Universidad de La Laguna
Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado

Fundación Carolina

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias
Universidad de La Laguna

Análisis transcripcional de la respuesta inmune en órganos diana de la leishmaniasis

Memoria Trabajo de Fin de Máster

Génesis Palacios Cortés

Dra. Emma Carmelo Pascual
Tutora
Dra. Raquel Diaz Solano
Cotutora

Máster en Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Tropicales
Universidad de la Laguna
2017-2018

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....3
ABSTRACT.....5
INTRODUCCIÓN.....6
HIPÓTESIS Y OBJETIVO 9
MATERIALES Y MÉTODOS.....10
Modelo experimental.....10
Análisis de la expresión génica.....10
Procesamiento de los datos y análisis estadístico.....11
Mapa de genes.....11
RESULTADOS.....12
Análisis del peso del hígado y de la carga parasitaria a las 24 horas post-infección (hpi).....12
Expresión génica debido a la infección con *L. infantum* de ratones BALB/c tras 24 horas post infección (R1/NR1) 12
DISCUSIÓN.....19
CONCLUSIONES.....23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....24
ANEXOS.....27
1. PROTOCOLOS 27
1.1 Extracción del ARN 27
1.2. Determinación de la pureza, integridad y cuantificación del ARN extraído 27
1.3. Retrotranscripción.....28
1.4. Amplificación por qPCR.....28
1.5. Procesamiento de los datos.....28
1.6. Análisis estadístico.....30
TABLA A1. Lista de los 112 genes estudiados.....31
A2. Resultados del análisis realizado con STRING.....34
TABLA A3. Funciones de los genes con EGD estadísticamente significativa.....35

ABREVIATURAS

CCR	*chemokine (C-C motif) receptor*
CD	antígeno de diferenciación (*cluster of differentiation*)
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CXCR	*chemokine (C-X-C motif) receptor*
DC	célula dendrítica (*dendritic cell*)
dpi	Día post infección
EG	expresión génica
EGD	expresión génica diferencial
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
h	horas
hpi	Horas post infección
IFN-γ	interferón gamma
iNOS o NOS2	óxido nítrico sintasa
KC	células de Kupffer
Log	Logaritmo
MIP	*Macrophage Inflammatory Protein*
Mo	Monocito
Myd88	*myeloid differentiation primary response gene 88*
NF-κB	factor nuclear *kappa* de la cadena ligera potenciador de las células B activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
NO	óxido nítrico (*nitric oxid*)
NK	*Natural killer*
NKT	*Natural killer T*
NR1	Ratones no infectados sacrificados
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PMN	Polimorfonuclear neutrófilo
qPCR	*quantitative polymerase chain reaction*

RNA-Seq	RNA sequencing
RNAm	ácido ribonucleico mensajero
R1	Ratones infectados y sacrificados
SD	Desviación estándar
STAT	*signal transducer and activator of transcription*
TGF-β	*factor de crecimiento transformante beta*
Th1	linfocitos T cooperadores de tipo 1 (*T helper cells Type 1*)
Th2	linfocitos T cooperadores de tipo 2 (T helper cells Type 2)
TLR	receptor *toll-like*
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor-alpha)
VL	Leishmaniasis visceral

Análisis transcripcional de la respuesta inmune en órganos diana de la leishmaniasis

ABSTRACT

The study of the immunological mechanisms in the infection by *Leishmania sp*, requires the evaluation of the gene expression *in vivo*, many studies have provided information about what happens at the *in vitro* level, but the knowledge of the changes at the transcriptome level using the murine model, from tissue of the affected organ, in this case the liver, would allow to obtain an overview of gene expression and a better approach to the immune response in humans. Therefore, in the present study it was proposed to know the gene expression in a first moment of the infection (at 24 hours), from liver tissue of BALB/c mice infected with *L. infantum*, and samples from uninfected mice as control group. From the RNA extraction and with the retrotranscription products, High-throughput Real-time quantitative PCR was performed to know the expression of 112 genes related to the immune response. Among the main findings, it is possible to highlight that 24 hours post infection predominates the expression of genes involved in the inflammatory response of macrophage activation (M1) where *Stat1* seems to have a central role in the innate immune response, since it connects the genes involved in the production of IFN-γ with the genes related to leukocyte chemotaxis. At this time of infection, chemotactic signals have already been generated for T lymphocytes, NK cells and monocytes. Additionally, the detection of costimulatory molecules such as CD40/CD40LG would indicate that activation of $CD4^+$ T lymphocytes is taking place. It also highlights the overexpression of *Ifng* and *Nos2*, which It indicates that it would be producing macrophage activation by the classical pathway, important for infection control mechanism in the liver.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral, es una de las formas clínicas de leishmaniasis, causada principalmente por el protozoario intracelular *Leishmania donovani* o *Leishmania infantum*. Esta forma clínica de leishmaniasis tiene una incidencia de 0,5 millones de casos nuevos al año (1) y causa más de 50000 muertes anuales, cifra que entre las enfermedades parasitarias solo es superada por el paludismo (2).

El modelo animal más utilizado en el estudio de la respuesta inmune frente a la leishmaniasis ha sido el murino, fundamentalmente de las cepas BALB/c y C57BL/6. Cuando se reproduce la infección en el modelo experimental, se produce una respuesta inmune en los principales órganos afectados, hígado y bazo. En el hígado, se da la formación de infiltrados celulares o granulomas inflamatorios alrededor de los macrófagos infectados. En este proceso participan las células de Kupffer (KC) las cuales son los principales macrófagos tisulares que recubren los sinusoides hepáticos y son el principal blanco de la infección por cepas de *Leishmania* causantes de leishmaniasis visceral (VL). La formación del granuloma es un proceso dependiente de la producción de quimiocinas, el reclutamiento posterior de monocitos, neutrófilos, células T CD4$^+$ y células T CD8$^+$, producción de citoquinas inflamatorias y activación de células infectadas (3) (Figura 1).

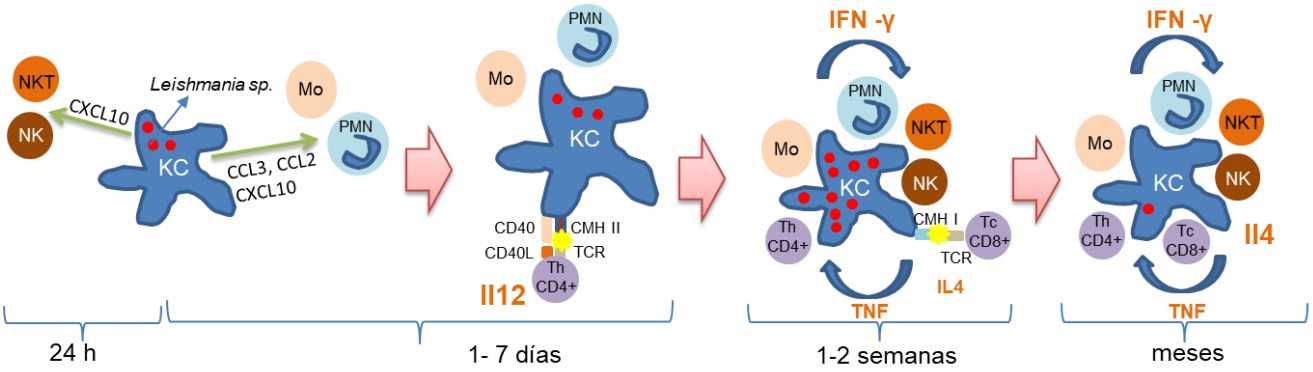

Figura 1. Etapas en la formación del granuloma en el hígado y principales citoquinas involucradas. Cuando ocurre la infección, se secretan inicialmente CCL3, CCL2 y CXCL10 posiblemente por KC infectadas (4); esto genera el reclutamiento inicial de monocitos y neutrófilos, los cuales son críticos para el control efectivo del crecimiento del parásito. Otras células de respuesta inmune innata también se encuentran implicadas en la formación del granuloma, entre ellas las células NK y NKT debido a que son capaces de producir citoquinas inflamatorias como el IFN-γ. Por otro lado, los linfocitos T, son reclutados hacia el granuloma en formación, en respuesta a diversos estímulos de quimiocinas y citoquinas después del reclutamiento de monocitos y neutrófilos. Hacia la primera semana post infección, se da el reclutamiento de células T CD4$^+$ y CD8$^+$ con la sobreexpresión de CMH de clase II por parte de las KC para facilitar la interacción con las células T CD4$^+$ (5). El granuloma proporciona un entorno inflamatorio en el que se secretan TNF e IFN-γ, promoviendo la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) e intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI), por parte de las KC infectadas para la destrucción del parásito (6). Tras la segunda semana post infección se alcanza un pico de carga parasitaria en las células que fueron infectadas. Cuando han pasado 4 semanas posterior a la infección, se observan granulomas maduros que proporcionan un ambiente inflamatorio para la eliminación parasitaria, aunque no se alcance la curación completa. Las principales citoquinas involucradas en la formación del granuloma son las que se encuentran dentro del perfil Th1, entre ellas la IL-12, IFN-γ, TNF y linfotoxina (LT), Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e

IL-2. El desarrollo del granuloma requiere producción de IFN-γ dependiente de IL-12 por células T, para la activación de monocitos y células T (7). Para la resolución de la infección en el hígado, se requiere de citoquinas del perfil Th2, como la IL-4, para la activación de células T CD8+ (8)

Para comprender los principales eventos que ocurren en la infección por *Leishmania*, también es importante conocer los perfiles de activación de macrófagos. Puede ocurrir la activación clásica del macrófago (M1), con el objetivo de eliminar el parásito o la activación alternativa del macrófago (M2), que favorece la proliferación intracelular del parásito. (Figura 2)

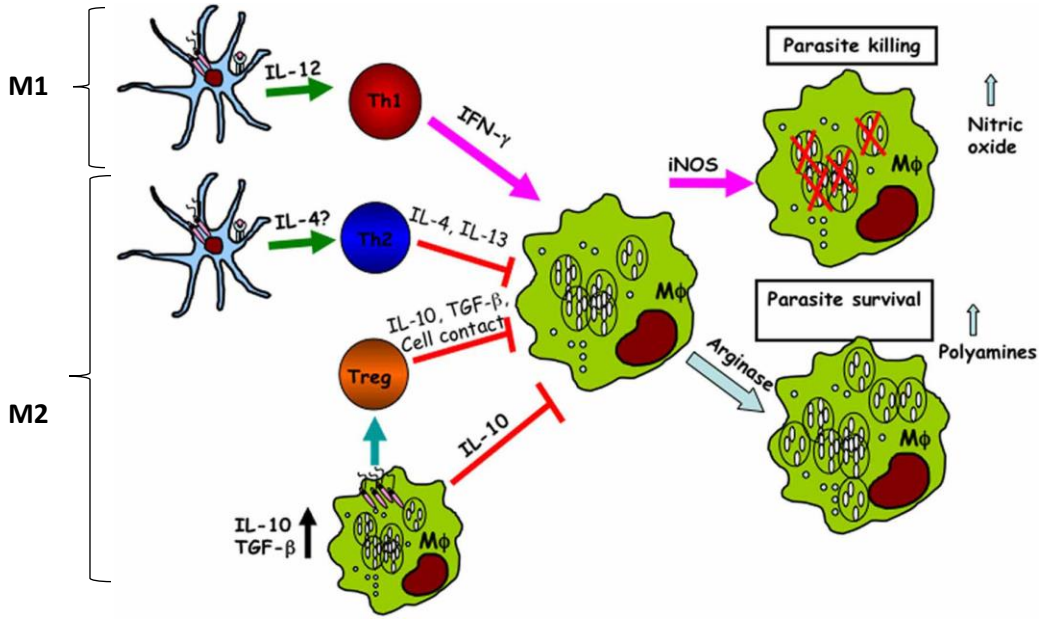

Figura 2. Perfiles de activación de macrófagos: M1 o activación clásica de macrófagos y M2 o activación alternativa de macrófagos. En la activación clásica del macrófago (M1), ocurre que, después de la infección, tanto los macrófagos como las células dendríticas, fagocitan *Leishmania*, lo que puede conducir, por un lado, a que las células dendríticas infectadas produzcan IL-12, que es fundamental para el desarrollo de células CD4+ productoras de IFN-γ. El IFN-γ actúa sobre los macrófagos infectados y conduce a su activación (activación clásica), a la regulación positiva de iNOS y a la producción de óxido nítrico y otros radicales libres que son importantes para la muerte de parásitos intracelulares. En la activación alternativa del macrófago (M2) se produce IL-4 por otros tipos de células (que incluyen los queratinocitos) y es compatible con el desarrollo de células CD4+. Las células Th2 producen IL-4 e IL-13, lo que conduce a la regulación positiva de la actividad de la arginasa y la producción de poliaminas que favorecen la proliferación del parásito intracelular. Además, las células T reguladoras naturales (Treg) y los macrófagos infectados también producen algunas citoquinas inmunorreguladoras que incluyen IL-10 y TGF-β, que desactivan aún más las células infectadas lo que conduce a la destrucción del parásito. Adaptado de Liu D, Uzonna JE. 2012.

