

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDA POR INTERFERÓN BETA EN LEUCOCITOS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE UTILIZANDO MICROARRAYS DE GENOMA COMPLETO
ANÁLISIS PRELIMINAR

MARCELO A. KAUFFMAN¹, PATRICIO YANKILEVICH¹, PAOLA R. BARRERO²; RICARDO BELLO¹, LAURA MARANGUNICH¹, LEON BENASAYAG³, MARCELO E. CRISCUOLO¹, ALEJANDRO VIDAL¹, ARTURO L. FAMULARI⁴, RAÚL O. DOMINGUEZ⁴; ROBERTO A. DIEZ¹, ÁIDA E. STERIN PRYNC¹

¹Bio Sidus SA, Buenos Aires, Argentina; ²Laboratorio de Virología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina; ³Centro Neurológico y Neuropediátrico, Buenos Aires, Argentina; ⁴Fundación Argentina contra las Enfermedades Neurológicas del Envejecimiento, Buenos Aires, Argentina.

Resumen *Introducción y Objetivos:* Aunque la experiencia clínica del tratamiento de la Esclerosis Múltiple (EM) con interferón beta (IFN β) es extensa, los mecanismos moleculares farmacodinámicos no son completamente conocidos. Nuestro objetivo fue caracterizar la expresión génica del tratamiento con IFN β 1a en leucocitos de pacientes con EM utilizando *microarrays* con representación del genoma humano completo. *Materiales y Métodos:* Se obtuvieron leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 5 pacientes con diagnóstico de EM forma recaída-remisión. Los PBMC se estudiaron en 4 condiciones: basal, cultivo por 24 hs sin IFN β ; y cultivo por 24 hs en presencia de IFN β 1a (Blastoferon^{NR}, Bio Sidus o Rebif^{NR}, Serono). Tras purificar el ARN de las células no adherentes (mayoritariamente linfocitos), se hibridizó en *microarrays* (CODELINK^{NR}) con 53877 oligonucleótidos. Utilizando el paquete bioinformático Limma (*bioconductor.org*) se obtuvo el perfil de expresión diferencial del "efecto interferón". Se clasificó funcionalmente el grupo de genes diferencialmente expresados utilizando *pantherdb*. Se construyó una red de interacción de genes utilizando el paquete GeneTS. *Resultados:* El tratamiento con IFN β 1a modificó la expresión de 868 genes: 545 aumentaron (incluyendo CXCL11, CCL8, INDO, IFI27, CFB, CXCL10, IFIT1) y 323 disminuyeron (incluyendo RBP7, SEPT5, RNF8, ADORA2B y FOS). Estos genes se clasifican dentro de los siguientes procesos biológicos: *inmunidad mediada por IFN*, *inmunidad y defensa*, *inmunidad mediada por células T* y *apoptosis*, entre otros. A partir de 180 genes asociados a función inmune se construyó una red de interacción genética de 125 nodos (genes) y 289 ejes (interacciones). *Conclusiones:* Se caracterizaron preliminarmente cambios en los niveles de expresión a escala de genoma completo inducidos por el tratamiento con IFN β 1a.

Palabras claves: Esclerosis Múltiple; Interferón Beta; Microarrays; Quimioquinas; Genética; Redes genéticas

Summary *Characterization of gene expression induced by interferon beta on leukocytes of Multiple Sclerosis patients by means of a whole genome microarray assay. A preliminary analysis.*

Introduction and Objectives: Despite the vast clinical experience of interferon beta (IFN β) treatment in Multiple Sclerosis (MS), the molecular pharmacodynamic mechanisms call for further elucidation. The objective of this investigation has been to characterize the IFN β 1a regulated gene expression on leukocytes of MS patients using *microarrays* with whole human genome representation. *Materials and Methods:* Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from MS relapsing-remitting patients. PBMC samples were studied under 4 conditions: basal, IFN β -free culture for 24 h, and 24 h culture with IFN β 1a (Blastoferon^{NR}, Bio Sidus or Rebif^{NR}, Serono). Following purification from non-adherent cells (mostly lymphocytes), RNA was hybridized in *microarrays* (CODELINK^{NR}) with 53877 oligonucleotides. The differential expression profile resulting from the "interferon effect" was obtained applying the Limma bioinformatic analysis (*bioconductor.org*). The differentially expressed gene group was functionally classified by *pantherdb*. A network of gene interaction was built using a GeneTS pack. *Results:* IFN β 1a treatment modified expression of 868 genes: 545 increased (including CXCL11, CCL8, INDO, IFI27, CFB, CXCL10, IFIT1) and 323 diminished (including RBP7, SEPT5, RNF8, ADORA2B and FOS). These genes are classified within the following biological processes: *IFN mediated immunity*, *immunity and defense*, *T-cell mediated immunity and apoptosis*, among others. A gene interaction network consisting in 125 nodes (genes) and 289 edges (interactions) was built from 180 genes associated. *Conclusions:* IFN β 1a – induced changes in the level of expression at whole genome scale have been preliminarily characterized.

Keywords: Multiple Sclerosis; Interferon Beta; Microarrays; Chemokines; Genetics; Genetic networks

Introducción

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante crónica del Sistema Nervioso Central. Constituye una de las principales causas de discapacidad en la población adulta joven¹. Si bien su etiología es aún incierta, en su patogénesis estaría involucrada una compleja interacción entre factores ambientales y genéticos no dilucidados completamente².

La EM es un proceso mediado por el sistema inmune³. La histopatología clásicamente muestra una infiltración perivascular de células del sistema inmunológico a través de la barrera hemato-encefálica⁴. Estas células invaden el parénquima encefálico y provocan desmielinización mediante la destrucción directa de la mielina, activando una reacción inflamatoria local mediada por la microglia residente, o causando la apoptosis oligodendrocitaria por mecanismos tóxicos locales⁵.

Los interferones fueron descubiertos en 1957⁶. Su nombre proviene de la descripción original de su acción: sustancias solubles que mediaban el fenómeno de interferencia viral en cultivos celulares. El reconocimiento de sus otras acciones biológicas, como el efecto antiproliferativo o inmunomodulador fue posterior^{5,7}. Son proteínas naturales producidas en respuesta a la estimulación con ácidos nucleicos virales, productos bacterianos o proteínas tumorales⁷. Si bien son considerados primariamente como parte del sistema inmunológico innato, participan en respuestas inmunes adaptativas, modulando la diferenciación linfocitaria B y T, entre otras funciones⁵.

Desde hace más de una década el interferón beta recombinante (IFN β 1a o IFN β 1b) es el tratamiento de elección para la EM a Recaídas y Remisiones (EMRR)⁸. Aunque la experiencia clínica es extensa y tanto su receptor⁹ como la vía de señalización intracelular¹⁰ involucrada han sido muy estudiados, no son completamente conocidos los complejos mecanismos farmacodinámicos moleculares que subyacen a su acción terapéutica. Estudios previos han mostrado evidencias que apoyan principalmente las siguientes hipótesis: 1) inhibición del desarrollo celular Th1¹¹; 2) desvío de la respuesta inmune hacia Th2¹²; 3) recuperación de la función de la barrera hemato-encefálica dañada¹³, y 4) disminución de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II inducida por IFN γ ¹⁴. Teniendo en cuenta que alrededor de un 30% de los pacientes bajo tratamiento inmunomodulador no obtienen una buena respuesta terapéutica¹⁵, un mejor conocimiento de los mecanismos farmacodinámicos moleculares permitiría elaborar algoritmos predictivos sobre los beneficios del tratamiento y seleccionar posibles blancos terapéuticos a desarrollar.

Las micro-matrices de genes o *microarrays* representan una herramienta de la biología molecular con capacidad de examinar en su totalidad el patrón de expresión

génica de un tejido en una condición y tiempo determinados¹⁶. Su reciente desarrollo ha permitido obtener cuantiosa información sobre los mecanismos moleculares actuantes en las más diversas patologías¹⁷, procesos fisiológicos¹⁸ y tratamientos farmacológicos¹⁹. Por su volumen, el caudal de información que puede obtenerse con este procedimiento exige, para su correcta interpretación, la aplicación de metodologías analíticas aún en optimización, que integran la informática, la biología y la estadística²⁰.

En el presente trabajo caracterizamos en forma preliminar la expresión genética gatillada por el tratamiento con IFN β 1a en un ensayo *in vitro* en una población de pacientes con EMRR utilizando *microarrays* con representación del genoma humano completo y, mediante análisis bioinformático, identificamos posibles redes de interacción genética vinculadas a la acción inmunomoduladora del IFN β 1a.

Materiales y Métodos

Pacientes

Se incluyeron 5 pacientes (3 de sexo femenino y 2 de sexo masculino) con diagnóstico definido²¹ de Esclerosis Múltiple a Recaídas y Remisiones que recibían atención regular en 2 centros neurológicos privados de la Ciudad de Buenos Aires (*Centro Neurológico y Neuropediátrico y Fundación Argentina contra las Enfermedades Neurológicas del Envejecimiento*). El rango etario se extendía entre 15 y 54 años. Al momento de la extracción de la muestra sanguínea dos de ellos se encontraban en tratamiento con IFN β con buena respuesta clínica. Uno de ellos había recibido IFN β por 3 años, habiéndose discontinuado el tratamiento 1 año antes de su participación en este estudio por falta de eficacia terapéutica. Los restantes dos sujetos fueron reclutados al momento del diagnóstico y nunca habían recibido tratamiento inmunomodulador. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento con corticosteroides o inmunosupresores en el mes previo a la extracción sanguínea. La Figura 1 presenta el esquema global del experimento.

