144b</b>	ring finger protein 144B
<b>Rnf213</b>	ring finger protein 213
<b>Rnpep</b>	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)
<b>Rpgrip1l</b>	Rpgrip1-like
<b>Rrm2</b>	ribonucleotide reductase M2
<b>Rtp4</b>	receptor transporter protein 4
<b>Rusc2</b>	RUN and SH3 domain containing 2
<b>S100a10</b>	S100 calcium binding protein A10 (calpactin)
<b>Samd9l</b>	sterile alpha motif domain containing 9-like
<b>Sat1</b>	similar to spermidine/spermine N1-acetyltransferase; predicted gene 5552; spermidine/spermine N1-acetyl

	transferase 1
<b>Scara5</b>	scavenger receptor class A, member 5 (putative)
<b>Sdc3</b>	syndecan 3
<b>Sdf2l1</b>	stromal cell-derived factor 2-like 1
<b>Selplg</b>	selectin, platelet (p-selectin) ligand
<b>Sema4a</b>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A
<b>Sema4c</b>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C
<b>Sesn2</b>	sestrin 2
<b>Sf3a3</b>	splicing factor 3a, subunit 3
<b>Sgms2</b>	sphingomyelin synthase 2
<b>Sigmar1</b>	sigma non-opioid intracellular receptor 1
<b>Slc15a3</b>	solute carrier family 15, member 3
<b>Slc16a3</b>	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3
<b>Slc17a5</b>	solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5
<b>Slc1a4</b>	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4
<b>Slc25a13</b>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 13
<b>Slc25a5</b>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 5; similar to ADP/ATP translocase 2 (Adenine nucleotide translocator 2) (ANT 2) (ADP,ATP carrier protein 2) (Solute carrier family 25 member 5); predicted gene 5529; predicted gene 8429; predicted gene 5256
<b>Slc26a11</b>	solute carrier family 26, member 11
<b>Slc29a3</b>	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 3
<b>Slc2a1</b>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
<b>Slc36a2</b>	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2
<b>Slc38a7</b>	predicted gene 3599; solute carrier family 38, member 7
<b>Slc44a3</b>	solute carrier family 44, member 3
<b>Slc46a3</b>	solute carrier family 46, member 3
<b>Slc6a9</b>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
<b>Slc7a1</b>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y <sup>+</sup> system), member 1
<b>Slc7a11</b>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y <sup>+</sup> system), member 11

<b>Slc7a5</b>	similar to solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5; similar to Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5; solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5
<b>Slc9a9</b>	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9
<b>Slco4a1</b>	solute carrier organic anion transporter family, member 4a1
<b>Slfn2</b>	schlafen 2
<b>Slfn4</b>	schlafen 4
<b>Slfn9</b>	similar to putative protein; schlafen 9; similar to schlafen 9
<b>Smad6</b>	MAD homolog 6 (Drosophila)
<b>Snhg3</b>	small nucleolar RNA host gene (non-protein coding) 3
<b>Snord52</b>	small nucleolar RNA, C/D box 52
<b>Snx18</b>	sorting nexin 18
<b>Snx33</b>	sorting nexin 33
<b>Soat2</b>	sterol O-acyltransferase 2
<b>Sod2</b>	superoxide dismutase 2, mitochondrial
<b>Sorbs3</b>	sorbin and SH3 domain containing 3
<b>Sos2</b>	son of sevenless homolog 2 (Drosophila)
<b>Spcs3</b>	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae)
<b>Sqle</b>	squalene epoxidase
<b>Srd5a1</b>	steroid 5 alpha-reductase 1
<b>Srgap3</b>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3
<b>Ssh2</b>	slingshot homolog 2 (Drosophila)
<b>Ssr1</b>	signal sequence receptor, alpha; similar to signal sequence receptor, alpha
<b>Stambpl1</b>	STAM binding protein like 1
<b>Stap1</b>	signal transducing adaptor family member 1; similar to stem cell adaptor protein STAP-1
<b>Stard4</b>	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4
<b>Stard5</b>	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 5
<b>Stat1</b>	signal transducer and activator of transcription 1
<b>Stat2</b>	signal transducer and activator of transcription 2
<b>Stk40</b>	serine/threonine kinase 40
<b>Stxbp1</b>	syntaxin binding protein 1
<b>Syne1</b>	synaptic nuclear envelope 1
<b>Tacc2</b>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
<b>Taf15</b>	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
<b>Taf1d</b>	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, D; predicted gene 13487
<b>Taf4b</b>	TAF4B RNA polymerase II, TATA box binding protein