Aunque es en el hígado donde ocurre la infección aguda que termina por resolverse y se genera poco daño tisular (9), en el bazo se desarrolla la infección crónica conduciendo a la esplenomegalia, a la supresión de la respuesta inmune y persistencia del parásito (4). El estudio de la respuesta inmune en la leishmaniasis visceral se ha enfocado principalmente en el bazo, sin embargo, la comprensión del desarrollo de la inmunidad en el hígado, podría conducir a medios potenciales para mejorar la eliminación del parásito en el bazo (3).

Se han abordado diferentes metodologías para estudiar la respuesta inmune frente a esta enfermedad y el análisis de la expresión génica de moléculas que estarían relacionadas con las células implicadas en la respuesta Th1/Th2 al parásito. Es importante mencionar que en el modelo murino, se ha visto que la expresión de algunos mRNA (como Il12, Il10, IFN-γ, TLR2-4, TNF-α) tiene buena correlación con la expresión de las proteínas respectivas (10). Entre los enfoques más empleados para el estudio de la expresión génica, el más utilizado actualmente ha sido el perfil transcripcional usando *RNA-seq* (11,12) y PCR en tiempo real (13–15), sin embargo todos ellos se han realizado en modelo *in vitro*. Para tener una mejor aproximación a la respuesta inmune, en este estudio se emplea el modelo *in vivo* con ratones BALB/c infectados con *L. infantum* para el análisis de la expresión génica a las 24 horas post infección.

La metodología empleada en este estudio está basada en PCR en tiempo real mediante tecnología OpenArray, para la amplificación de 112 genes relacionados con la respuesta inmune del ratón, siendo una tecnología altamente sensible, específica, que permite realizar el estudio de expresión génica a gran escala y que permite corregir variaciones experimentales por medio de la normalización.

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

El análisis a gran escala de expresión génica en el hígado nos podría permitir identificar los genes que están participando en las respuestas inmunes que se están produciendo. En general, se considera que los genes más característicos de las respuestas típicas son los que se recogen en la tabla 1.

Procesos biológicos/Perfil de respuesta inmune	**Genes**	**Referencias**
Th1	*Ifng, Tnf, Il12b, Tbet (Tbx21), Il2, Stat1 Y Stat4*	Alexander & Brombacher 2012 (8)
Th2	*Il4, Il13*	Alexander & Brombacher 2012 (8)
Activación clásica de macrófagos (M1)	*Ifngr1, Il6ra, Irf7, Ifng, Stat1, Irf1, Il12rb2, Ccl2, Cxcl10, Cxcl9, Nos2, Il12ra, Il6r, Icam1, Tlr4, Il12, Tnf, Il6r, Il1b, Ccl2, Cxcl10, Cxcl11, Ccl3, Ccl5, Ido1*	Kong et al 2017 (15); Beattie L, et al 2013 (13)
Activación alternativa de macrófagos (M2)	*Il10, Ccl2, Arg1, Il4, Tgfb, Il13*	Kong et al 2017 (15); Beattie L, et al 2013 (13); Liu D, Uzonna JE. 2012 (16)
Agotamiento	*Il21, Tim3, Lag3, Pd1*	Roy et al 2017 (17)
Vía de señalización JAK-STAT	*Ifng, Ifngr1, Ifngr2, Jak1, Jak2, Stat1, Irf1, Irf8, Il21r, Stat4, Il10*	Martinez FO, Gordon. 2014. (18)
Quimiotaxis de leucocitos	*Ccr7, Cxcl2, Cxcr2, Cxcl9, Cxcl10, Cxcr3, Ccl2, Ccl3, Ccl4, Ccl5, Ccl7, Ccr2, Ccr5*	Kong et al 2017 (15); Beattie L, et al 2013 (13)
Th17	IL-17a, IL-17f, ROR-γt, IL-23a, IL-12b, TGF-β, IL-6, IL-21	Alexander & Brombacher 2012 (8)
Treg	IL-10, foxP3, TGFb	Gregori et al. 2012 (19)
Tfh	CXCR-5, CXCL-13, ICOS, ICOS-L Cd40, Cd40-lg, IL-21	Ballesteros-Tato & Randall 2014 (20)
Tr1	IL-10, CCR-5, ICOS, STAT-3, c-Maf, IL-27a, EBI3	Kumar & Nylén 2012 (21) Faleiro et al. 2014 (9)

Tabla 1. Genes agrupados por procesos biológicos/perfil de respuesta inmune

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es:

- Analizar y relacionar los datos de carga parasitaria, peso del hígado y expresión génica, a las 24 horas post-infección, para tener una aproximación a la comprensión de los mecanismos de respuesta inmune del ratón frente a la infección con *L. infantum.*

Dado el órgano analizado y el tiempo de infección de este ensayo, nuestra hipótesis es que las respuestas que más probablemente estarían activadas son la activación clásica de macrófagos (M1), la vía de señalización JAK-STAT y la quimiotaxis de leucocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo experimental

Se emplearon 12 muestras de hígado de ratones BALB/c; 6 de esas muestras provenían de ratones infectados con *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-274) (grupo **R1**); las otras 6 muestras provenían de ratones no infectados (grupo control **NR1**). La infección se había realizado el día 0 del experimento mediante inoculación en la vena coccígea de 10^6 promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria de crecimiento. A las 24 horas post-infección, se sacrificaron los ratones para extraer el hígado y proceder a la determinación de la carga parasitaria (22).

El procedimiento experimental se resume en la figura 3, y los protocolos seguidos se detallan en el Anexo 1.

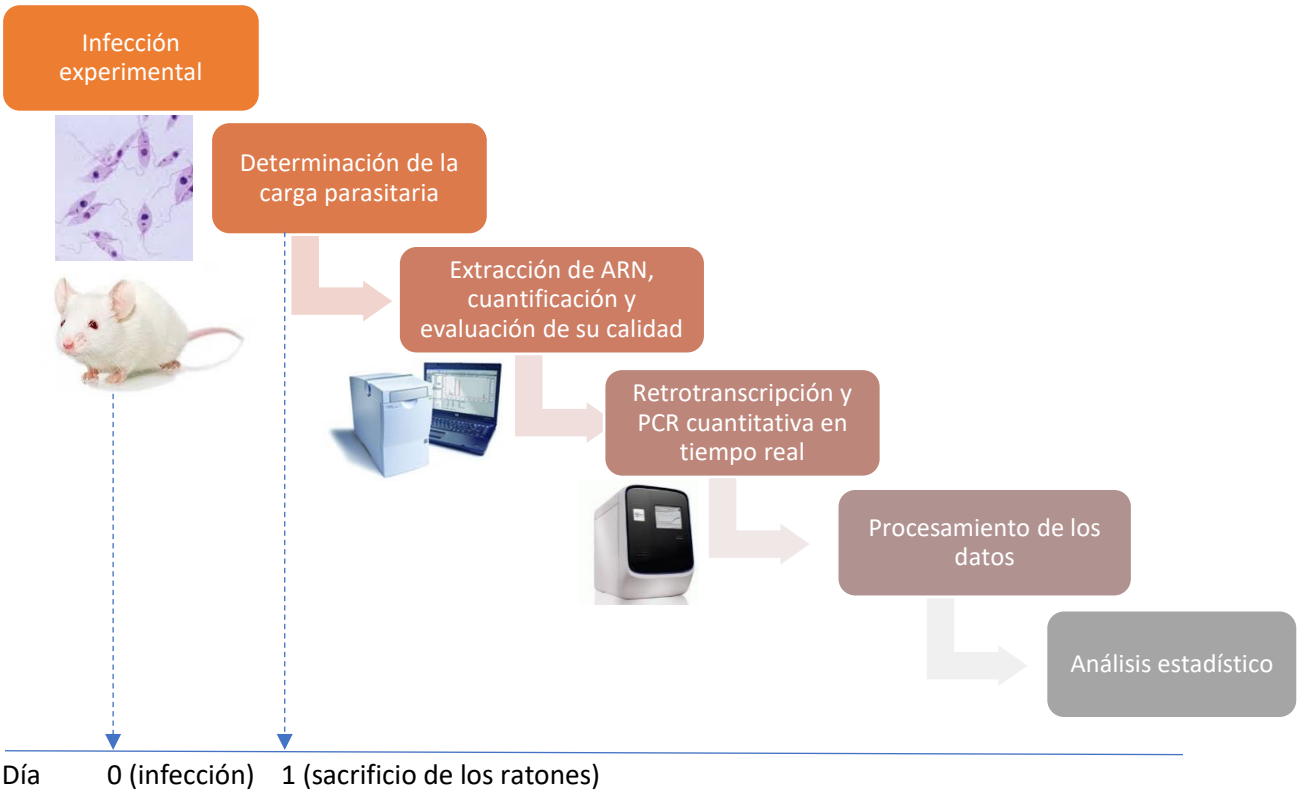

Figura 3. Procedimiento experimental

Análisis de la expresión génica

Se emplearon *plates* (*OpenArray plate*) diseñados con sondas *TaqMan* (*Thermo Fisher*), para la amplificación de 112 genes relacionados con la respuesta inmune del ratón (Tabla 2) (Anexo 1.4). En anexo Tabla A1 se especifican los genes amplificados y en la Tabla A3 se muestran los genes con sus funciones.

Grupo	Cantidad de genes
1. Genes de referencia (*housekeeping genes*)	6
2. Citoquinas y sus receptores	14
3. Interleuquinas y sus receptores	34
4. Enzimas, prostaglandinas y adaptadores proteicos	17
5. Moléculas coestimuladoras y de adhesión celular	15
6. Quimiocinas y sus receptores	21
7. (TLRs) Receptores tipo *Toll*	5

Tabla 2. Genes agrupados de acuerdo con funciones biológicas

Procesamiento de los datos y análisis estadístico

Para analizar los datos de expresión génica, en primer lugar se realizó la limpieza de las réplicas mediante una aplicación de Excel (Visual Basic) (Anexo 1.5). A continuación, se seleccionaron los mejores genes de referencia para normalizar los datos usando *qBase*^{PLUS} *(Biogazelle*): *Tgfbr2, Tbp, Stat6*). Finalmente eliminaron los valores *outliers*, para proceder a realizar el análisis estadístico.