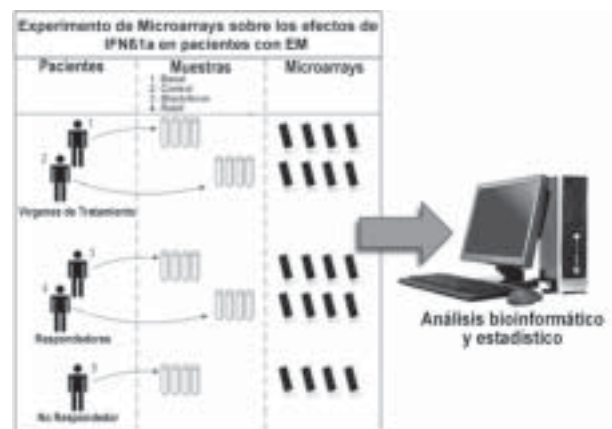


Fig.1.— Diseño experimental

Aislamiento de linfocitos de sangre periférica y tratamiento con IFN β 1a

Se obtuvieron leucocitos mononucleares de sangre periférica heparinizada (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. Los PBMC se resuspendieron en una concentración de 1×10^6 células/ml en medio de cultivo DMEM/F12 con suero fetal bovino al 10%, 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina. Las células de cada individuo se dividieron en 4 alícuotas:

- Condición 1 ("Basal"): los PBMC (5×10^6) se centrifugaron, resuspendieron en 600 μ l de *buffer* de lisis y se congelaron.
- Condición 2 ("Control") las células fueron incubadas (1×10^6 /ml) en una atmósfera húmeda, con CO₂ al 5% a 37 °C durante 24 horas en medio de cultivo.
- Condición 3 ("Blastoferon") las células fueron incubadas (1×10^6 /ml) en una atmósfera húmeda, con CO₂ al 5% a 37 °C durante 24 horas en medio de cultivo adicionado con 1000 UI/ml de IFN β 1a (Blastoferon^{NR}, Bio Sidus, Buenos Aires, Argentina)
- Condición 4 ("Rebif") las células fueron incubadas (1×10^6 /ml) en una atmósfera húmeda, con CO₂ al 5% a 37 °C durante 24 horas en medio de cultivo adicionado con 1000 UI/ml de IFN β 1a (Rebif^{NR}, Serono, Ginebra, Suiza).

Luego del período de incubación, las células no adherentes de cada condición fueron recuperadas, centrifugadas y resuspendidas en 600 μ l de *buffer* de lisis.

El ARN de las células recuperadas en las cuatro condiciones experimentales fue purificado utilizando el equipo comercial RNAeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN fue medida mediante espectrofotometría y corrida en gel de agarosa con tinción con bromuro de etidio.

Amplificación, marcación e hibridización de ARN y microarrays

Antes de realizar los experimentos de hibridización con *microarrays*, los ARN de cada una de las muestras fueron amplificados y marcados *in vitro* utilizando *kits* comerciales (RNAeasy^{NR} y QIAquick^{NR}, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para las hibridizaciones se utilizó el sistema comercial CodeLink^{NR} Bioarray System (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Suecia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Esta plataforma, de un solo fluorocromo, permite evaluar cada *microarray* como una única muestra. El sistema CodeLink^{NR} es una metodología completa y de alto rendimiento utilizada para el análisis de la expresión génica, entre otras aplicaciones. El método se basa en la utilización de soportes (*microarrays*) que llevan fijados en su superficie una serie de oligonucleótidos preseleccionados.

Para el presente estudio se utilizaron *microarrays* que tienen representación del genoma humano completo (CodeLink^{NR} Human Whole Genome Bioarray System). Para cada individuo se realizaron 4 hibridizaciones en *microarrays*, obteniéndose un patrón de expresión génica para cada una de las condiciones experimentales. En total se procesaron 20 láminas (*chips*) de *microarrays* (ver Figura 1).

Tratamiento bioinformático y estadístico de los datos

- Análisis de Imágenes:

Las imágenes de los *microarrays* fueron generadas utilizando el *ArrayWorx scanner* (Amersham) y luego fueron cuantificadas usando CodeLink Expression Analysis Software, ver-

sión 4.1. Las intensidades (niveles de expresión) fueron normalizadas globalmente por el valor de la mediana en todos los puntos de cada *array*.

- Análisis de datos:

Los datos crudos fueron importados en el entorno de programación estadística R, versión 2.3.0⁽¹⁾. El análisis gráfico y estadístico fue realizado usando los paquetes CodeLink^{NR} y "Linear Models for Microarray Data package" (Limma, versión 2.6.2, ref. 22) incluidos en el proyecto BioConductor⁽²⁾²³.

Como parte del pre-procesamiento de los datos, los puntos correspondientes a los niveles de expresión de los genes que fueron identificados como saturados, irregulares, con fondo contaminado o con ruido, fueron excluidos del análisis; luego se realizó una normalización intra e interarray utilizando las funciones del paquete CodeLink^{NR}.

Las diferencias en los niveles de expresión entre los distintos *microarrays* fueron identificadas aplicando un modelo de Bayes empírico para obtener el estadístico t "moderado" mediante la función *eBayes* del paquete Limma. Aplicando las distintas funciones incluidas en dicho paquete se obtuvo, para cada gen, la tasa de variación (*fold change*) y la probabilidad de estar diferencialmente expresado respecto al conjunto de todos los genes (*p value*); esta probabilidad fue ajustada para corregir el efecto de las múltiples comparaciones usando el método de Benjamini y Hochberg²⁴. Fueron considerados como diferencialmente expresados los genes con un *p value* ajustado menor a 0,05.

- Efecto interferón:

Los datos de las dos formulaciones de IFN β 1a (BLASTOFERON y REBIF) fueron analizados separadamente, en forma comparativa⁽³⁾. La comparación entre los dos productos comerciales demostró que en las condiciones del ensayo no se detectan diferencias entre ambos, por lo que los resultados de respuesta a interferón se analizaron en conjunto (de aquí en más, "Efecto interferón"). Este efecto quedó definido como la expresión diferencial del grupo de genes constituido por:

Efecto interferón = (Blastoferon + Rebif) – Control – Basal

La agrupación jerárquica de los genes diferencialmente expresados por el efecto interferón en las diferentes muestras y su representación gráfica por niveles de expresión (*heatmap*) fue realizado usando la función *heatmap* incluida en R.

- Análisis de anotación funcional:

Para categorizar sistemáticamente el conjunto de genes diferencialmente expresados utilizamos el sistema de clasificación PANTHER²⁵ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Este sistema hace uso de estadística binomial para comparar una lista de genes en evaluación con una lista de referencia del genoma completo (NCBI: *Homo sapiens genes*) y determinar estadísticamente los grupos funcionales de genes sobre-representados en la lista en evaluación. Estos grupos funcionales toman su nombre del proceso biológico que caracteriza a cada uno de los genes en el sistema PANTHER. Debido a las múltiples comparaciones, el programa corrige el valor p mediante el método de Bonferroni.

⁽¹⁾ <http://www.r-project.org>

⁽²⁾ <http://www.Bioconductor.org>

⁽³⁾ Sterin Prync., A. et al, "Blastoferon vs. Rebif: whole genome pharmacodynamic similarity between two recombinant human interferon-beta 1^a preparations", Multiple Sclerosis 2006; 12: S208.

- Red de interacción de los genes relacionados con la respuesta inmune:

Con la lista de genes diferencialmente expresados por IFN β 1a se obtuvo un agrupamiento en categorías funcionales utilizando el *Functional Annotation Clustering* en DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, versión 2006, ref. 26). La red de interacción genética fue inferida con el paquete GeneTS (también incluido en BioConductor) que implementa una estrategia de selección de un modelo gráfico Gaussiano por pruebas múltiples²⁷. En la red resultante sólo fueron incluidos los ejes con valor de probabilidad mayor al 80%.

Resultados

Expresión génica diferencial inducida por IFN β 1a en linfocitos de pacientes con EMRR

Como muestra la Tabla 1 en el análisis fueron identificados 868 genes que en respuesta al Efecto Interferón mostraron diferencias significativas en los niveles de transcripción en las diferentes condiciones experimentales. Entre estos genes, 545 mostraron un aumento significativo de la expresión y 323 una disminución significativa tras el cultivo en presencia de IFN β 1a. Entre los genes con mayor aumento en la expresión (ver Tabla 2) se destacaron: Ligando 11 de quimioquinas con motivo CXC (CXCL11), Ligando 8 de quimioquinas con motivo CC (CCL8), Indolamina-pirrol 2,3 dioxigenasa (INDO), Factor B del Complemento (CFB), la proteína p27 (un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, *interferon-alpha-inducible protein 27*, IFI27), Ligando 10 de quimioquinas con motivo CXC (CXCL10) y proteína 1 con repeticiones de tetratricopéptido inducida por interferón (*interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1*, IFIT1) Entre los que tuvieron una mayor disminución en la expresión (ver Tabla 3) podemos mencionar: la proteína ligadora de retinol 7 (RBP7), la Septina 5 (SEPT5), la proteína con dedos en anillo 8 (*ring finger protein 8*, RNF8), receptor A2b de Adenosina (ADORA2B) y FOS. En el *heatmap* de la Figura 2 se observan los patrones de expresión de los genes expresados diferencialmente.