	(TBP)-associated factor
<b>Tarm1</b>	predicted gene 9904
<b>Tars</b>	threonyl-tRNA synthetase
<b>Tbc1d9</b>	TBC1 domain family, member 9
<b>Tbpl1</b>	TATA box binding protein-like 1
<b>Tbrg3</b>	transforming growth factor beta regulated gene 3
<b>Tcam1</b>	testicular cell adhesion molecule 1
<b>Tcf19</b>	transcription factor 19
<b>Tcp11l2</b>	t-complex 11 (mouse) like 2
<b>Tecpr1</b>	tectonin beta-propeller repeat containing 1
<b>Tesk1</b>	testis specific protein kinase 1
<b>Tfrc</b>	transferrin receptor
<b>Thap6</b>	THAP domain containing 6
<b>Them4</b>	thioesterase superfamily member 4
<b>Thoc3</b>	THO complex 3
<b>Tiam1</b>	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
<b>Tipin</b>	timeless interacting protein
<b>Tk1</b>	predicted gene 6091; thymidine kinase 1
<b>Tlr2</b>	toll-like receptor 2
<b>Tlr3</b>	toll-like receptor 3
<b>Tlr4</b>	toll-like receptor 4
<b>Tmem119</b>	transmembrane protein 119
<b>Tmem120b</b>	transmembrane protein 120B
<b>Tmem140</b>	transmembrane protein 140
<b>Tmem154</b>	transmembrane protein 154
<b>Tmem194</b>	transmembrane protein 194
<b>Tmem2</b>	transmembrane protein 2
<b>Tnfaip2</b>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
<b>Tnfrsf9</b>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
<b>Tnfsf10</b>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
<b>Tnfsf13b</b>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
<b>Tnfsf18</b>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18
<b>Tnnt2</b>	troponin T2, cardiac
<b>Tom1l2</b>	target of myb1-like 2 (chicken)
<b>Topbp1</b>	topoisomerase (DNA) II binding protein 1
<b>Tpm4</b>	tropomyosin 4; predicted gene 7809
<b>Tram2</b>	translocating chain-associating membrane protein 2
<b>Trem1</b>	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
<b>Trib3</b>	tribbles homolog 3 (Drosophila)
<b>Trim21</b>	tripartite motif-containing 21; similar to Tripartite motif protein 21
<b>Trp53inp1</b>	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1
<b>Tspan32</b>	tetraspanin 32
<b>Tspo</b>	translocator protein
<b>Ttll3</b>	tubulin tyrosine ligase-like family, member 3