El análisis de los pesos de los hígados se realizó por comparación de dos muestras independientes , previa comprobación de la normalidad en la distribución de los datos con el test de Shapiro Wilk. (Anexo 1.6)

El valor medio de expresión génica relativa normalizada de un gen dentro de un grupo biológico se denomina *fold change* (FC). Para analizar las diferencias en la expresión de genes entre los ratones infectados y no infectados, se utilizaron dos parámetros: Expresión Génica Diferencial (EGD) y el p-valor o significancia estadística. La EGD fue calculada como la ratio del FC de R1/FC de NR1, a las 24 horas post-infección. (Anexo 1.6). La significancia estadística se determinó por medio del test no paramétrico Mann–Whitney U. Se consideró un p-valor < 0.05 como estadísticamente significativo. Se empleó el programa *SPSS* versión 21 para realizar un gráfico de volcán que permitiera visualizar los cambios en la expresión génica, representando el $-\log_{10}$ de p-valor en el eje de las “y” y $\log_2$ de EGD en el eje de las “x”.

Mapa de genes

Se generó una red de interacción entre genes con STRING, una plataforma disponible en: www.string-db.org

RESULTADOS

Análisis de la carga parasitaria y del peso del hígado a las 24 horas post-infección (hpi)

Se obtuvo una carga parasitaria de 10^5 parásitos/gramo de tejido del hígado, esto indica un establecimiento de la infección y replicación del parásito en este órgano.

El peso del hígado fue similar en los ratones infectados en comparación con los ratones no infectados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, p-valor > 0,05 (p=0,468). (Figura 4)

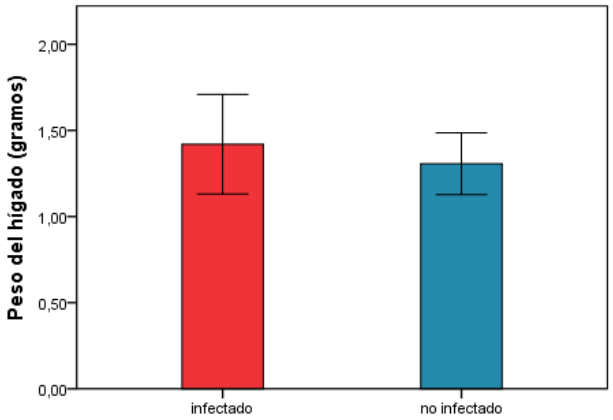

Figura 4. Peso del hígado de los ratones infectados y no infectados con *L. infantum* tras 24 horas post-infección. La barra de color azul corresponde al promedio del peso del hígado del grupo de ratones no infectados, mientras que la barra de color rojo corresponde al promedio del peso del hígado de los ratones infectados. Las barras de error representan ± 1 SD.

Expresión génica debido a la infección con *L. infantum* de ratones BALB/c tras 24 hpi (R1/NR1)

Para determinar los cambios en la expresión génica de 112 genes, inducidos por la infección con *L. infantum* tras 24 hpi en ratones BALB/c, se compararon los niveles de expresión génica del grupo R1 con NR1, es decir, los cambios debidos a la infección. En la Figura 5 se muestran los cambios en la EG para cada uno de los 112 genes analizados. Se observó una variación estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en 37 genes: 8 estaban infraexpresados en el grupo R1 respecto al grupo NR1, mientras que 29 estaban sobreexpresados. Del total, 31 genes mostraron significancia biológica, es decir, tienen una expresión génica superior al doble o inferior a la mitad. (Tabla 3)

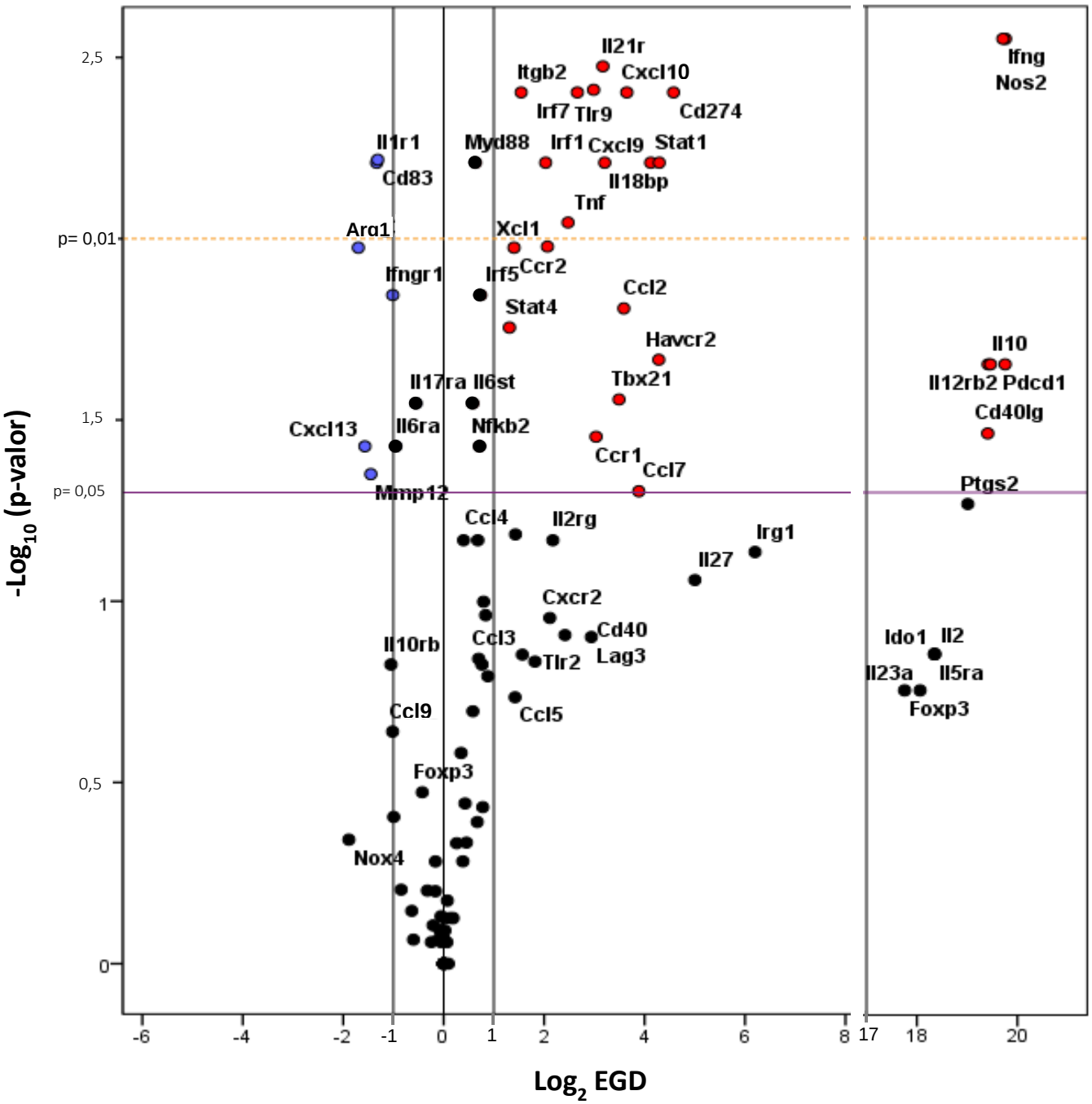

Figura 5. Gráfico volcán representando los genes diferencialmente expresados entre los grupos R1 y NR1.
En el eje de abscisas se representa el logaritmo en base 2 de la expresión génica diferencial entre los dos grupos comparados ($\log_2$ EGD). Los valores negativos corresponden a genes infraexpresados, mientras que los valores positivos corresponden a genes sobreexpresados. Las líneas verticales que marcan los valores x=-1, 1; indican diferencias en expresión génica de la mitad y el doble, respectivamente. La línea punteada vertical que marca el valor= 0, indica no diferencia en la expresión génica entre el grupo R1 y el grupo NR1. La línea vertical que marca el valor= 17, indica sobreexpresión del gen en el grupo R1, pero no se observó expresión en ninguno de los ratones del grupo control (NR1). En el eje de ordenadas se representa la significancia estadística como el valor negativo del logaritmo en base 10 del p-valor. La línea horizontal de color violeta marca el punto de corte de la significancia estadística (- $\log_{10}$ (p-valor ≤ 0,05) ≥ 1,3). Los genes se representan con puntos circulares. Aquellos genes cuya EGD mostró diferencias estadísticamente significativas se muestran en color rojo (sobreexpresados) o en color azul (infraexpresados), además se incluye una etiqueta que identifica cada gen.

Genes infraexpresados más de la mitad (log_2 EGD < -1)	Genes infraexpresados menos de la mitad (-1<log_2 EGD<0)	Genes sobreexpresados menos del doble (0 < log_2 EGD < 1)	Genes sobreexpresados más del doble (1 < log_2 EGD < 20)	Genes sobreexpresados en el grupo R1, pero no se observó expresión del gen en ninguno de los ratones NR1 (log_2 EGD > 20)
Il1r1, Cxcl13, Arg1, Cd83, Mmp12, Ifngr1	*Il17ra, Il6ra*	*Il6st, Myd88, Nfkb2, Irf5*	*Itgb2, Xcl1, Cxcl9, Stat1, Ccl2, Ccl7, Tnf, Cxcl10, Tlr9, Stat4, Tbx21, Havcr2, Il18bp, Irf7, Il21r, Ccr1 Ccr2, Irf1, Cd274*	*Il12rb2, Il10, Nos2, Cd40lg, Ifng, Pdcd1*

Tabla 3. Genes con diferencias estadísticamente significativas (p ≤ 0,05) entre ambos grupos R1 y NR1, ordenados de menor a mayor EGD.

Se destaca una gran diferencia en la expresión génica de *Il12rb2*, *Il10*, *Nos2*, *Cd40lg*, *Ifng*, *Pdcd1,* estos genes no se expresaron en ninguno de los ratones del grupo control, pero sí en los ratones infectados. (Tabla 3)

Para tener una visión general de la interacción de los genes sobreexpresados e infraexpresados, se construyó un mapa de genes, en la plataforma STRING. Como resultado se obtuvo un alto grado de interacción, es decir, los genes tienen más interacciones entre ellos de lo que se esperaría de un conjunto aleatorio de genes de tamaño similar, extraídos del genoma. Tal enriquecimiento indica que los genes están al menos parcialmente conectados biológicamente, como un grupo. Para representar estos genes, la definición de estas interacciones, proviene de tener en cuenta recursos tales como resultados experimentales y bases de datos electrónicas. En el Anexo A2 se establecen los parámetros empleados por STRING para las redes de interacción.

Algunos genes diferencialmente expresados se agruparon de acuerdo con las funciones biológicas más relevantes en las que están involucrados. En la Figura 6, se representan los genes involucrados en la vía JAK-STAT de señalización. En la Figura 7, se resaltan los genes relacionados con la quimiotaxis de leucocitos.