Tabla 1.- *Distribución cuantitativa de los genes diferencialmente expresados por IFN β 1a.*

	"Efecto interferón" (Blastoferon + Rebif) - Control - Basal
genes totales en el microarray	53877
genes no diferenciales	53009
genes que disminuyen su expresión	323
genes que aumentan su expresión	545
Total de genes diferencialmente expresados	868

1. *genes alude a secuencias de oligonucleótidos fijados en el microarray (los genes del genoma humano completo y diversos tipos de controles)*

Análisis de la anotación funcional de los genes con expresión diferencial

Al analizar los genes expresados diferencialmente como efecto del tratamiento con IFN β 1a dentro de grupos funcionales, mediante el sistema *PANTHER DB*, los genes con aumento en la expresión quedaron clasificados en los siguientes grupos: Inmunidad mediada por Interferón, Inmunidad y Defensa, Inmunidad mediada por macrófagos, Vías de señalización mediadas por citoquinas y quimioquinas, Inmunidad mediada por células T y Vías de Apoptosis (ver Tabla 4). Por su parte, los genes que mostraron una disminución en la expresión se clasifican en los siguientes grupos: Inmunidad y Defensa, Inmunidad mediada por macrófagos y Transducción de señales (ver Tabla 5).

Debido a la falta de una completa anotación funcional de los genes de respuesta al IFN β , realizamos un agrupamiento manual de los genes que codifican proteínas con función conocida en el sistema inmune en las siguientes familias de genes: interleuquinas, quimioquinas, integrinas, proteínas asociadas al interferón (aquellas que en su descripción en NCBI incluyeran el término "interferon"), familia de antígenos de membrana leucocitarios (CD, por *cluster of differentiation*), complejo mayor de histocompatibilidad, respuesta a virus, neuropéptidos, inmunidad innata, familia del TNF y vía de señalización JAK/STAT. Cabe mencionar que este agrupamiento manual no abarcó la totalidad de los genes diferencialmente expresados y que también se podrían haber establecido otros grupos de interés (ver Tablas 1 y 6).

Inferencia de una red de interacción entre los genes con anotación funcional en el sistema inmunológico

Al agrupar con DAVID los 868 genes diferencialmente expresados por su anotación funcional, se observó que el grupo con mayor probabilidad de estar correctamente integrado estaba conformado por 180 genes relacionados con la respuesta inmune. El listado de estos genes se presenta en las tablas 7 y 8.

A partir del grado de correlación en la expresión de estos genes se infirió un modelo gráfico de interacción (una red) que mostró 125 genes interconectados. La figura 3 muestra la totalidad de esta red, donde se puede observar la existencia de nodos (genes) muy conectados (*super hubs*). Ésta es una característica bien conocida en las redes genéticas que, al igual que otras redes biológicas, presentan una estructura de escala libre⁽⁴⁾. En esta red, 34 genes mostraron 5 o más interacciones. Entre ellos, por el importante rol de las quimioquinas en la

(4) scale free: muchos genes con pocas conexiones y pocos genes con muchas conexiones

Tabla 2.– Lista de los 10 genes que más aumentaron su expresión en respuesta al IFNβ1a.

Gen	GenBank Accession	Descripción	Fold change	P.Value ajustado
CXCL11	NM_005409	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	72.82	0.0003
CCL8	NM_005623	Chemokine (C-C motif) ligand 8	55.01	0.0025
INDO	NM_002164	Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	36.64	0.0034
CFB	NM_001710	Complement factor B	31.40	0.0019
IFI27	NM_005532	Interferon, alpha-inducible protein 27	28.46	0.0032
CXCL10	NM_001565	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	26.44	0.0029
RSAD2	NM_080657	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	22.04	0.0007
IFIT1	NM_001548	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	17.77	0.0072
DEFB1	NM_005218	Defensin, beta 1	17.38	0.0089
APOBEC3A	NM_145699	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	16.52	0.0046

Tabla 3.– Lista de los 10 genes que más disminuyeron su expresión en respuesta al IFNβ1a

Gen	GenBank Accession	Descripción	Fold change	P.Value ajustado
RBP7	NM_052960	Retinol binding protein 7, cellular	11.27	0.0171
LOC338758	BC040326	Hypothetical protein LOC338758	9.62	0.0218
FBP1	NM_000507	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	9.13	0.0029
SEPT5	NM_000407	Septin 5	8.27	0.0287
RNF8	NM_003958	Ring finger protein 8	7.66	0.0434
FBP1	NM_000507	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	7.61	0.0028
ADORA2B	NM_000676	Adenosine A2b receptor	7.49	0.0063
FOS	NM_005252	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	7.24	0.0434
C21orf67	AK127059	Chromosome 21 open reading frame 67	7.18	0.0004
CDA	NM_001785	Cytidine deaminase	6.87	0.0115

Tabla 4.– Procesos biológicos sobre-representados entre los genes positivamente regulados por el tratamiento con IFNβ1a

Proceso Biológico	Valor de p*
Inmunidad mediada por Interferón	7,88E-17
Inmunidad y Defensa	2,77E-15
Inmunidad mediada por macrófagos	1,02E-03
Vías de señalización mediadas por citoquinas y quemoquinas	4,36E-03
Inmunidad mediada por células T	1,71E-02
Apoptosis	4,15E-02

* Valor p con corrección de Bonferroni, según metodología descrita para pantherdb

Tabla 5.– Procesos biológicos sobre-representados entre los genes negativamente regulados por el tratamiento con IFNβ1a

Proceso Biológico	Valor de p*
Inmunidad y Defensa	8,41E-06
Inmunidad mediada por macrófagos	1,51E-04
Transducción de señales	4,15E-03

* Valor p con corrección de Bonferroni, según metodología descrita para pantherdb

fisiopatología de la EM, seleccionamos el gen CXCL3 como centro de una probable subred formada por 12 genes (inserto de la Figura 3). En esta interconexión encontramos 6 genes directamente vinculados a CXCL3, de los cuales 5 disminuyeron su expresión (FCGR2,

TREM1, PMRT1, CCL20, HNMT, identificados en color rojo) y el restante la aumentó (IFIT2, identificado en color amarillo). Además observamos que otros 6 genes también se relacionan con CXCL3 pero indirectamente a través de alguno de los genes ya mencionados, totalizando los 12 incluidos en la subred. De estos últimos seis genes, dos aumentaron su expresión (PLA2G7 y CMKLR, identificados en color amarillo) mientras que otros cuatro la disminuyeron (P2RX1, FCGRT, RECQL4 y IL8RA, identificados en color rojo).

Tabla 6.- Clasificación Manual de genes con expresión diferencial.