<b>Tuba8</b>	tubulin, alpha 8
<b>Tubb6</b>	tubulin, beta 6
<b>Tubd1</b>	tubulin, delta 1
<b>Txndc11</b>	thioredoxin domain containing 11
<b>Uap1</b>	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1
<b>Ubxn7</b>	UBX domain protein 7
<b>Uchl3</b>	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)
<b>Ugdh</b>	UDP-glucose dehydrogenase
<b>Uhrf1</b>	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1; predicted gene 5648; similar to nuclear zinc finger protein Np95
<b>Ulk1</b>	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)
<b>Uprt</b>	uracil phosphoribosyltransferase (FUR1) homolog (S. cerevisiae)
<b>Usp18</b>	ubiquitin specific peptidase 18; similar to ubiquitin specific protease UBP43
<b>Usp2</b>	ubiquitin specific peptidase 2
<b>Usp11</b>	ubiquitin specific peptidase like 1
<b>Vcl</b>	vinculin
<b>Vps39</b>	vacuolar protein sorting 39 (yeast)
<b>Vwf</b>	Von Willebrand factor homolog
<b>Wdhd1</b>	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1
<b>Wdr45</b>	WD repeat domain 45
<b>Wdr6</b>	WD repeat domain 6
<b>Wfs1</b>	Wolfram syndrome 1 homolog (human)
<b>Wipi2</b>	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2
<b>Xdh</b>	xanthine dehydrogenase
<b>Yars</b>	tyrosyl-tRNA synthetase
<b>Ylpm1</b>	YLP motif containing 1
<b>Ypel2</b>	yippee-like 2 (Drosophila)
<b>Ypel3</b>	yippee-like 3 (Drosophila)
<b>Zbp1</b>	Z-DNA binding protein 1
<b>Zbtb10</b>	zinc finger and BTB domain containing 10
<b>Zc3h6</b>	zinc finger CCCH type containing 6
<b>Zdhhc14</b>	zinc finger, DHHC domain containing 14
<b>Zfp420</b>	zinc finger protein 420
<b>Zfp618</b>	zinc fingerprotein 618
<b>Zfp639</b>	zinc finger protein 639
<b>Zfp658</b>	cDNA sequence BC043301
<b>Zfyve1</b>	zinc finger, FYVE domain containing 1
<b>Zfyve26</b>	zinc finger, FYVE domain containing 26
<b>Zhx2</b>	zinc fingers and homeoboxes 2
<b>Zkscan14</b>	zinc finger with KRAB and SCAN domains 14
<b>Zmynd19</b>	similar to MCH-R interacting zinc-finger protein; zinc finger, MYND domain containing 19

<b>Znfx1</b>	zinc finger, NFX1-type containing 1
<b>Zswim4</b>	zinc finger, SWIM domain containing 4
<b>Zwilch</b>	Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)
<b>Trim30a</b>	unclassified
<b>Zfp948</b>	unclassified
<b>Pald1</b>	unclassified
<b>Zfp934</b>	unclassified
<b>Themis2</b>	unclassified
<b>Cnppd1</b>	unclassified
<b>Emc8</b>	unclassified
<b>Rmdn2</b>	unclassified
<b>Crebrf</b>	unclassified
<b>Gm20559</b>	unclassified
<b>Vimp</b>	unclassified
<b>Tbc1d31</b>	unclassified
<b>Trp53cor1</b>	unclassified
<b>Kdm7a</b>	unclassified
<b>Cep83os</b>	unclassified
<b>Mir1957a</b>	unclassified
<b>Ccpg1os</b>	unclassified
<b>Ar114ep</b>	unclassified
<b>Cep162</b>	unclassified
<b>Kiz</b>	unclassified
<b>Srsf7</b>	unclassified
<b>Ubal1</b>	unclassified
<b>Efcab11</b>	unclassified
<b>Gm11944</b>	unclassified
<b>Nxpe3</b>	unclassified
<b>LOC100503923</b>	unclassified
<b>LOC102631997</b>	unclassified
<b>Milr1</b>	unclassified
<b>Phf11c</b>	unclassified
<b>Tenm4</b>	unclassified
<b>Spdl1</b>	unclassified
<b>10-sep</b>	unclassified
<b>Trmt44</b>	unclassified
<b>Lincpint</b>	unclassified
<b>Rab26os</b>	unclassified
<b>9830132P13Rik</b>	unclassified
<b>LOC102639841</b>	unclassified
<b>Epg5</b>	unclassified
<b>Slc35g1</b>	unclassified
<b>Msmo1</b>	unclassified
<b>Cep44</b>	unclassified
<b>Ptgs2os2</b>	unclassified
<b>Ccdc181</b>	unclassified

---

---

<b>Runx2os2</b>	unclassified
<b>Klh142</b>	unclassified
<b>Gm19313</b>	unclassified
<b>Gid4</b>	unclassified
<b>Zfp945</b>	unclassified
<b>Srsf2</b>	unclassified

**unclassified:** no clasificados. Estos genes no fueron identificados por la base de datos DAVID (Database for Annotation, Viasualization and Integrated Discovery) (Nature Protocols, 2009).