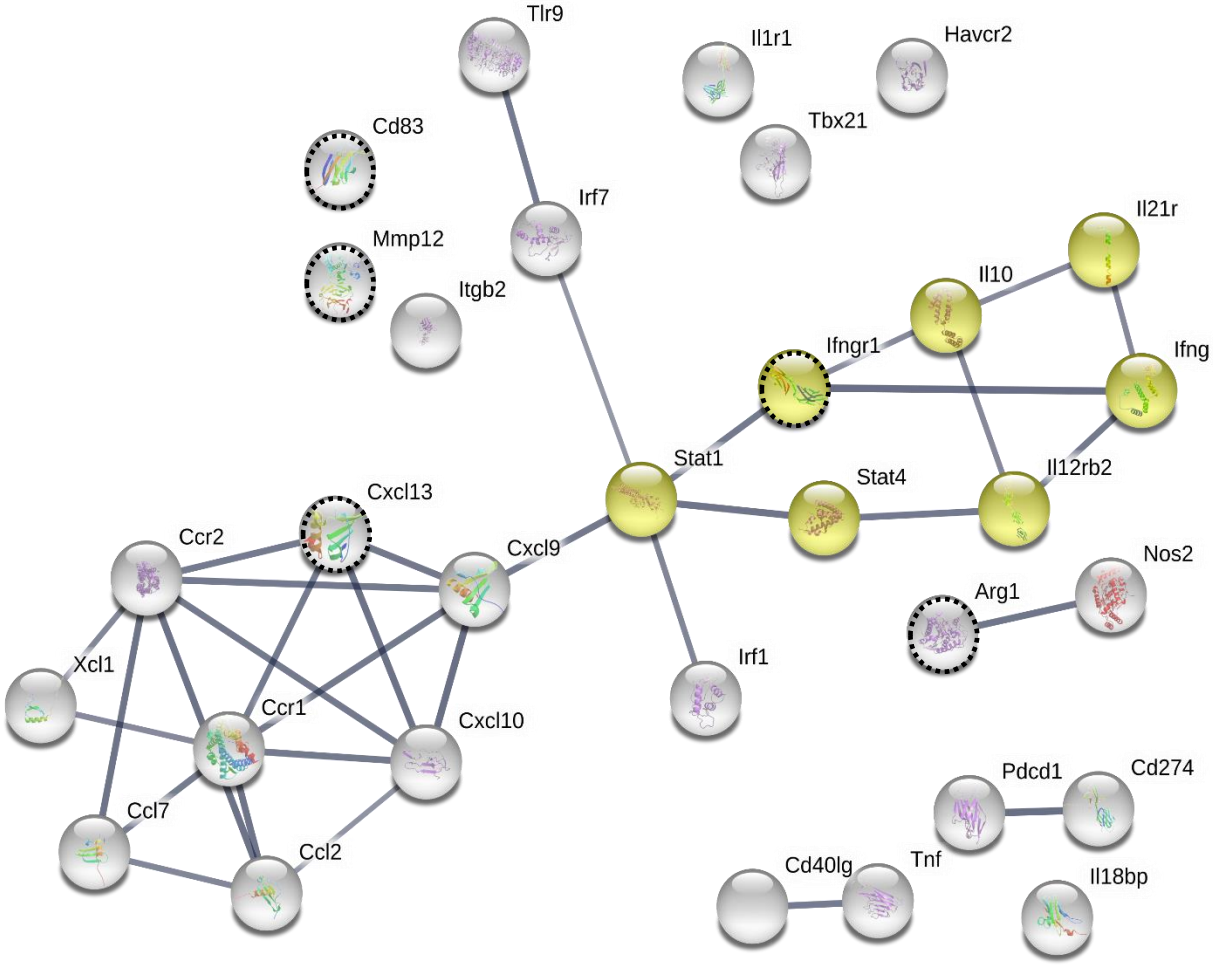

Figura 6. Genes involucrados en la vía de señalización JAK-STAT. (círculos amarillos). La interacción de los genes se estableció con un criterio de alto nivel de confianza (0,700). El grosor de las líneas grises indica el grado de confianza en la interacción. Los círculos con borde discontinuo representan genes infraexpresados. Los círculos con borde continuo representan genes sobreexpresados.

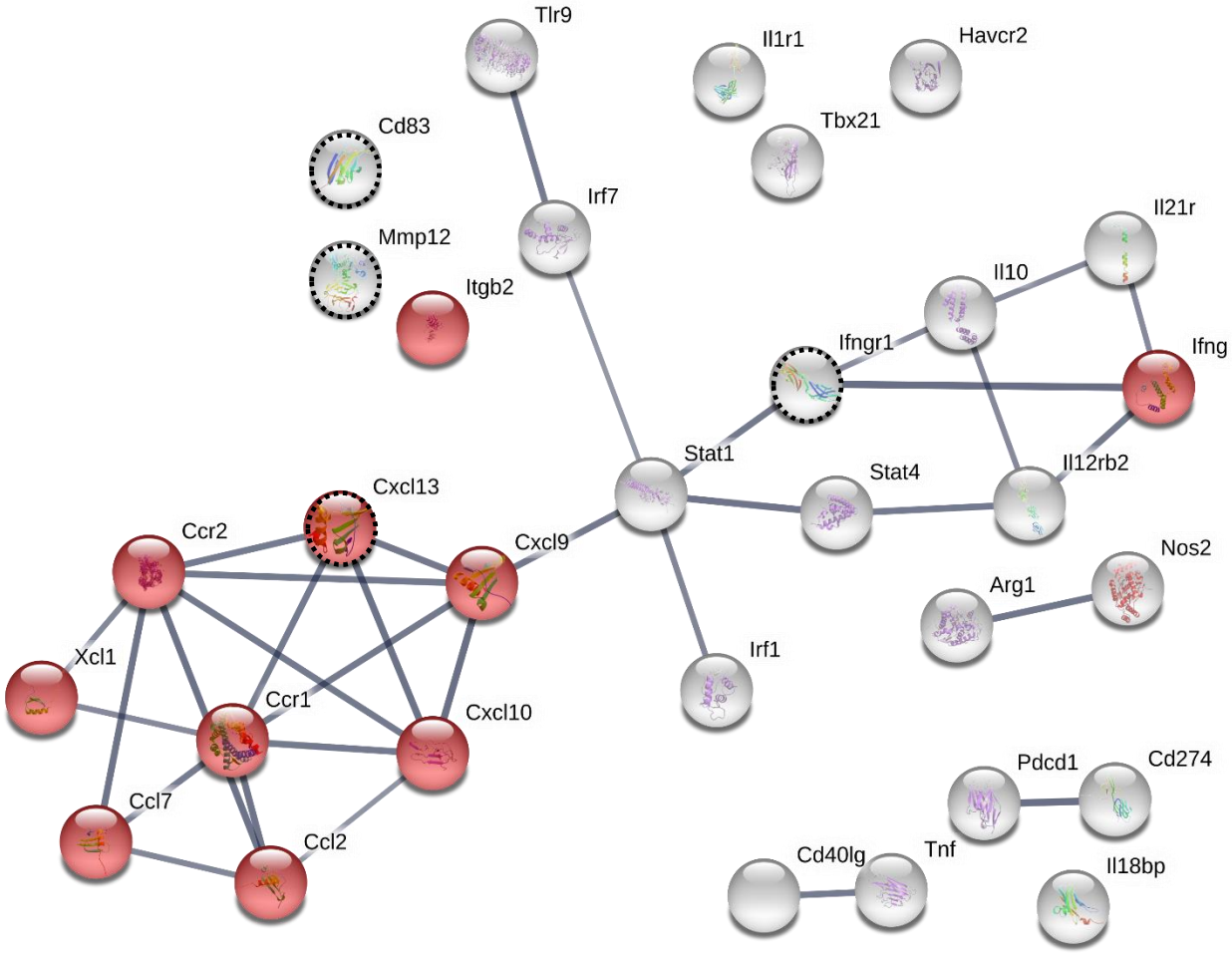

Figura 7. Genes relacionados con la quimiotaxis de leucocitos. (círculos rojos). La interacción de los genes se estableció con un criterio de alto nivel de confianza (0,700). El grosor de las líneas grises indica el grado de confianza en la interacción. Los círculos con borde discontinuo representan genes infraexpresados. Los círculos con borde continuo representan genes sobreexpresados.

Algunos genes involucrados en la respuesta inflamatoria de activación de macrófagos (M1) se encontraron sobreexpresados. (Figura 8)

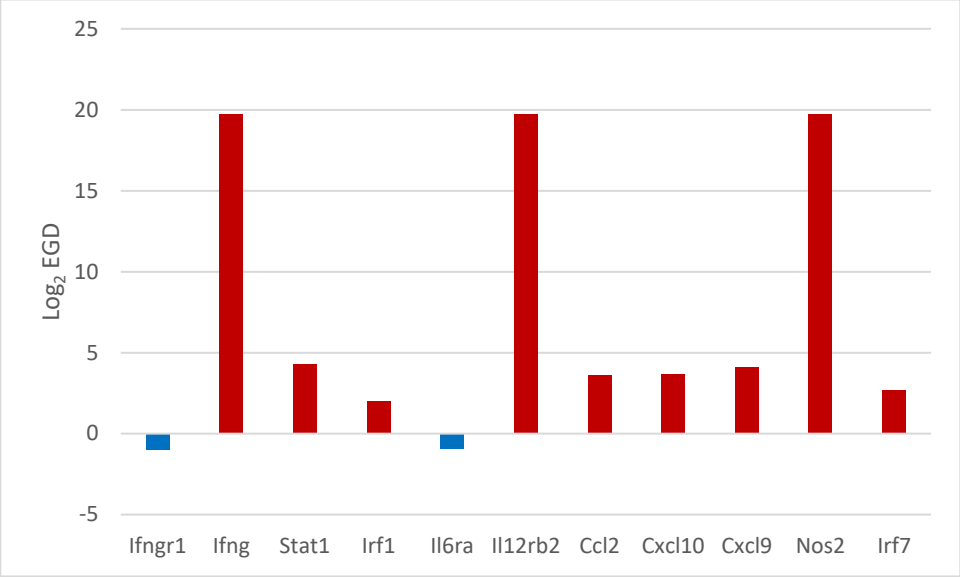

Figura 8. Expresión génica diferencial de algunos trascritos de mRNA asociados a la activación clásica de macrófagos (M1). La gráfica corresponde al Log_2 de la expresión diferencial de genes con diferencias estadísticamente significativas (p-valor ≤ 0,05) asociados a la activación clásica de macrófagos (M1).

Se destacan algunos genes que codifican quimiocinas y receptores de quimiocinas que presentaron EGD estadísticamente significativa. (Figura 9)

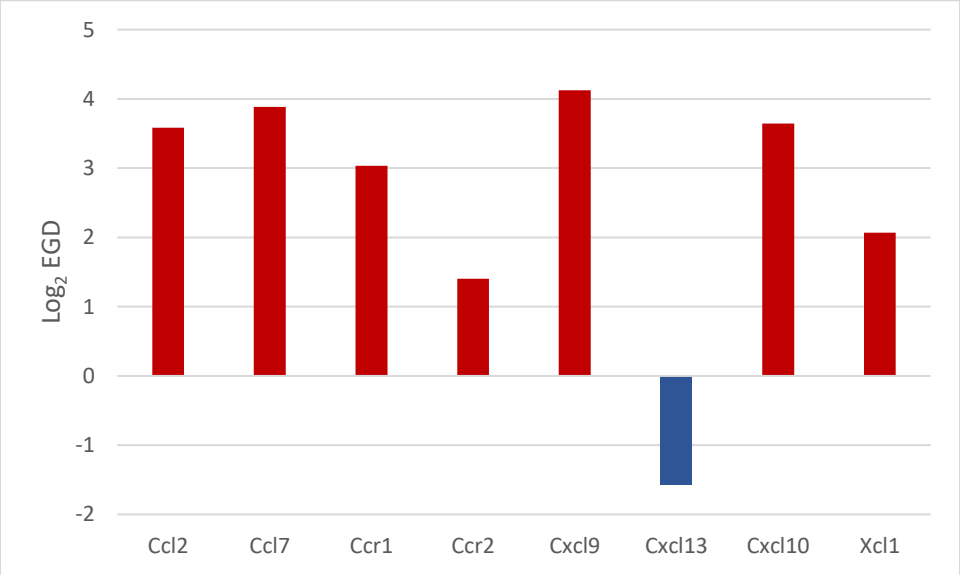

Figura 9. EGD de transcritos de mRNA de algunas quimiocinas y receptores de quimiocinas. Estos genes presentaron diferencias estadísticamente significativas (p-valor ≤ 0,05) entre ratones infectados y no infectados.