Interleuquinas					Integrinas				
GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a					GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN β P value	Referencias	Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN β P value	Referencias
IL15 Interleukin 15	IL-15 estimula la proliferación y atracción de células T y la diferenciación de células Natural Killer (NK). Inmunidad innata	3.56	0.0415	[1]	ITGB8 Integrin, beta 8	La integrina β 3 en asociación con una o más subunidades alfa, forma un importante set de matriz extracelular en las neuronas sensitivas.	3.94	0.0502	[12]
IL15R Interleukin 15 receptor, alpha	El receptor alfa se une a IL-15 con alta afinidad pero transduce la señal solo en presencia de IL-2/ β gamma.	7.14	0.0021	[1]	GENES QUE DISMINUYEN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE ifn β 1 a				
IL1F9 Interleukin 1 family, member 9	IL-1F9 Actúa en las reacciones inflamatorias a través de la activación de NFkB	11.95	0.0237	[2]	ITGAM Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	La integrina alpha M, es importante en la función inflamatoria producida por las células polimorfonucleares.	5.64	0.0197	[13]
IL2RA Interleukin 2 receptor, alpha	La unión de la IL-2 con el receptor alfa estimula la proliferación de linfocitos T y B activados.	4.77	0.0276	[3]	ITGB1 Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	La integrina β 1 es el nombre alternativo para el receptor beta de la fibronectina. Es esencial para la adhesión y migración de las células polimorfonucleares en la matriz extracelular.	3.96	0.0004	[14]
IL8RBP Interleukin 8 receptor, beta pseudogene	El receptor β para la IL-8 se encuentra en linfocitos T activados pero No en neutrófilos.	3.36	0.0034	[4]	ITGB2 Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	La integrina β 2 juega un rol importante en la adhesión de granulocitos (células polimorfonucleares) al endotelio.	3.23	0.0048	[14]
GENES QUE DISMINUYEN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE ifn β 1 a					Proteínas inducibles por Interferón				
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN β P value	Referencias	GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
IL23A Interleukin 23, alpha subunit p19	IL23A favorece el reclutamiento de células que participan en la respuesta inflamatoria linfocitos T helper de tipo 1.	3.06	0.0050	[5]	IFITM1 Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	Esta proteína se asocia con otras proteínas en la superficie de la membrana celular formando un complejo relacionado con la inhibición de la proliferación celular y señales de agregación.	3.08	0.0028	[15]
IL4R Interleukin 4 receptor	La unión de la IL-4 con el receptor estimula la proliferación de linfocitos B, eosinófilos y mast cells. Estimula también la función IgE.	1.67	0.0500	[3]	ISG20 Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	Esta proteína tiene un rol potencial en la degradación de RNA viral como parte de la respuesta antiviral regulada por Interferon y como regulador de señales intracelulares.	4.67	0.0019	[16]
IL8RA Interleukin 8 receptor, alpha	La unión de la IL-8 con el receptor alfa activa la regulación del péptido GRO y del Neutrophil Activating Peptide (NAP-2).	3.55	0.0023	5	IFITM3 Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	Esta proteína se expresa especialmente en células primordiales germinales migratorias	5.63	0.0389	[17]
Quimioquinas					IFIH1 Interferon induced with helicase C domain 1	Esta proteína es receptor de DNA de doble cadena proveniente de infecciones virales.	6.67	0.0016	[18]
GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a					IRF7 Interferon regulatory factor 7	Esta proteína juega un importante rol en la inmunidad innata donde junto con IRF3 controla la expresión de genes inducidos por Interferon como también la expresión de la quimioquina RANTES. Regula también la diferenciación de monocitos a macrófagos.	3.93	0.0064	[19]
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN β P value	Referencias	IFI27 Interferon, alpha-inducible protein 27	Esta proteína inducible por Interferon alfa, se ha encontrado estimulada en la psoriasis	27.63	0.0027	[20]
CCL5 Chemokine (C-C motif) ligand 15	Atrae monocitos y eosinófilos.	10.97	0.0055	[6]	IFI6 Interferon, alpha-inducible protein 6	Esta proteína es un factor de transcripción llamado Leucine zipper protein. Interactúa con DNA regulador de proteínas en forma de dímero	2.85	0.0170	
CCL19 Chemokine (C-C motif) ligand 19	Atrae células dendríticas (DC) y linfocitos B	10.13	0.0193	[7]	IF135 Interferon-induced protein 35	Esta proteína es un factor de transcripción llamado Leucine zipper protein. Interactúa con DNA regulador de proteínas en forma de dímero	4.88	0.0042	[21]
CXCL9 Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	Atrae linfocitos activados	4.10	0.0264	[6]	IFI44 Interferon-induced protein 44	Esta proteína tiene actividad de proteína quinasa activada por mitógenos (MAP kinase)	6.60	0.0154	[22]
CCL8 Chemokine (C-C motif) ligand 8	Atrae monocitos.	55.01	0.0025	[6]	IFI44 LInterferon-induced protein 44-like		11.60	0.0113	
CXCL10 Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Atrae T cells.	26.44	0.0029	[8]	IFIT1 Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Esta proteína puede funcionar activando la familia de proteínas Rho/Rac a través del Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor	17.77	0.0072	[23]
CXCL11 Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	Atrae linfocitos T inducidos por Interferon gamma o por IL- β	72.82	0.0003	[6]					
CXCL13 Chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant)	Atrae linfocitos B.	10.83	0.0037	[9]					
GENES QUE DISMINUYEN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE ifn β 1 a									
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN β P value	Referencias					
CXCL16 Chemokine (C-X-C motif) ligand 16	Atrae linfocitos T CD8+ y células dendríticas (DC).	3.36	0.0165	[10]					
CXCL3 Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	Proteína inflamatoria GRO gamma, atrae neutrófilos y estructuralmente está relacionada con IL-8	4.18	0.0254	[11]					
CCL20 Chemokine (C-C motif) ligand 20	Atrae neutrófilos células dendríticas inmaduras y linfocitos T y B.	6.49	0.0201	[6]					

Tabla 6.– Continuación.

Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN P value	Referencias
IFIT2 Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	Función no definida aún	11.29	0.0055	
IFIT3 Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	Función no definida aún	8.09	0.0273	
IFIT5 Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	Función no definida aún	2.65	0.022	
ISGF3 Ginterferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	Esta proteína tiene una forma latente y una forma activada sólo actúa como factor de transcripción en su forma activada. Se une al ISGF-3 alfa solamente después de que las células fueron expuestas a IFN-alfa.	2.93	0.0228	NCBI

Familia de antígenos de membrana (CD)

GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN P value	Referencias
CD164 CD164 molecule, sialomucin	Esta proteína de membrana se encuentra en el estroma de células hematopoyéticas progenitoras. Actúa en la interacción celular.	2.98	0.0053	NCBI
CD59 CD59 molecule, complement regulatory protein	Esta proteína de membrana se une a complemento al C8 y C9. Bloquea el ensamblado de complejos que atacan a las membranas celulares.	2.39	0.0469	NCBI
C2BP CD2 (cytoplasmic tail) binding protein 2	Esta proteína de membrana se encuentra en células T activadas y se une al CD58.	1.63	0.0456	NCBI
CD274 CD274 molecule	Esta proteína de membrana es el receptor PD-1. Participa en la co-estimulación de linfocitos	5.58	0.0053	NCBI
CD80 CD80 molecule	Esta proteína de membrana participa en la co-estimulación de linfocitos T se une a CD28 y CD152.	7.42	0.0004	NCBI

GENES QUE DISMINUYEN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN P value	Referencias
CD1A CD1a molecule	Esta proteína de membrana participa en la presentación de antígenos.	2.98	0.0032	NCBI
CD33 CD33 molecule	Esta proteína de membrana participa en la Adhesión celular	3.08	0.0115	NCBI
CD52 CD52 molecule	Función desconocida	1.88	0.0372	NCBI
CD7 CD7 molecule	Esta proteína de membrana participa en la co estimulación de linfocitos T	1.73	0.0210	NCBI
CD300 LB CD300 molecule-like family member b	Función desconocida	3.74	0.0243	NCBI
CD300 LF CD300 molecule-like family member f	Función desconocida	3.65	0.0019	NCBI

Immunoglobulinas

GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN P value	Referencias
LILRA3 Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3	Subfamilia de inmunoreceptores que puede iniciar una cascada de señales estimuladoras.	4.76	0.0141	[24]
LILRB1 Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1	Subfamilia de inmunoreceptores expresada en Monocitos, Linfocitos B y a niveles inferiores en Células Dendríticas y Natural Killers. Contiene un ITIM (inhibitory motif). Puede iniciar una cascada de señales inhibitorias.	5.08	0.0350	[24,25]
LILRB2 Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2	Subfamilia de inmunoreceptores expresada en Monocitos, Linfocitos B y a niveles inferiores en Células Dendríticas y Natural Killers. Contiene un ITIM (inhibitory motif). Puede iniciar una cascada de señales inhibitorias.	4.75	0.0034	[24,25]

GENES QUE DISMINUYEN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN P value	Referencias
FCGR2B Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	Este gen codifica para una proteína que es el receptor de baja afinidad del tipo IIb para la porción Fc de la Inmunoglobulina G (IgG) del suero. Su unión desencadena un amplio rango de eventos. Estos incluyen la activación de células B, endocitosis de complejos antígeno anticuerpo fagocitosis, y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.	3.56	0.0040	[26]
FCGR1 Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha	Este gen codifica para una proteína que es el receptor de la porción Fc de IgG. Esta localizada en los endosomas de las células endoteliales y recicla selectivamente la IgG a la superficie celular protegiendo a la inmunoglobulina del catabolismo lisosomal.	3.21	0.0028	[27]
FCGR2 Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)	Este gen codifica para una proteína que es el receptor de baja afinidad tipo II de la porción Fc de la IgE. Su función es tanto como un receptor de IgE de baja afinidad, como de molécula de adhesión que participa en la atracción entre dos células.	6.66	0.0028	[28]
LAIR2 Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2	Este gen codifica para una proteína que es el receptor de Inmunoglobulina de secreción.	1.66	0.0349	[29]

Complejo Mayor de Histocompatibilidad

GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN P value	Referencias
MR1 Major histocompatibility complex, class I-related	(HLA-A, HLA -B, HLA-C) Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I expone los antígenos en la superficie de las células para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T (CD8+)	1.90	0.0473	[30]
MICB MHC class I polypeptide-related sequence B	Este gen codifica una proteína glicosilada ligada al receptor NGK2D tipo II. Activa la respuesta citolítica en células Natural Killer y linfocitos CD8 alfa y gamma delta es similar al MHC clase I pero no está asociada con β2 microglobulina.	2.42	0.0169	[31]

Respuesta a Virus

GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta Fold change	IFN P value	Referencias
MX1 Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	La proteína MxA es una enzima GTPasa una inducible por Interferon en células humanas que inhibe la multiplicación de virus del tipo RNA, inclusive el virus de la influenza.	9.12	0.0046	[32]
MX2 Myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	La proteína MxA es una enzima GTPasa una inducible por Interferon en células humanas que inhibe la multiplicación de virus del tipo RNA, inclusive el virus de la influenza.	5.05	0.0053	[33]
OAS1 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	Este gen codifica a una proteína miembro de la familia de las 2-5 A synthetase. Esta proteína está involucrada en la respuesta inmune innata a la infección viral. La molécula 2'-5' oligoadenilato resultante de la síntesis activa una Rnasa latente que produce la degradación del RNA y la inhibición de la replicación viral.	7.47	0.0254	[33]
OAS2 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	La expresión de estos dos dominios 69/71 Kda de la 2',5' oligoadenylate sintetasa genera una enzima catalítica activa mediadora de la respuesta antiviral	7.56	0.0072	[34]
INDO Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	La enzima codificada por este gen inducible por Interferon inhibe la síntesis proteica a través de la degradación del triptofano.	36.64	0.0034	[35]

Tabla 6.- Continuación.

Neuropéptidos				Referencias
GENES QUE DISMINUYEN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta IFN Fold change	P value	Referencias
CHK1 Choline kinase alpha	La enzima que codifica éste gen cataliza la fosforilación de la colina para producir fosocolina. Esta enzima también cataliza la fosforilación de etanolamina.	1.85	0.0186	[36]
CHRM3 Cholinergic receptor, muscarinic 3	El gen codifica para los receptores colinérgicos muscarínicos. Según la bibliografía estos receptores se encuentran significativamente aumentados en la Esclerosis Múltiple.	4.50	0.0036	[37]
AREG Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	La proteína pertenece a la familia de Factor de Crecimiento Epidérmico que actúa como factor de crecimiento autocrino y como mitógeno de astrocitos, células de Schwann y fibroblastos.	6.48	0.0254	[38]
AGT Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	La proteína angiotensinógeno es el precursor de angiotensina II. La angiotensina II estimula la producción de Interferon gamma en linfocitos humanos de sangre periférica.	1.39	0.0423	[39]
VIPR1 Vasoactive intestinal peptide receptor 1	El gen codifica para el receptor del Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP). El VIP aumenta la producción de Interleukina 10 y disminuye la producción de IL-12 e Interferon β en células estimuladas por LPS.	2.02	0.0188	[40]
Inmunidad Natural				
GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta IFN Fold change	P value	Referencias
TLR7 Toll-like receptor 7	Este gen codifica para una proteína que un receptor que reconoce los virus RNA de simple cadena.	3.81	0.0043	[41]
Familia del TNF				
GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta IFN Fold change	P value	Referencias
TNFS 10Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TRAIL)	El gen codifica para la proteína TRAIL- que induce rápidamente apoptosis en una variedad de tumores y células transformadas.	11.09	0.0007	[42]
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	Esta proteína es un Factor Activador de Linfocitos B. Importante en la homeostasis de los linfocitos B.	3.47	0.0060	[43]
STAT/JAK				
GENES QUE AUMENTAN SU EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE IFN β 1 a				
Nombre del gen	Función	Respuesta IFN Fold change	P value	Referencias
JAK2 Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)	El gen codifica para la enzima JAK2 una tirosina quinasa asociada al receptor STAT1.	2.05	0.0103	[44]
STAT1 Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	El gen codifica para la proteína STAT1. En la señal inducida por la fosforilación de esta proteína es el primer paso en la transducción y activación de los genes inducidos por Interferon.	4.19	0.0186	[45]

- Fehniger, T.A. and M.A. Caligiuri, Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*, 2001. 97(1): p. 14-32.
- Towne, J.E., et al., Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J Biol Chem*, 2004. 279(14): p. 13677-88.
- Piskin, G., et al., In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol*, 2006. 176(3): p. 1908-15.
- Bacon, K.B., et al., IL-8-induced signal transduction in T lymphocytes involves receptor-mediated activation of phospholipases C and D. *J Immunol*, 1995. 154(8): p. 3654-66.
- Lee, E., et al., Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med*, 2004. 199(1): p. 125-30.
- Simpson, K.J., et al., Chemokines in the pathogenesis of liver disease: so many players with poorly defined roles. *Clin Sci (Lond)*, 2003. 104(1): p. 47-63.
- Robbiani, D.F., et al., The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell*, 2000. 103(5): p. 757-68.
- Karpus, W.J., Chemokines and central nervous system disorders. *J Neurovirol*, 2001. 7(6): p. 493-500.
- Yu, P., et al., B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. *J Immunol*, 2002. 168(10): p. 5117-23.
- Mattoubian, M., et al., A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol*, 2000. 1(4): p. 298-304.
- Haskill, S., et al., Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(19): p. 7732-6.
- Venstrom, K. and L. Reichardt, Beta 8 integrins mediate interactions of chick sensory neurons with laminin-1, collagen IV, and fibronectin. *Mol Biol Cell*, 1995. 6(4): p. 419-31.
- Graham, I.L., et al., Complement receptor 3 (CR3, Mac-1, integrin alpha M beta 2, CD11b/CD18) is required for tyrosine phosphorylation of paxillin in adherent and nonadherent neutrophils. *J Cell Biol*, 1994. 127(4): p. 1139-47.
- Sixt, M., et al., Cell adhesion and migration properties of beta 2-integrin negative polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix molecules. Relevance for leukocyte extravasation. *J Biol Chem*, 2001. 276(22): p. 18878-87.
- Deblandre, G.A., et al., Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth. *J Biol Chem*, 1995. 270(40): p. 23860-6.
- Nguyen, L.H., et al., The human interferon- and estrogen-regulated ISG20/HEM45 gene product degrades single-stranded RNA and DNA in vitro. *Biochemistry*, 2001. 40(24): p. 7174-9.
- Tanaka, S.S., et al., IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev Cell*, 2005. 9(6): p. 745-56.
- Suomela, S., et al., Interferon alpha-inducible protein 27 (IFI27) is upregulated in psoriatic skin and certain epithelial cancers. *J Invest Dermatol*, 2004. 122(3): p. 717-21.
- Lu, R., P.A. Moore, and P.M. Pitha, Stimulation of IRF-7 gene expression by tumor necrosis factor alpha: requirement for NFkappa B transcription factor and gene accessibility. *J Biol Chem*, 2002. 277(19): p. 16592-8.
- Bange, F.C., et al., IFP 35 is an interferon-induced leucine zipper protein that undergoes interferon-regulated cellular redistribution. *J Biol Chem*, 1994. 269(2): p. 1091-8.
- Bhunia, A.K., et al., Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1997. 272(25): p. 15642-9.
- Ye, S., et al., Protein interaction for an interferon-inducible systemic lupus associated gene, IFI1. *Rheumatology (Oxford)*, 2003. 42(10): p. 1155-63.
- Veals, S.A., et al., Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*, 1992. 12(8): p. 3315-24.
- Borges, L., et al., A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol*, 1997. 159(11): p. 5192-6.
- Newman, P.J., Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest*, 1999. 103(1): p. 5-9.
- Maenaka, K., et al., The human low affinity Fcgamma receptors Ila, Iib, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol Chem*, 2001. 276(48): p. 44898-904.
- Jungbans, R.P. and C.L. Anderson, The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(11): p. 5512-6.
- Bonnefoy, J.Y., et al., Structure and functions of CD23. *Int Rev Immunol*, 1997. 16(1-2): p. 113-28.
- Meygaard, L., et al., LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity*, 1997. 7(2): p. 283-90.
- Hashimoto, K., M. Hirai, and Y. Kurosawa, A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes. *Science*, 1995. 269(5224): p. 693-5.
- Dobrovina, E.S., et al., Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J Immunol*, 2003. 171(12): p. 6891-9.
- Kochs, G., et al., MxA GTPase: oligomerization and GTP-dependent interaction with viral RNP target structures. *Methods*, 1998. 15(3): p. 255-63.
- Hartmann, R., G. Walko, and J. Justesen, Inhibition of 2'-5' oligoadenylate synthetase by divalent metal ions. *FEBS Lett*, 2001. 507(1): p. 54-8.
- Marie, I., D. Rebuillat, and A.G. Hovanessian, The expression of both domains of the 69/71 kDa 2',5' oligoadenylate synthetase generates a catalytically active enzyme and mediates an anti-viral response. *Eur J Biochem*, 1999. 262(1): p. 155-65.
- Terajima, M. and A.M. Leporati, Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Antiviral Activity of Interferon-gamma Against Vaccinia Virus. *Viral Immunol*, 2005. 18(4): p. 722-9.
- Rodriguez-Gonzalez, A., et al., Inhibition of choline kinase renders a highly selective cytotoxic effect in tumour cells through a mitochondrial dependent mechanism. *Int J Oncol*, 2005. 26(4): p. 999-1008.
- Anlar, B., et al., Increased muscarinic cholinergic receptor density on CD4+ lymphocytes in progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 1992. 36(2-3): p. 171-7.
- Shoyab, M., et al., Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science*, 1989. 243(4894 Pt 1): p. 1074-6.
- Fernandez-Castelo, S., et al., Angiotensin II regulates interferon-gamma production. *J Interferon Res*, 1987. 7(3): p. 261-8.
- Kodali, S., et al., Vasoactive intestinal peptide modulates Langerhans cell immune function. *J Immunol*, 2004. 173(10): p. 6082-8.
- Nagase, H., et al., Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*, 2003. 171(8): p. 3977-82.
- MacFarlane, M., TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett*, 2003. 139(2-3): p. 89-97.
- Schneider, P., et al., Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J Exp Med*, 2001. 194(11): p. 1691-7.
- Hunter, T., Signal transduction. Cytokine connections. *Nature*, 1993. 366(6451): p. 114-6.
- Silva, C.M., Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene*, 2004. 23(48): p. 8017-23.