Algunos genes se expresaron sólo en los ratones infectados, tal es el caso del *Ifng*, este gen mostró una expresión diferencial contundente. (Figura 10)

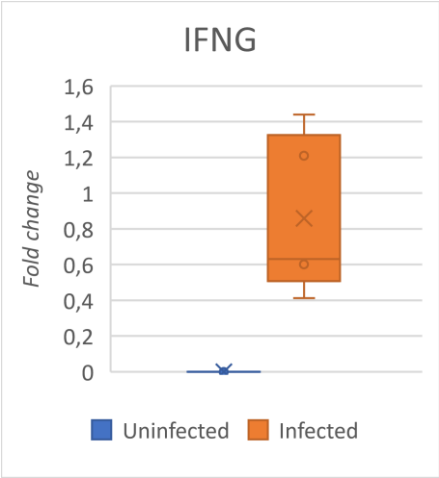

Figura 10. Expresión génica diferencial del *Ifng*. Las cajas representan el rango intercuartílico de los valores normalizados de cada grupo experimental. La línea horizontal al interior de cada caja representa la mediana de estos valores, la "x" representa el promedio de estos valores, es decir, el *fold change.*

DISCUSIÓN

La infección experimental inicia desde el momento en que se inoculan por vía intravenosa una alta cantidad de promastigotes (10^6) en fase estacionaria de crecimiento. Los promastigotes que han ingresado al torrente sanguíneo son atacados por el sistema del complemento y en su mayoría son eliminados (23), sobreviven los que han sido fagocitados por monocitos y neutrófilos y a través de ellos logran viajar hasta los órganos diana. En el hígado, a las 24 hpi se alcanzó una carga parasitaria de 10^5 parásitos por gramo. En ese lapso, el parásito ha logrado llegar al hígado, establecer la infección y replicarse. Adicionalmente, no se observaron cambios significativos en el peso del hígado (Figura 4), debido a que probablemente es muy pronto para que ocurra inflamación del órgano. Sin embargo, se esperaría encontrar cambios en la expresión génica como respuesta a la infección por *L. infantum*. De los genes evaluados, 37 se encontraban diferencialmente expresados entre los ratones infectados y los no infectados, los genes sobreexpresados correspondían al 78% de ellos.

De los genes estudiados se encontró sobreexpresión de muchos involucrados en la activación clásica de macrófagos: *Ifng1, Ifng, Stat1, Irf1, Il6ra, Il12rb2, Ccl2, Cxcl10, Cxcl9, Nos2, Irf7* (Figura 8), en la quimiotaxis de leucocitos: *Ccl2, Ccl7, Cc1, Cxcl9, Cxcl10, Xcl1* (Figura9), en la vía de señalización JAK-STAT: *Ifngr1, Ifng, Stat1, Stat4, Irf1, Il21r, Il12rb2, Il10* (Figura 6). La mayoría de los genes involucrados en la respuesta Th1, se encontraron sobreexpresados (*Ifng, Tnf, Tbet, Stat1, Stat4*) excepto *Il12b* que no tuvo expresión diferencial. Con respecto a la activación alternativa de macrófagos, sólo se encontraron sobreexpresados *Il10, Ccl2* y no se detectó ninguno de los genes implicados en la respuesta Th2 (*Il4, Il13*).

Para tener una visión general de la interacción de los genes que mostraron expresión diferencial, acudimos a las gráficas mostradas en las figuras 6 y 7, donde se observa el papel central de *Stat1*, pues media respuestas celulares a interferones (IFN), citoquinas y factores de crecimiento. Es un intermediario que participa en la vía JAK-STAT de señalización (Figura 11). Esta vía es importante para una adecuada respuesta de los macrófagos al IFN-γ y conduce a la producción de moléculas citotóxicas para matar patógenos intracelulares (16). Sin embargo algunas especies de *Leishmania* inhiben esta vía de señalización como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (24). Se ha visto que *L. amazonensis* puede suprimir la activación de DC, mediada por citoquinas y TLR-4 así como la producción de IL-12 a través de la rápida degradación de las proteínas de señalización intracelular, particularmente las asociadas con el JAK-STAT (25). Uno de estos mediadores puede ser el IFNGR, el cual se encuentra infraexpresado en monocitos y macrófagos infectados con *L. mexicana*, *L. major*, y *L. donovani* (Bhardwaj et al., 2009 (26). En nuestro estudio, IFNGR1 se encontró infraexpresado (Figura 10), lo cual podría estar relacionado con la infección con el parásito. Sin embargo, sí observamos sobreexpresión de *Stat1* y *Stat4, Ifng y Cxcl9,* por lo que esta inhibición no está clara.

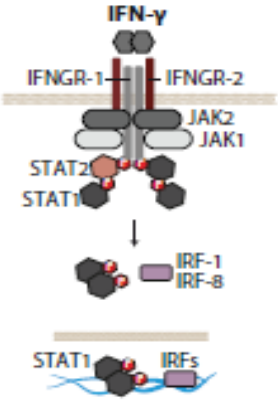

Figura 11. Ruta de señalización de JAK2-STAT1. El IFN-γ se une a las cadenas IFNGR-1 e IFNGR-2 que forman su receptor. El receptor recluta los adaptadores de Janus quinasa Jak1 y Jak2 que activan STAT1 (transductor de señal y activador de transcripción 1, induce la producción de citoquinas tales como IFN-γ, IL-12 y quimiocinas como CXCL9 (27)) y factores reguladores de interferón (IRF), tales como IRF-1 e IRF-8. (18). Es importante para una adecuada respuesta de los macrófagos al IFN-γ, que conduce a la producción de moléculas citotóxicas para matar patógenos intracelulares (16). Adaptada de Martinez FO, Gordon. 2014.

Uno de los resultados de activación de la vía de señalización JAK-STAT es la producción de quimiocinas importantes como CXCL9 (figura 7). Las quimiocinas dan información sobre las señales de activación o inhibición que se están produciendo. Cuando ocurre la infección aguda, se produce la inducción de quimiocinas relacionadas con la respuesta Th1 al parásito. Dentro de las primeras quimiocinas en ser producidas, está *Cxcl9* y *Xcl1,* estos genes se encontraron sobreexpresados; ambos están involucrados en la quimiotaxis de linfocitos. Además se encontró sobreexpresión de *Cxcl10* que tiene actividad quimiotáctica para monocitos y linfocitos T (28–30) (Figura 9). No obstante, *Cxcr3*, el cual es receptor de CXCL9 y CXCL10, no tuvo EGD significativa, pero esto no estaría afectando la quimiotaxis mediada por *Cxcl9* y *Cxcl10*. Barbi et al., 2007 (31), encontraron que ratones *Cxcr3*$^{-/-}$ montaban una respuesta Th1 efectiva con el reclutamiento de células al hígado. *Ccl2* y *Cxcl10* son de las primeras quimiocinas en ser producidas pues son quimioatrayentes de monocitos, que junto con las células NK (*Cxcl9* tiene actividad quimiotáctica para células NK) son las primeras en ser llamadas al sitio de la infección en el hígado. Al encontrar sobreexpresión en estos genes, se podría inferir que las KC infectadas ya han generado señales de quimiotaxis para estas células. Los resultados obtenidos en términos de sobreexpresión de quimiocinas son consistentes con lo esperado.

Se observó sobreexpresión de una molécula coestimuladora, CD40LG. Esta molécula se liga al CD40 y puede estar expresado en la membrana de subpoblaciones celulares de células T. La señal coestimuladora de ligando CD40-CD40LG (CD154), es necesaria para la activación de las células T *helper* CD4^{+} por la célula dendrítica, además del reconocimiento de un péptido de MHC clase II presentado por el receptor de la célula T (32). Dado que *Cd40lg* y *Cd40* se encontraron sobreexpresados (*Cd40* sin significancia estadística), se podría inferir que en este momento ya ocurre la activación de células T CD4^{+}. Cuando se da la unión CD40-CD40LG se impulsa a la célula dendrítica desde un estado de reposo a un estado activado de regulación positiva de moléculas como IL-12 (33). Además de encontrarse como una glicoproteína de membrana en las células T, CD40LG existe como una forma soluble (sCD40LG) que se escinde de las células T activadas y parece retener la capacidad de unirse y activar CD40 en las células presentadoras de antígeno. SCD40L está asociado con la resolución clínica de VL. En un estudio, se observó un aumento en los niveles de sCD40L en suero durante el tratamiento para VL y los niveles se correlacionaron negativamente con el tamaño del bazo y la carga parasitaria (32). Teniendo en cuenta lo anterior, se podría deducir que, tanto en el tratamiento como en un primer momento de la infección, se produciría una gran cantidad de CD40LG como una respuesta del sistema inmune con la intención de eliminar el parásito.

Por otro lado, se estudiaron los genes involucrados en la regulación de la producción de IFN-γ. La sobreexpresión de *Ifng* indica que se está produciendo una activación de macrófagos, se está promoviendo la diferenciación de las células T CD4^{+} al subconjunto Th1 y por otro lado, se está inhibiendo la diferenciación de las vías Th2 y Th17 (34,35). El *Ifng* se encontró sobreexpresado en

los ratones infectados y no se expresó en ninguno de los ratones no infectados (Figura 10), esta citoquina estaría siendo producida probablemente por células NK y células NKT (36), además por células que han sido activadas por la respuesta inmune innata, específicamente linfocitos T $CD4^{+}$. Svensson et al., 2005 (36) , emplearon ratones IFN-$\gamma^{-/-}$ infectados con *L. donovani*, para confirmar que es absolutamente necesario el IFN-γ para la expresión sostenida (24 h) de *Cxcl10.*

Por otro lado, la óxido nítrico sintasa (NOS2), es una enzima que cataliza L-arginina para generar óxido nítrico (16). NOS2 es producida por los macrófagos activados, la sobreexpresión de esta enzima indica que a las 24 hpi ya se ha producido la activación de macrófagos para la eliminación del parásito. Los factores de transcripción *Irf1* e *Irf7* son importantes en la inducción de interferones tipo I (IFNA e IFNB) y citoquinas inflamatorias. La sobreexpresión de *Irf1* e *Irf7,* también fue observada por Kong et al., 2017 (15) en tejido de bazo pero no en macrófagos esplénicos, sugiriendo que poblaciones celulares como los fibroblastos pueden tener un papel en la respuesta inmune innata. IFN-γ y los factores de transcripción previamente mencionados (*Ir1, Irf7, Stat1, Stat4*) son importantes para la producción de NOS2, todos ellos se encontraron sobreexpresados, lo que es consistente con lo que está ocurriendo en la infección temprana en el hígado. En la tabla 4 se muestran los genes con EGD significativa paralelo a lo encontrado en la literatura.