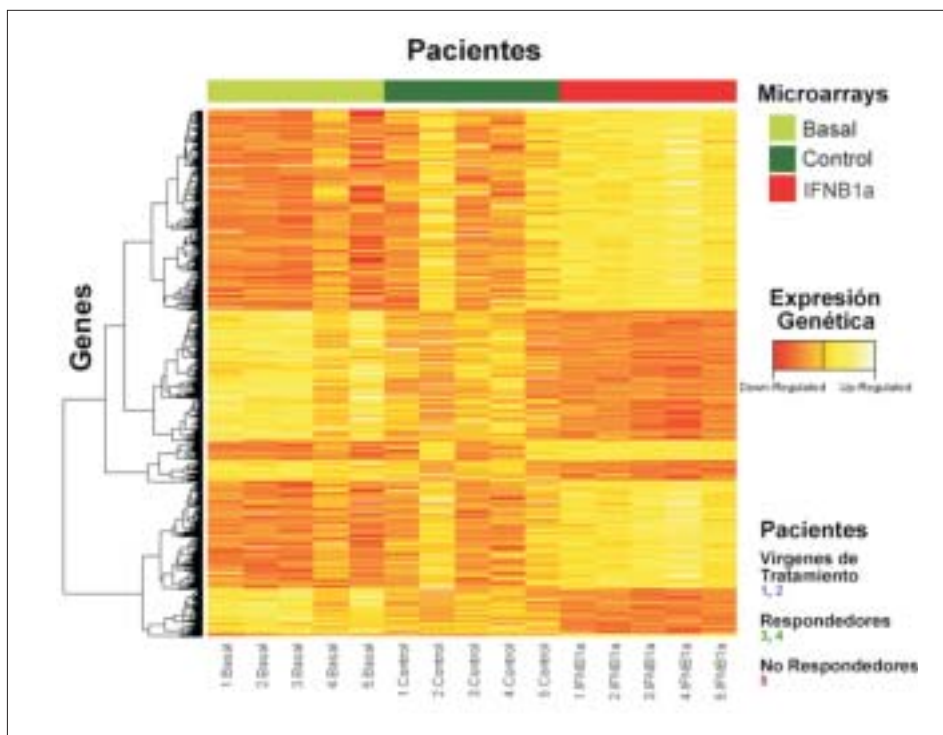


Fig. 2.– Agrupamiento jerárquico de los genes expresados diferencialmente por IFNβ1a.

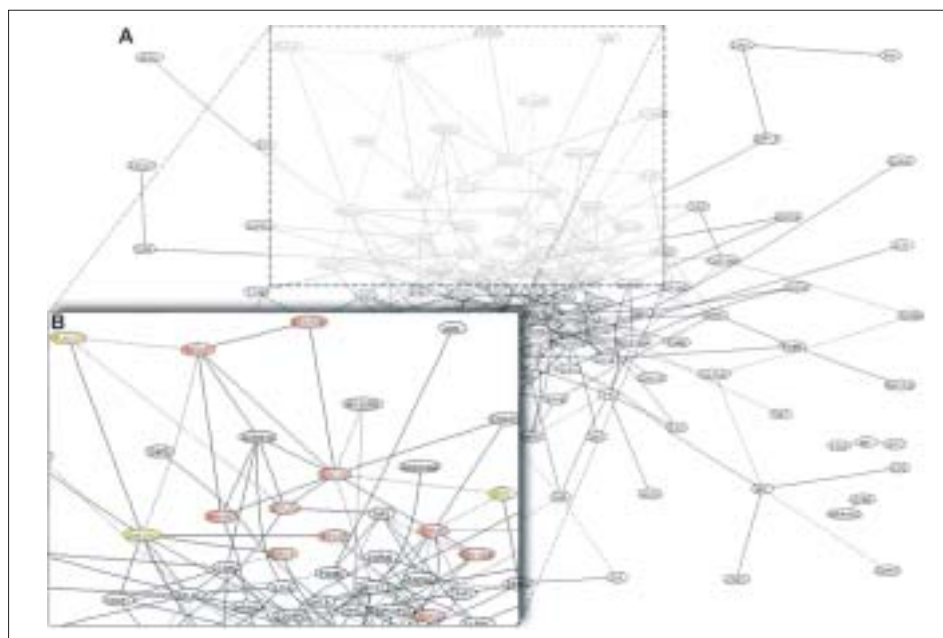


Fig. 3.– Red genética de interacción. Está constituida por 125 nodos (genes) y 289 ejes (interacciones). Para identificar cada gen cotejar con información en tablas 7 y 8.

Discusión

Hasta donde conocemos el presente trabajo es el primero en explorar el efecto del IFNβ1a en leucocitos de pacientes con EMRR a escala del genoma humano completo.

En nuestras condiciones, un número importante de genes aumentó su expresión en respuesta al tratamiento con IFNβ1a mientras que un número marcadamente inferior la disminuyó. Otros estudios que utilizaron metodologías similares, aunque con una representación

Tabla 7.- Lista de los genes diferencialmente expresados (regulados positivamente) que fueron identificados como relacionados con la respuesta inmune.

Gen	GenBank Accession	Descripción	Gen	GenBank Accession	Descripción
CXCL11	NM_005409	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	APOL2	NM_030882	Apolipoprotein L, 2
CD80	CA309689	Homo sapiens, clone IMAGE:4042735, mRNA	IFI44	NM_006417	Interferon-induced protein 44
GBP1	NM_005191	CD80 molecule	LILRA3	NM_006865	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3
	NM_002053	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	PLSCR1	NM_021105	Phospholipid scramblase 1
TNFSF10	NM_003810	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	MICB	NM_005931	MHC class I polypeptide-related sequence B
EIF2AK2	NM_002759	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	IFI6	NM_022873	Interferon, alpha-inducible protein 6
SSTR2	NM_001050	Somatostatin receptor 2	ATOX1	NM_004045	ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)
BST2	NM_004335	Bone marrow stromal cell antigen 2	AW963062	Transcribed locus	
CNP	NM_033133	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	TLR7	BC033651	Toll-like receptor 7
IFIH1	NM_022168	Interferon induced with helicase C domain 1	CCL19	NM_006274	Chemokine (C-X-C motif) ligand 19
IFITM1	NM_003641	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	PSME2	NM_002818	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)
CFB	NM_001710	Complement factor B	PARP3	NM_005485	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3
RAD51L1	AA502404	RAD51-like 1 (S. cerevisiae)	PDCD1LG2	NM_025239	Programmed cell death 1 ligand 2
ISG20	NM_002201	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	DDB2	NM_000107	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa
OAS2	BC049215	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	ISGF3G	NM_006084	Interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa
CCL8	NM_005623	Chemokine (C-C motif) ligand 8	IFIT5	NM_012420	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5
IFI27	T47364	Interferon, alpha-inducible protein 27	IL1F9	NM_019618	Interleukin 1 family, member 9
CXCL10	NM_001565	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	OAS1	NM_016816	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
AIM2	NM_004833	Absent in melanoma 2	FAS	NM_000043	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
IFITM1	NM_003641	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	MX2	A1689685	Myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)
ISG15	NM_005101	ISG15 ubiquitin-like modifier	GBP5	NM_052942	Guanylate binding protein 5
IFI27	NM_005532	Interferon, alpha-inducible protein 27	TAP2	NM_018833	Transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
FXYD1	NM_021902	FXYD domain containing ion transport regulator 1 (phospholemman)	PML	AW514654	Promyelocytic leukemia
INDO	NM_002164	Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	CXCL9	NM_002416	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
LY6E	NM_002346	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	SLC1A2	NM_004171	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
IFI35	NM_005533	Interferon-induced protein 35	MGLL	NM_007283	Monoglyceride lipase
LILRB2	NM_006840	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2	IFIT3	NM_001549	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
SERPING1	NM_000062	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	IL2RA	NM_000417	Interleukin 2 receptor, alpha
CXCL13	NM_006419	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemottractant)	SP140	NM_007237	SP140 nuclear body protein
TAP1	NM_000593	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	PSMB8	NM_148919	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)
GCH1	NM_000161	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)	RAD9A	NM_004584	RAD9 homolog A (S. pombe)
ENPP2	NM_006209	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	BPHL	BF512259	Biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase; breast epithelial mucin-associated antigen)
TREX1	NM_016381	Three prime repair exonuclease 1	SNN	NM_003498	Stannin
BRDG1	NM_012108	BCR downstream signaling 1	ATF6	BX538263	Activating transcription factor 6
DDX58	NM_014314	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	AGRN	BM991197	Agtrin
CYBB	AA258768	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	UBD	NM_006398	Ubiquitin D
PYHIN1	NM_005531	Pyrin and HIN domain family, member 1	LILRB1	NM_006847	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1
CLEC2D	NM_013269	C-type lectin domain family 2, member D	ADAR	NM_015841	Adenosine deaminase, RNA-specific
NBN	BX640816	Nibrin	STAT1	AW189008	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
MX1	NM_002462	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	SOAT1	NM_003101	Sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1
CD274	NM_014143	CD274 molecule	HSPB9	AK093488	Heat shock protein, alpha-crystallin-related, B9
CD164	NM_006016	CD164 molecule, sialomucin	APOBEC3F	NM_021822	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F
PSME2	NM_002818	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	EBI3	NM_005755	Epstein-Barr virus induced gene 3
LGALS3BP	NM_005567	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	IFITM3	NM_021034	Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)
CCL15	NM_032964	Chemokine (C-C motif) ligand 15	EGLN1	A1208803	Egl nine homolog 1 (C. elegans)
FANCL	NM_018062	Fanconi anemia, complementation group L	BARD1	NM_000465	BRCA1 associated RING domain 1
IRF7	NM_004031	Interferon regulatory factor 7	IL15	NM_000585	Interleukin 15
IFIT1	NM_001548	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	CMKLR1	NM_004072	Chemokine-like receptor 1
TOR1B	NM_014506	Torsin family 1, member B (torsin B)	CMTM5	NM_138460	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5
SLAMF1	NM_003037	Signaling lymphocytic activation molecule family member 1	PSMB10	NM_002801	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10
DNAJA1	NM_001539	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	CD2BP2	NM_006110	CD2 (cytoplasmic tail) binding protein 2
CLDND1	NM_019895	Claudin domain containing 1	TRIM22	NM_006074	Tripartite motif-containing 22
DEFB1	NM_005218	Defensin, beta 1	EXOSC9	NM_005033	Exosome component 9
KIF1B	NM_015074	Kinesin family member 1B	RAD51L3	NM_002878	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)
PSMB9	NM_002800	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)	CD59	NM_203331	CD59 molecule, complement regulatory protein
NMI	NM_004688	N-myc (and STAT) interactor	MR1	NM_001531	Major histocompatibility complex, class I-related
GBP1	NM_018284	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	PLA2G7	NM_005084	Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)
IFIT2	BF511134	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	GTF2H1	NM_005316	General transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa

Tabla 8.— Lista de los genes diferencialmente expresados (regulados negativamente) que fueron identificados como relacionados con la respuesta inmune.

Gen	GenBank Accession	Descripción
IL4R	AW449273	Interleukin 4 receptor
GNAS	BU789185	GNAS complex locus
SULT1A3	NM_003166	Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 3
FOS	NM_005252	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
ALPL	NM_000478	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
NR4A2	NM_006186	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
AGT	W03663	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
PRMT1	NM_198319	Protein arginine methyltransferase 1
CLEC10A	NM_006344	C-type lectin domain family 10, member A
OLR1	A1694722	Oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
VEGF	BC058855	Vascular endothelial growth factor
PLAUR	NM_002659	Plasminogen activator, urokinase receptor
TREM1	NM_018643	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
C1AS1	NM_004895	Cold autoinflammatory syndrome 1
GJB6	NM_006783	Gap junction protein, beta 6 (connexin 30)
SEPT5	NM_000407	Septin 5
P2RX1	NM_002558	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1
RECQL4	NM_004260	RecQ protein-like 4
CXCL3	NM_002090	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
CIDEB	NM_014430	Cell death-inducing DFFA-like effector b
CUGBP2	BM677882	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2
CNGA2	NM_005140	Cyclic nucleotide gated channel alpha 2
PPBP	NM_002704	Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)
CD7	NM_006137	CD7 molecule
CCL20	NM_004591	Chemokine (C-C motif) ligand 20
OXT	NM_000915	Oxytocin, prepro- (neurophysin I)
VIPR1	NM_004624	Vasoactive intestinal peptide receptor 1
PXK	BF509422	PX domain containing serine/threonine kinase
CMTM2	NM_144673	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2
FTH1	N47412	Ferritin, heavy polypeptide 1
HNMT	NM_006895	Histamine N-methyltransferase
NEIL1	NM_024608	Nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)
ZGPAT	AW025368	Zinc finger, CCCH-type with G patch domain
PSTPIP1	NM_003978	Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1
SGK	NM_005627	Serum/gluocorticoid regulated kinase
CRIP1	NM_001311	Cysteine-rich protein 1 (intestinal)
DHRS3	NM_004753	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3
WDR1	A1247365	WD repeat domain 1
	A1285914	Transcribed locus
AIF1	NM_032955	Allograft inflammatory factor 1
TLN1	AA872674	Talin 1
ABCG1	A1034441	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
KCNQ1	NM_181797	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
MAPKAPK3	NM_004635	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3
	AW293444	CDNA clone IMAGE:5270500
MSRA	NM_012331	Methionine sulfoxide reductase A
ADORA2B	NM_000676	Adenosine A2b receptor
RASGRP4	NM_052949	RAS guanyl releasing protein 4
IL23A	NM_016584	Interleukin 23, alpha subunit p19
LOC646533	H95091	Hypothetical protein LOC646533
S100A8	NM_002964	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
LST1	NM_007161	Leukocyte specific transcript 1
SORT1	AK000757	Sortilin 1
FCGR2B	U90938	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)
NALP12	NM_033297	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 12
CD1A	NM_001763	CD1a molecule
IMPDH1	NM_000883	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1
FCER2	NM_002002	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
FCGR1	NM_004107	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha
IL8RA	NM_000634	Interleukin 8 receptor, alpha
S100A12	NM_005621	S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C)
BST1	NM_004334	Bone marrow stromal cell antigen 1

parcial del genoma, mostraron proporciones de cambio comparables a las aquí descritas^{28, 29}.

Debe tomarse en consideración que se trata de un estudio realizado sobre un grupo heterogéneo de pacientes y en número reducido. Sin embargo, empleando métodos estadísticos adecuados, es posible generar hipótesis válidas que deberán ser investigadas en poblaciones más homogéneas. Por otro lado, el tiempo de incubación seleccionado para medir los cambios en la expresión génica podría estar omitiendo la pérdida de cambios transitorios tempranos y/o tardíos; de todos modos es muy probable que la mayoría de los genes regulados por IFN β muestren cambios a las 24 horas²⁹; éste tiempo es frecuentemente utilizado en la evaluación de citoquinas. Por último, la metodología utilizada para el enriquecimiento en linfocitos, siendo la usual, no permite una purificación absoluta de estas células.

El tratamiento de la EM con IFN β está establecido desde hace más de una década⁸. Sin embargo, aún no han sido claramente dilucidados sus mecanismos de acción ni la fisiopatología de la enfermedad. Un área sumamente activa de investigación en EM es el estudio de la participación del sistema inmune y particularmente de las citoquinas en su fisiopatología. Las citoquinas regulan todas las fases de la respuesta inmune, actuando en redes parácrinas y autócrinas de gran complejidad³⁰. Un estado de homeostasis es mantenido cuando los estímulos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios están balanceados. En la EM se ha observado una pérdida de este delicado equilibrio³¹. En el presente trabajo resulta interesante resaltar que varios de los cambios observados en la expresión de los genes de citoquinas parecen compensar las variaciones que, en sentido contrario, han sido comunicadas como desreguladas en la EM por otros autores. Por ejemplo, se ha reportado que en pacientes con EM las células dendríticas producen niveles elevados de IL-23³², y el bloqueo de esta citoquina resultó eficaz en modelos animales de EM³³. En nuestro experimento observamos que el tratamiento con IFN β 1a redujo 3 veces la expresión de esta citoquina. Por otra parte los astrocitos juegan un rol importante en la regulación de la migración leucocitaria al SNC y, mediante la expresión de CCL20, permitirían el ingreso al SNC de células dendríticas inmaduras que participarían de los mecanismos inflamatorios de la EM³⁴. Además, en PBMC de pacientes con EM se encuentran niveles elevados de CCL20³⁵. Nuestra observación de que el tratamiento con IFN β 1a disminuyó en más de 6 veces la expresión de esta quimioquina, podría estar ilustrando un posible mecanismo de acción terapéutico que resulta consistente con el rol de CCL20 en la EM, sugerido por esos autores. También la activación del complemento, mediante el ensamblado del complejo terminal, juega un rol importante en la patogénesis de la EM³⁶; niveles subléxicos de este complejo podrían evitar la apoptosis de oligodendrocitos³⁸. El

Efecto interferón aumentó la expresión de CD59, y esto, considerando que CD59 es el principal regulador del complemento bloqueando su ensamblado³⁷, podría estar explicando otro mecanismo de acción del IFN β . Adicionalmente los pacientes con EM, durante períodos de remisión de la enfermedad, expresan niveles aumentados de IL-10, interleuquina que inhibe la activación de células T³⁹. En este mecanismo inhibitorio juega un rol importante el receptor LILRB2 que se expresa en respuesta a IL-10⁴⁰. Nuestra observación de un aumento de LILRB2 de casi 5 veces podría ilustrar otro mecanismo inmunomodulatorio del IFN β .

Si bien los ejemplos mencionados permiten generar algunas hipótesis que expliquen el efecto beneficioso del IFN β en la EM, su comprensión integral es compleja. Para ilustrar mejor esta dificultad, mencionaremos algunas evidencias que parecerían ser contradictorias con lo esperado. Hay genes que han mostrado tener una expresión aumentada en pacientes con EM⁴¹, sin embargo en nuestro estudio, algunos de estos genes aumentaron su expresión por efecto del IFN β 1a. Por ejemplo, las quimiocinas linfocitarias CCL19^{42, 43} y CXCL13^{44, 45} están sobre-expresadas en el SNC de pacientes con EM y en la encefalomielite alérgica experimental, donde jugarían un rol en la perpetuación de la reacción autoinmune mediante la migración de linfocitos efectores. Llamativamente, encontramos una expresión aumentada 10 veces de ambas quimiocinas como efecto del tratamiento con IFN β 1a, corroborando esta dificultad en la comprensión de los complejos mecanismos involucrados. También es llamativa la inducción observada en la expresión de IL-15 y de su receptor luego de la exposición a IFN β 1a; siendo que esta citoquina proinflamatoria está implicada en la patogénesis de la enfermedad y se encuentra aumentada en suero y LCR de los pacientes⁴⁶.