Grupo funcional	**Genes con EGD estadísticamente significativa (p valor < 0,05) en nuestro estudio** **En tejido de hígado, 24 hpi con *L. infantum***		**Genes con EGD estadísticamente significativa (p valor <0,001) reportados por Kong et al., 2017** **En tejido de bazo, 28 dpi con *L. donovani***		**Genes con EGD estadísticamente significativa reportados por Beattie L, et al., 2013** **En KC infectadas con *L. donovani***
	Sobreexpresados	**Infraexpresados**	**Sobreexpresados**	**Infraexpresados**	**Sobreexpresados**
Perfil M1 (activación clásica de macrófagos)	***Irf7*, *Ifng*, *Stat1*,** *Irf1, Il12rb2*, ***Ccl2*, *Cxcl10*, *Cxcl9*, *Nos2***	*Ifngr1, Il6ra*	***Ccl2***, *Ccl3, Ccl5,* ***Cxcl10***, *Cxcl16,* ***Cxcl9***, *Ido1,* ***Ifng***, *Irf1,* ***Irf7***, *Irg1,* ***Stat1***	*Ccr7, I1b*	***Nos2***, *Il12rb1,* ***Cxcl9***, *Irg1,* ***Ifng***, *Tnf*
Perfil M2 (activación alternativa de macrófagos)	*Il10,* ***Ccl2***	*Arg1*	*Arg1,* ***Ccl2***, *Cxcl16, Stat3, Il1rn.*	-	-
Quimiocinas y receptores de quimiocinas	***Ccl2***, ***Ccl7***, ***Ccr1***, *Ccr2,* ***Cxcl9***, ***Cxcl10***, *Xcl1*	*Cxcl13*	***Ccl2***, *Ccl3, Ccl4, Ccl5,* ***Ccl7***, ***Ccr1***, *Ccr5,* ***Cxcl10***, *Cxcl16, Cxcl2,* ***Cxcl9***, *Cxcr3*	*Ccr3, Ccr7*	***Cxcl9***

Tabla 4. Genes con EGD significativa según grupos funcionales. Se muestran los genes sobreexpresados e infraexpresados según grupo funcional: perfil M1 y M2 de activación de macrófagos, quimiocinas y receptores de quimiocinas. Los genes en azul son los que coinciden con lo reportado en la literatura.

Finalmente, es importante mencionar que dentro de los pocos genes que tuvieron expresión diferencial relacionados con la activación alternativa del macrófago (M2), *Il10* estaba sobreexpresada (Figura 5). Sin embargo, su receptor (IL10R) no tuvo expresión diferencial, por lo tanto, no está claro que esté ejerciendo su efecto biológico en este momento. La IL10 inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, suprime la respuesta de las células T efectoras y posiblemente a los macrófagos (18). Junto con la *Il4* (que no se detectó), serían las principales citoquinas que iniciarían la cascada de señalización para finalmente inhibir la activación de macrófagos. Teniendo en cuenta lo anterior, parece claro que los mecanismos de respuesta alternativa de los macrófagos (M2) no predominan en este momento de la infección.

CONCLUSIONES

1. El análisis transcripcional de algunos de los genes involucrados en la respuesta inmune del ratón frente a *L. infantum*, permitió descifrar el panorama en un momento clave de la infección.
2. A las 24 horas post infección, predomina la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria de activación de macrófagos (M1), es decir, se da una respuesta proinflamatoria, lo que es congruente, pues engloba todos los eventos inmunológicos previos a la formación de granulomas en el hígado.
3. *Stat1* parece tener un papel central en la respuesta inmune innata, pues conecta a los genes involucrados en la producción de IFN-γ con los genes relacionados con la quimiotaxis de leucocitos.
4. En este momento de la infección ya se han generado señales quimiotácticas para linfocitos T (*Cxcl9* y *Xcl1)*, para células NK (*Cxcl9*) y monocitos (*Cxcl10*).
5. A las 24 horas post infección, se detectan moléculas coestimuladoras como CD40/CD40LG, lo cual indicaría que se está produciendo la activación de linfocitos T $CD4^+$.
6. Se observa sobreexpresión de moléculas mediadoras de la eliminación de los parásitos como *Ifng* y *Nos2, lo que* indica que se estaría produciendo la activación de macrófagos por la vía clásica, mecanismo importante para el control de la infección en el hígado.

Se requieren de más aproximaciones para la evaluación transcripcional, que incluya otros momentos de la infección que podrían dar más información de lo que ocurre a nivel inmunológico. Además, plantear la posibilidad de validar completamente estos resultados a nivel de proteína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671.

2. Organización mundial de la Salud. Control de las leishmaniasis: Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. 2012. p. 5–8.

3. Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. Immunol Cell Biol. 2007;85(2):138–47.

4. Cotterell SEJ, Engwerda CR, Kaye PM. Leishmania donovani infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. Eur J Immunol. 1999;29(1):203–14.

5. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunol Rev. 2004;201(1):239–53.

6. Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani. J Exp Med. 1999;189(4):741–6.

7. Taylor AP, Murray HW. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon-gamma gene-disrupted mice. J Exp Med. 1997;185(7):1231–9.

8. Stäger S, Alexander J, Carter KC, Brombacher F, Kaye PM. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. Infect Immun. 2003;71(8):4804–7.

9. Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(7):e2914.

10. Cezário GAG, Oliveira LRC de, Peresi E, Nicolete VC, Polettini J, Lima CRG de, et al. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental Leishmania chagasi infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(5):573–83.

11. Fernandes MC, Dillon LA, Belew AT, Bravo HC, Mosser DM, El-Sayed NM. Dual Transcriptome Profiling of Leishmania-Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. MBio. 2016;7(3):16.

12. Dillon LA, Suresh R, Okrah K, Bravo HC, Mosser DM, El-Sayed NM. Simultaneous transcriptional profiling of Leishmania major and its murine macrophage host cell reveals insights into host-pathogen interactions. BMC Genomics. 2015;16:2.

13. Beattie L, d'El-Rei Hermida M, Moore JW, Maroof A, Brown N, Lagos D, et al. A transcriptomic network identified in uninfected macrophages responding to inflammation controls intracellular pathogen survival. Cell Host Microbe. 2013;14(3):357–68.

14. Medina-Colorado AA, Osorio EY, Saldarriaga OA, Travi BL, Kong F, Spratt H, et al. Splenic CD4+ T Cells in Progressive Visceral Leishmaniasis Show a Mixed Effector-Regulatory Phenotype

and Impair Macrophage Effector Function through Inhibitory Receptor Expression. PLoS One. 2017;12(1):1–19.

15. Kong F, Saldarriaga OA, Spratt H, Osorio EY, Travi BL, Luxon BA, et al. Transcriptional Profiling in Experimental Visceral Leishmaniasis Reveals a Broad Splenic Inflammatory Environment that Conditions Macrophages toward a Disease-Promoting Phenotype. PLoS Pathog. 2017;13(1):1–57.

16. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:83.

17. Roy S, Gupta P, Palit S, Basu M, Ukil A, Das PK. The role of PD-1 in regulation of macrophage apoptosis and its subversion by Leishmania donovani. Clin Transl Immunol. 2017;6(5):1–4.

18. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep. 2014;6:13.

19. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. Front Immunol. 2012;3:30.

20. Ballesteros-Tato A, Randall TD. Priming of T follicular helper cells by dendritic cells. Immunol Cell Biol. 2014;92(1):22–7.

21. Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. Front Immunol. 2012;3:251.

22. Buffet PA, Sulahian A, Garin YJ, Nassar N, Derouin F. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying Leishmania infantum in tissues of infected mice. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(9):2167–8.

23. Moreno I, Domínguez M, Cabañes D, Aizpurua C, Toraño A. Kinetic Analysis of Ex Vivo Human Blood Infection by Leishmania. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(7):1–41.

24. Nandan D, Reiner NE. Attenuation of Gamma Interferon-Induced Tyrosine Phosphorylation in Mononuclear Phagocytes Infected with Leishmania donovani: Selective Inhibition of Signaling through Janus Kinases and Stat1. Infect Immun. 1995;63(11):4495–500.

25. Xin L, Li K, Soong L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by Leishmania amazonensis amastigotes. Mol Immunol. 2008 Jul;45(12):3371–82.

26. Bhardwaj N, Rosas LE, Lafuse WP, Satoskar AR. Leishmania inhibits STAT1-mediated IFN-γ signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1β by Leishmania mexicana. Int J Parasitol. 2005;35(1):75–82.

27. Najjar I, Fagard R. STAT1 and pathogens, not a friendly relationship. Biochimie. 2010;92(5):425–44.

28. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. Front Immunol. 2014;5:491.

29. Liu C, Luo D, Reynolds BA, Meher G, Katritzky AR, Lu B, et al. Chemokine receptor CXCR3 promotes growth of glioma. Carcinogenesis. 2011;32(2):129–37.

30. Vargas-Inchaustegui DA, Hogg AE, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Endsley JJ, et al. CXCL10 Production by Human Monocytes in Response to Leishmania braziliensis Infection.

Infect Immun. 2010;78(1):301–8.

31. Barbi J, Oghumu S, Rosas LE, Carlson T, Lu B, Gerard C, et al. Lack of CXCR3 Delays the Development of Hepatic Inflammation but Does Not Impair Resistance to Leishmania donovani. J Infect Dis. 2007;195(11):1713–7.

32. de Oliveira FA, Barreto AS, Bomfim LGS, Leite TRS, Dos Santos PL, de Almeida RP, et al. Soluble CD40 Ligand in Sera of Subjects Exposed to Leishmania infantum Infection Reduces the Parasite Load in Macrophages. PLoS One. 2015;10(10):1–4.

33. Roitt IM, Delves Peter. Inmunología : fundamentos. Médica Panamericana; 2003.

34. Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, et al. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. Cell. 1999;98(5):597–608.

35. Kima PE, Soong L. Interferon gamma in leishmaniasis. Front Immunol. 2013;4:156.

36. Svensson M, Zubairi S, Maroof A, Kazi F, Taniguchi M, Kaye PM. Invariant NKT Cells Are Essential for the Regulation of Hepatic CXCL10 Gene Expression during Leishmania donovani Infection. Infect Immun. 2005;73(11):7541–7.

ANEXOS

1. PROTOCOLOS

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la legislación europea (2010/63 /UE) y española (Ley 53/2013), previa aprobación del Comité de Ética en Investigación y Bienestar Animal (CEIBA) de la Universidad de La Laguna (Código del permiso: CEIBA2015-0168).

1.1 Extracción del ARN

Partiendo de fracciones de hígado conservadas en *RNA later* a -80°C, se pesaron aproximadamente 10 mg y se depositaron en columnas *Lysing Matrix D* (*MP Biomedicals*) junto con 300 µl de *TRI Reagent* (*Sigma-Aldrich*). Esta mezcla se homogeneizó en *FastPrep® System* (*ProScientific*) realizando 5 ciclos de homogeneización durante 15 segundos a una velocidad de 4 metros por segundo. Se añadieron 200 µl de *TRI Reagent* (*Sigma-Aldrich*) y se volvió a homogeneizar la suspensión. Posteriormente se añadieron otros 500 µl de *TRI Reagent* y se agitó en vórtex durante 15 segundos. Durante 5 minutos se mantuvo en hielo y otros 5 minutos a temperatura ambiente. Esta suspensión se transfirió a otro tubo con 200 µl de cloroformo, se mezcló por inversión manual durante 15 segundos y se mantuvo 5 minutos a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 13.000x *g* a 4°C, tras lo cual se formaron tres fases diferenciadas (ARN, ADN y proteínas). Se separó la fase superior correspondiente al ARN, transfiriendo a otro tubo con un volumen de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Esta mezcla se transfirió a la columna del *kit* comercial *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.2. Determinación de la pureza, integridad y cuantificación del ARN extraído

Para cuantificar y determinar la calidad del ARN se empleó el equipo *DeNovix DS-11 Spectrophotometer* (*DeNovix*). Teniendo en cuenta la ratio 260/280 para la pureza: valores comprendidos entre 2-2,2. Si el valor es menor, indicaba contaminación con proteínas, fenol u otros contaminantes. La ratio 260/230 para la pureza del ácido nucleico, valores en torno a 1,8-2,2 para un ARN "puro".

Posteriormente se determinó la integridad del ARN mediante la obtención del RIN (*RNA integrity number)*, el cual es un parámetro que identifica la integridad de las muestras en función de la ratio de las áreas de los ARNs 28S y 18S, cuanto mayor es su valor mayor integridad tiene la muestra. El valor del RIN se obtuvo empleando el equipo *2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*) y los chips *RNA 6000 Nano Kit* (*Agilent Technologies*). Con este equipo también cuantificó de forma precisa el ARN.

Adicionalmente para verificar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, con el fin de observar las dos bandas de ARNr, 28S y 18S. Para ello, se cargaron como máximo 3 µg de cada muestra de ARN, se mezclaron con agua libre de ribonucleasas (*DEPC*) y tampón con formamida al 16 % y, se sometieron 2 minutos a 65ºC para desnaturalizar las estructuras secundarias del ARN.

1.3. Retrotranscripción

Después de comprobar la pureza e integridad del ARN, y admitiendo sólo muestras con *RIN* superior a 7, se partió de 2 ug de ARN por muestra, para la transcripción inversa empleando el *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Thermo Fisher*) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La retrotranscripción se realizó utilizando un termociclador *Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Thermo Fisher*). El cDNA resultante se conservó a -20°C.

1.4. Amplificación por qPCR

Se estudiaron 112 genes previamente seleccionados, relacionados tanto con la respuesta innata y adaptativa, para ello se utilizaron *plates* (*OpenArray® plate*) que incluían sondas TaqMan (*Thermo Fisher*) para la amplificación de estos genes que se especifican en anexo Tabla A1**.**
Cada *plate* permitía realizar 3.072 reacciones de amplificación (nanopocillos). El *plate* se organizaba en 48 *subarrays*, cada uno con 64 nanopocillos.

La mezcla de PCR se preparó en placas de 384 pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante: a cada pocillo se le añadió 1,2 µl de ADNc y 3,8 µl de mezcla de *PCR TaqMan Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystems*). Un pocillo de la placa 384 correspondía a un *subarray*. Una vez cargadas las placas de 384 pocillos, fueron colocadas en el equipo *AccufillTM System* (*Applied Biosystems*), el cual cargó la mezcla de PCR de forma exacta en el *plate*. Cada reacción de amplificación se realizó en un volumen de 33 nl. El ciclo térmico y la detección de fluorescencia fueron realizados con el equipo *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cada *subarray* contenía los cebadores junto con una sonda marcada con FAM en su extremo 5'. Cada muestra fue amplificada por triplicado.

1.5. Procesamiento de los datos

Para analizar los datos de expresión génica, se usó el valor Cq (ciclo de cuantificación) de cada carrera qPCR, los cuales se exportaron desde el software *QuantStudioTM 12K Flex Real-Time* 217 *PCR System* a Excel en donde se realizó la limpieza de datos de qPCR mediante una aplicación de Excel (Visual Basic). Se organizaron los datos para que las 3 réplicas de cada gen analizado en cada muestra, quedaran seguidos y se aplicaron unos módulos con los que se realizó la limpieza de réplicas bajo estos criterios:

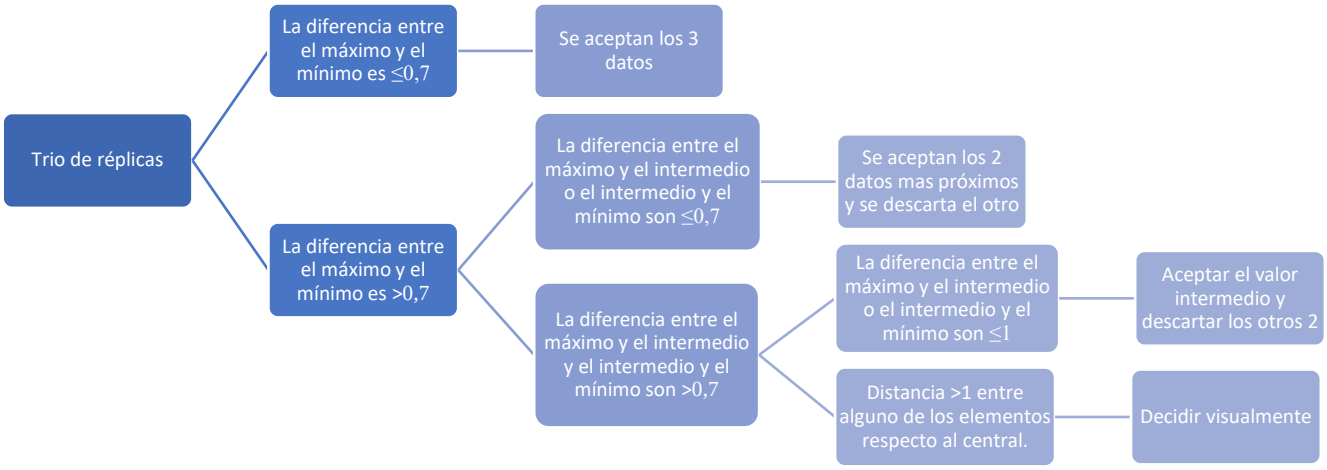

Figura 10. Algoritmo empleado en los módulos de Visual Basic

Posteriormente, se estudiaron visualmente ciertos valores para finalizar la limpieza de réplicas, teniendo en cuenta los siguientes criterios:

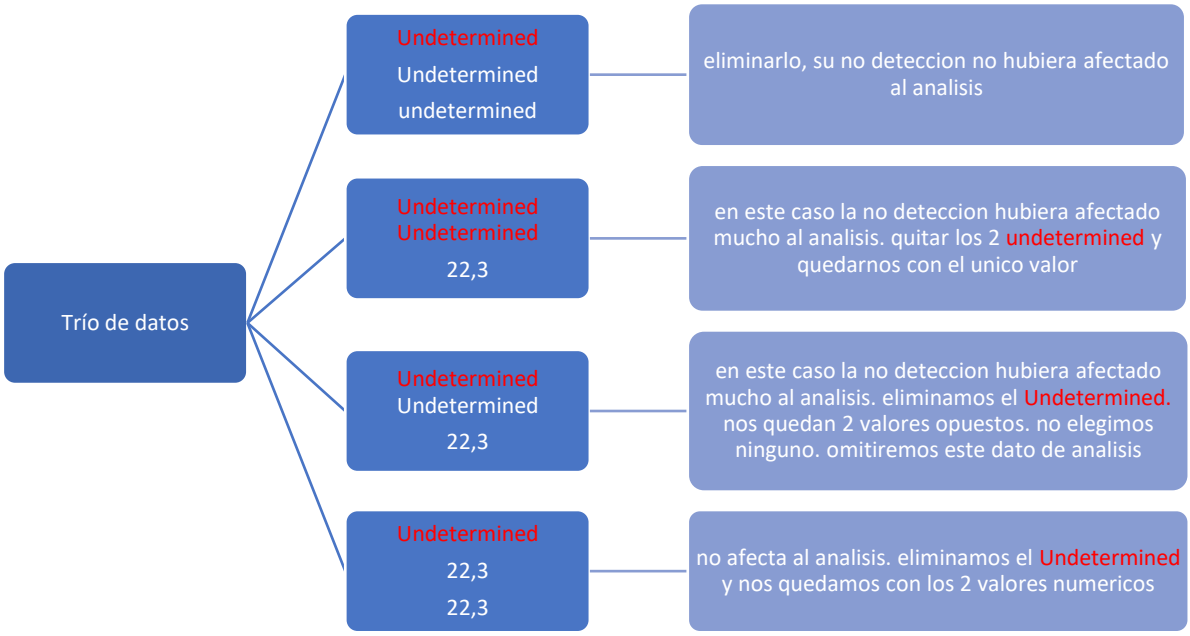

Figura 11. Algoritmo análisis visual de réplicas

Si sucede que los tres valores numéricos son muy diferentes, se lleva a cabo uno de los siguientes criterios:

- Comparar con el grupo biológico, si hay una tendencia que coincide con alguna de las 3 réplicas, se elige ese valor como bueno.
- Si no coinciden con el grupo biológico, pero son simétricos, se coge siempre el valor central.
- Si no coinciden ni son simétricos, se elige el valor más alejado y después de los 2 valores restantes siempre el menor.

Se eliminaron los datos con AMP SCORE < 1.24 y ROX SIGNAL <1000, pues estos correspondían a pocillos inválidos.

Posterior a esto, se utilizó el programa en formato para *qBase*^{PLUS} *(Biogazelle)* para la normalización con *geNorm*^{PLUS}

1.6. Análisis estadístico

Para comparar el peso del hígado del grupo biológico estudiado (ratones infectados y no infectados en el primer día post infección), se comprobó la normalidad en la distribución de los datos con el test de Shapiro Wilk, y se realizó una comparación de dos muestras independientes. Para el análisis estadístico, se utilizó el programa SPSS versión 21.

Para analizar las diferencias en la expresión de genes entre los ratones infectados y no infectados, se utilizaron dos parámetros: Expresión génica diferencial (EG) y el p-valor o significancia estadística. La EGD fue calculada como la ratio del *fold change* de infectados/*fold change* de los no infectados, a las 24 horas post-infección; este valor se expresó como $\log_2$.

La significancia estadística se determinó por medio del test no paramétrico Mann–Whitney U, pues se compararon dos grupos y los datos no cumplían con las condiciones de normalidad y homocedasticidad. Se consideró un p-valor < 0.05 como estadísticamente significativo. Para visualizar los cambios en la expresión génica, se empleó un gráfico de Volcán, representando el -$\log_{10}$ de p-valor en el eje de las “y” y $\log_2$ de EGD en el eje de las “x”.

Para la interpretación de este gráfico se debe tener en cuenta que a la derecha del eje vertical se situaron los genes sobreexpresados en el grupo biológico de estudio, respecto al grupo control, mientras que hacia la izquierda se distribuyeron los genes infraexpresados.