Los modelos gráficos de interacción entre genes, llamados también redes genéticas, brindan un marco para el análisis estadístico en el que pueden plantearse inferencias funcionales y reconocer posibles interacciones mecanísticas entre los numerosos genes que modifican su expresión por un tratamiento específico^{27, 47}. El escrutinio farmacogenómico de una molécula con acción pleiotrópica como el IFN β da por resultado una vasta información que debe ser integrada para vislumbrar mecanismos biológicamente relevantes. En el presente trabajo desarrollamos un análisis exploratorio mediante la construcción de una red de co-expresión de genes con anotación funcional del sistema inmune que nos permitió identificar nodos con probable asociación funcional. En este sentido, la subred que identificamos con centro en el gen CXCL3 resultaría ilustrativa de una de las acciones del IFN β 1a en la EM. La mayoría de las proteínas que aparecen vinculadas en esta subred tienen acción pro-inflamatoria y han sido implicadas en diferentes aspectos de la fisiopatología de la EM^{34, 48, 49}. Es importante

destacar que, en nuestro análisis, diversos genes pro-inflamatorios, vinculados entre sí en la subred, como CXCL3, CCL20, TREM1, FCGRT2, IL8RA, HTNM y PMRT1, disminuyeron su expresión en respuesta al IFN β 1a, mientras que otros genes con acción anti-inflamatoria (IFIT2) o moduladora (CMKLR) la aumentaron, dando plausibilidad biológica al agrupamiento que produjo nuestro modelo.

En conclusión, mediante un método de análisis multidisciplinario que permite evaluar en forma simultánea complejos fenómenos biológicos, el presente estudio nos permitió caracterizar cambios inducidos por IFN β 1a en los niveles de expresión a escala de genoma humano completo, dando lugar a la formulación de hipótesis sobre los mecanismos farmacodinámicos involucrados en la compleja acción terapéutica de esta molécula en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple. Esta metodología aporta nuevos y valiosos conocimientos que podrían optimizar conductas terapéuticas así como identificar marcadores pronósticos de respuesta. Estudios adicionales permitirán evaluar estas hipótesis.

Agradecimientos: Deseamos agradecer a los pacientes que aceptaron participar en el estudio. También, queremos agradecer al personal profesional y técnico de Bio Sidus. PRB es miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

Bibliografía

1. Cooper, G.S. and B.C. Stroehla, *The epidemiology of autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2003. 2(3): p. 119-25.
2. Dyment, D.A., G.C. Ebers, and A.D. Sadovnick, *Genetics of multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2004. 3(2): p. 104-10.
3. Sospedra, M. and R. Martin, *Immunology of multiple sclerosis*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 683-747.
4. Dore-Duffy, P., R. Washington, and L. Dragovic, *Expression of endothelial cell activation antigens in microvessels from patients with multiple sclerosis*. Adv Exp Med Biol, 1993. 331: p. 243-8.
5. Javed, A. and A.T. Reder, *Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis*. Pharmacol Ther, 2006. 110(1): p. 35-56.
6. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. 147 (927): p. 258-67.
7. De Clercq, E., *Interferon: ten stories in one. A short review of some of the highlights in the history of an almost quinquagenarian*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2005. 52 (3-4): p. 273-89.
8. Sibley, W. and I.M.S.S. Group, *Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group*. Neurology, 1993. 43 (4): p. 655-61.
9. Branca, A.A., et al., *Interaction of interferon with cellular receptors. Internalization and degradation of cell-bound interferon*. J Biol Chem, 1982. 257 (22): p. 13291-6.
10. Plataniias, L.C. and O.R. Colamonici, *Interferon alpha induces rapid tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of its receptor*. J Biol Chem, 1992. 267 (33): p. 24053-7.

11. McRae, B.L., et al., *Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development*. J Immunol, 1998. 160(9): p. 4298-304.
12. Kozovska, M.E., et al., *Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS*. Neurology, 1999. 53(8): p. 1692-7.
13. Stone, L.A., et al., *The effect of interferon-beta on blood-brain barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis*. Ann Neurol, 1995. 37(5): p. 611-9.
14. Satoh, J., D.W. Paty, and S.U. Kim, *Differential effects of beta and gamma interferons on expression of major histocompatibility complex antigens and intercellular adhesion molecule-1 in cultured fetal human astrocytes*. Neurology, 1995. 45(2): p. 367-73.
15. Baranzini, S.E., et al., *Transcription-based prediction of response to IFNbeta using supervised computational methods*. PLoS Biol, 2005. 3(1): p. e2.
16. Allison, D.B., et al., *Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus*. Nat Rev Genet, 2006. 7(1): p. 55-65.
17. Dahl, E., et al., *Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2006. 12(13): p. 3950-60.
18. Mense, S.M., et al., *Gene expression profiling reveals the profound upregulation of hypoxia-responsive genes in primary human astrocytes*. Physiol Genomics, 2006. 25(3): p. 435-49.
19. Massa, V., et al., *Valproic acid-induced skeletal malformations: associated gene expression cascades*. Pharmacogenet Genomics, 2005. 15(11): p. 787-800.
20. Michelson, S., *The impact of systems biology and biosimulation on drug discovery and development*. Mol Biosyst, 2006. 2(6-7): p. 288-91.
21. McDonald, W.I., et al., *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2001. 50(1): p. 121-7.
22. Wettenhall, J.M. and G.K. Smyth, *limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data*. Bioinformatics, 2004. 20(18): p. 3705-6.
23. Dudoit, S., R.C. Gentleman, and J. Quackenbush, *Open source software for the analysis of microarray data*. Biotechniques, 2003. Suppl: p. 45-51.
24. Hochberg, Y. and Y. Benjamini, *More powerful procedures for multiple significance testing*. Stat Med, 1990. 9(7): p. 811-8.
25. Thomas, P.D., et al., *PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function*. Genome Res, 2003. 13(9): p. 2129-41.
26. Dennis, G., Jr., et al., *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. Genome Biol, 2003. 4(5): p. P3.
27. Schafer, J. and K. Strimmer, *An empirical Bayes approach to inferring large-scale gene association networks*. Bioinformatics, 2005. 21(6): p. 754-64.
28. Satoh, J., et al., *Microarray analysis identifies a set of CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early IFNbeta-responsive genes in peripheral blood lymphocytes in vitro: an implication for IFNbeta-related adverse effects in multiple sclerosis*. BMC Neurol, 2006. 6: p. 18.
29. Weinstock-Guttman, B., et al., *Genomic effects of IFN-beta in multiple sclerosis patients*. J Immunol, 2003. 171(5): p. 2694-702.
30. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. 354(6): p. 610-21.
31. Gallo, P., et al., *A longitudinal study on IL-2, sIL-2R, IL-4 and IFN-gamma in multiple sclerosis CSF and serum*. J Neurol Sci, 1991. 101(2): p. 227-32.
32. Vaknin-Dembinsky, A., K. Balashov, and H.L. Weiner, *IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production*. J Immunol, 2006. 176(12): p. 7768-74.
33. Chen, Y., et al., *Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis*. J Clin Invest, 2006. 116(5): p. 1317-26.
34. Ambrosini, E., et al., *Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. 64(8): p. 706-15.
35. Furlan, R., et al., *Immunological patterns identifying disease course and evolution in multiple sclerosis patients*. J Neuroimmunol, 2005. 165(1-2): p. 192-200.
36. Rus, H., C. Cudrici, and F. Niculescu, *C5b-9 complement complex in autoimmune demyelination and multiple sclerosis: dual role in neuroinflammation and neuroprotection*. Ann Med, 2005. 37(2): p. 97-104.
37. Mead, R.J., et al., *Deficiency of the complement regulator CD59a enhances disease severity, demyelination and axonal injury in murine acute experimental allergic encephalomyelitis*. Lab Invest, 2004. 84(1): p. 21-8.
38. Cudrici, C., et al., *C5b-9 terminal complex protects oligodendrocytes from apoptotic cell death by inhibiting caspase-8 processing and up-regulating FLIP*. J Immunol, 2006. 176(5): p. 3173-80.
39. Perrella, O., et al., *Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha: model of immunomodulation in multiple sclerosis*. Neurol Res, 2006. 28(2): p. 193-5.
40. Beinhauer, B.G., et al., *Interleukin 10 regulates cell surface and soluble LIR-2 (CD85d) expression on dendritic cells resulting in T cell hyporesponsiveness in vitro*. Eur J Immunol, 2004. 34(1): p. 74-80.
41. van Baarsen, L.G., et al., *A subtype of multiple sclerosis defined by an activated immune defense program*. Genes Immun, 2006.
42. Columba-Cabezas, S., et al., *Lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 are expressed in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the maintenance of chronic neuroinflammation*. Brain Pathol, 2003. 13(1): p. 38-51.
43. Giunti, D., et al., *Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS*. J Leukoc Biol, 2003. 73(5): p. 584-90.
44. Krumbholz, M., et al., *Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment*. Brain, 2006. 129(Pt 1): p. 200-11.
45. Bagaeva, L.V., et al., *CXC chemokine ligand 13 plays a role in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2006. 176(12): p. 7676-85.
46. Rentzos, M., et al., *IL-15 is elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2006. 241(1-2): p. 25-9.
47. Barabasi, A.L. and Z.N. Oltvai, *Network biology: understanding the cell's functional organization*. Nat Rev Genet, 2004. 5(2): p. 101-13.
48. Omari, K.M., et al., *CXC chemokine receptors on human oligodendrocytes: implications for multiple sclerosis*. Brain, 2005. 128(Pt 5): p. 1003-15.
49. Ulvestad, E., et al., *Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for the Fc part of IgG*. J Neurol Sci, 1994. 121(2): p. 125-31.