TABLA A1. Lista de los 112 genes estudiados

N°	Assay ID	GEN	NOMBRE DEL GEN	GRUPO
1	Mm00437762_m1	B2m	beta-2 microglobulin	1. Genes de referencia
2	Mm00446968_m1	Hprt	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	
3	Mm00435617_m1	Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	
4	Mm01277042_m1	Tbp	TATA box binding protein	
5	Mm01201237_m1	Ubc	ubiquitin C	
6	Mm01722325_m1	Ywhaz	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	
7	Mm00599890_m1	Ifngr1	interferon gamma receptor 1	2. Citoquinas y sus receptores
8	Mm00492626_m1	Ifngr2	interferon gamma receptor 2	
9	Mm01168134_m1	Ifng	interferon gamma	
10	Mm01178820_m1	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	
11	Mm00436955_m1	Tgfb2	transforming growth factor, beta 2	
12	Mm00436964_m1	Tgfbr1	transforming growth factor, beta receptor I	
13	Mm00436977_m1	Tgfbr2	transforming growth factor, beta receptor II	
14	Mm00443258_m1	Tnf	tumor necrosis factor	
15	Mm00441875_m1	Tnfrsf1a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	
16	Mm00441889_m1	Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	
17	Mm01288580_m1	Irf1	interferon regulatory factor 1	
18	Mm00496477_m1	Irf5	interferon regulatory factor 5	
19	Mm00516788_m1	Irf7	interferon regulatory factor 7	
20	Mm01224532_m1	Irg1	immunoresponsive gene 1	
21	Mm00518984_m1	Il23a	interleukin 23, alpha subunit p19	3. Interleuquinas y sus receptores
22	Mm00434237_m1	Il1r1	interleukin 1 receptor, type I	
23	Mm00439614_m1	Il10	interleukin 10	
24	Mm00434157_m1	Il10rb	interleukin 10 receptor, beta	
25	Mm00434169_m1	Il12a	interleukin 12a	
26	Mm00434174_m1	Il12b	interleukin 12b	
27	Mm00434189_m1	Il12rb1	interleukin 12 receptor, beta 1	
28	Mm00434200_m1	Il12rb2	interleukin 12 receptor, beta 2	
29	Mm00434204_m1	Il13	interleukin 13	
30	Mm00439618_m1	Il17a	interleukin 17A	
31	Mm00521423_m1	Il17f	interleukin 17F	
32	Mm00434214_m1	Il17ra	interleukin 17 receptor A	
33	Mm00434226_m1	Il18	interleukin 18	
34	Mm00456733_m1	Il18bp	interleukin 18 binding protein	
35	Mm00439620_m1	Il1a	interleukin 1 alpha	
36	Mm00434228_m1	Il1b	interleukin 1 beta	
37	Mm00446186_m1	Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	
38	Mm00434256_m1	Il2	interleukin 2	

39	Mm00517640_m1	Il21	interleukin 21	
40	Mm00600317_m1	Il21r	interleukin 21 receptor	
41	Mm01192969_m1	Il22ra2	interleukin 22 receptor, alpha 2	
42	Mm00519943_m1	Il23r	interleukin 23 receptor	
43	Mm00461162_m1	Il27	interleukin 27	
44	Mm00497259_m1	Il27ra	interleukin 27 receptor, alpha	
45	Mm00442885_m1	Il2rg	interleukin 2 receptor, gamma chain	
46	Mm00445259_m1	Il4	interleukin 4	
47	Mm00439646_m1	Il5	interleukin 5	
48	Mm00434284_m1	Il5ra	interleukin 5 receptor, alpha	
49	Mm00446190_m1	Il6	interleukin 6	
50	Mm00439653_m1	Il6ra	interleukin 6 receptor, alpha	
51	Mm00439665_m1	Il6st	interleukin 6 signal transducer	
52	Mm01290062_m1	Csf2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	
53	Mm00655745_m1	Csf2rb	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	
54	Mm00469294_m1	Ebi3	Epstein-Barr virus induced gene 3	
55	Mm00475988_m1	Arg1	arginase, liver	
56	Mm00475162_m1	Foxp3	forkhead box P3	
57	Mm00440338_m1	Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88	4. Enzimas, prostaglandinas, y adaptadores proteicos
58	Mm00440502_m1	Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	
59	Mm00479246_m1	Nox4	NADPH oxidase 4	
60	Mm00478374_m1	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	
61	Mm00439531_m1	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	
62	Mm01219775_m1	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3	
63	Mm00448890_m1	Stat4	signal transducer and activator of transcription 4	
64	Mm01160477_m1	Stat6	signal transducer and activator of transcription 6	
65	Mm00477633_m1	Bcl6	B cell leukemia/lymphoma 6	
66	Mm00492590_m1	Ido1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	
67	Mm00500554_m1	Mmp12	matrix metallopeptidase 12	
68	Mm00485054_m1	Mmp14	matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)	
69	Mm00476361_m1	Nfkb1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1, p105	
70	Mm00479807_m1	Nfkb2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 2, p49/p100	
71	Mm00450960_m1	Tbx21	T-box 21	
72	Mm00441891_m1	Cd40	CD40 antigen	5. Moléculas coestimuladoras y de adhesión celular
73	Mm00441911_m1	Cd40lg	CD40 ligand	
74	Mm00711660_m1	Cd80	CD80 antigen	
75	Mm00444543_m1	Cd86	CD86 antigen	
76	Mm00486849_m1	Ctla4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	
77	Mm03048248_m1	Cd274	CD274 antigen	
78	Mm00516023_m1	Icam1	intercellular adhesion molecule 1	
79	Mm00494862_m1	Icam2	intercellular adhesion molecule 2	

80	Mm00497600_m1	Icos	inducible T cell co-stimulator	
81	Mm00497237_m1	Icosl	icos ligand	
82	Mm00434513_m1	Itgb2	integrin beta 2	
83	Mm00486868_m1	Cd83	CD83 antigen	
84	Mm00493071_m1	Lag3	lymphocyte-activation gene 3	
85	Mm01285676_m1	Pdcd1	programmed cell death 1	
86	Mm00454540_m1	Havcr2	hepatitis A virus cellular receptor 2	
87	Mm00441242_m1	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	6. Quimiocinas y sus receptores
88	Mm00441258_m1	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	
89	Mm00443111_m1	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	
90	Mm01302427_m1	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	
91	Mm00443113_m1	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	
92	Mm01216147_m1	Ccr1	chemokine (C-C motif) receptor 1	
93	Mm01216173_m1	Ccr2	chemokine (C-C motif) receptor 2	
94	Mm01216171_m1	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	
95	Mm01301785_m1	Ccr7	chemokine (C-C motif) receptor 7	
96	Mm04207460_m1	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	
97	Mm00445235_m1	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	
98	Mm00436450_m1	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	
99	Mm00434946_m1	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	
100	Mm00438258_m1	Cxcr2	chemokine (C-X-C motif) receptor 2	
101	Mm00438259_m1	Cxcr3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	
102	Mm00434772_m1	Xcl1	chemokine (C motif) ligand 1	
103	Mm00441260_m1	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	
104	Mm00444533_m1	Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	
105	Mm00469712_m1	Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	
106	Mm01701838_m1	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	
107	Mm00432086_m1	Cxcr5	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	
108	Mm00442346_m1	Tlr2	toll-like receptor 2	7. Receptores tipo Toll
109	Mm01207404_m1	Tlr3	toll-like receptor 3	
110	Mm00445273_m1	Tlr4	toll-like receptor 4	
111	Mm00446590_m1	Tlr7	toll-like receptor 7	
112	Mm00446193_m1	Tlr9	toll-like receptor 9	

A2. Resultados del análisis realizado con STRING.

Network Stats

number of nodes: 31	*expected number of edges: 2*
number of edges: 32	*PPI enrichment p-value: < 1.0e-16*
average node degree: 2.06	*your network has significantly more interactions than expected*
avg. local clustering coefficient: 0.324	

Functional enrichments in your network

Biological Process (GO)			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
GO:0030595	leukocyte chemotaxis	10	7.57e-15

KEGG Pathways			
pathway ID	*pathway description*	*count in gene set*	*false discovery rate*
04630	Jak-STAT signaling pathway	7	3.51e-08

TABLA A3. Funciones de los genes con EGD estadísticamente significativa.

Gen	Generalidades (funciones)
Ccl2	Factor quimiotáctico que atrae a los monocitos, pero no a los neutrófilos ni eosinófilos. Se une a los receptores de quimioquinas CCR2 y CCR4.
Itgb2	Codifica una cadena beta de integrina, que se combina con múltiples cadenas alfa para formar diferentes heterodímeros de integrina. Las integrinas son proteínas integrales de la superficie celular que participan en la adhesión celular, así como en la señalización que ocurre en superficie celular. La proteína codificada desempeña un papel importante en la respuesta inmune y los defectos en este gen causan deficiencia de adhesión de leucocitos.
Tbx21	T-box 21; Factor de transcripción que controla la expresión de IFN-γ. Inicia el desarrollo del linaje TH1 a partir de células precursoras TH *naive*, participa en la activcación del perfil TH1 y reprime el perfil TH2.
Il17ra	Receptor para IL17A. Receptor para IL17F. Se une a IL17A con mayor afinidad que a IL17F. La interleuquina 17A (IL17A) es una citoquina proinflamatoria secretada por linfocitos T activados. Es un potente inductor de la maduración de precursores hematopoyéticos CD34-positivos en neutrófilos. La proteína transmembrana codificada por este gen (receptor de interleucina 17A, IL17RA) es una glucoproteína de membrana de tipo I omnipresente que se une con baja afinidad a la interleucina 17A.
Irf5	Factor regulador de interferón 5. Factor de transcripción implicado en la inducción de interferones IFNA e INFB y citoquinas inflamatorias tras la infección por virus. Activado por señalización TLR7 o TLR8 (Por similitud)
Mmp12	Endopeptidasa dependiente de zinc, con actividad proteolítica en la degradacón de matriz extracellular.
Il12rb2	Receptor para interleuquina 12. Esta subunidad es el acoplamiento del componente de señalización a la vía JAK2 / STAT4. Promueve la proliferación de células T así como de células NK. Induce la promoción de las células T hacia el fenotipo Th1 potenciando fuertemente la producción de IFN-gamma. También puede activar STAT3.
Il12rb1	Funciona como un receptor de interleuquina que se une a la interleuquina-12 con baja afinidad y participa en la transducción de IL-12. Asociado con IL12RB2 forma un receptor funcional de alta afinidad para IL12. Asociado también con IL23R para formar el receptor de interleucina-23 que funciona en la transducción de señal IL-23 probablemente a través de la activación de la cascada de señalización Jak-Stat
Il27ra	Receptor para IL27. Requiere IL6ST / gp130 para mediar la transducción de señal en respuesta a IL27. Este sistema de señalización actúa a través de STAT3 y STAT1. Involucrado en la regulación de las respuestas inmunes de tipo Th1. También parece estar involucrado en mecanismos de defensa innata.
Cd83	Codifica para una proteína transmembranal tipo I, puede desempeñar un papel significativo en la presentación de antígenos o las interacciones celulares que siguen a la activación de linfocitos.
CD274	También conocido como PDL1, es un ligando que se une con el receptor PD1, que se encuentra comúnmente en las células T, y actúa para bloquear la activación de las células T
Il10	Producida por células T CD4+ y CD8+, B, monocitos, macrófagos. Desactiva los mecanismos leishmanicidas de macrófagos. Inactiva la expresión de moléculas coestimuladoras y la expresión de MHC. Inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias. Promueve la supervivencia de las células B.
Nos2	Óxido nítrico sintasa 2, inducible; Produce óxido nítrico (NO) que es una molécula mensajera con diversas funciones en todo el cuerpo. En los macrófagos, el NO media las acciones tumoricidas y bactericidas. También tiene actividad nitrosilasa y media S-nitrosilación de cisteína de proteínas diana citoplásmicas tales como PTGS2 / COX2.
Irf1	Factor regulador de interferón 1; Regulador transcripcional que muestra una notable diversidad funcional en la regulación de las respuestas celulares. Estos incluyen la regulación de IFN y genes inducibles por IFN, respuesta del huésped a infecciones virales y bacterianas, regulación de muchos genes expresados durante la hematopoyesis, inflamación, respuestas inmunes y proliferación y diferenciación celular, regulación del ciclo celular e inducción de detención del crecimiento y muerte celular programada después del daño del ADN.
Irf7	Irf7 Factor regulador de interferón 7; Regulador clave de la transcripción de la respuesta inmune dependiente del interferón tipo I (IFN) y juega un papel crítico en la respuesta inmune innata contra los virus de ADN y ARN. Regula la transcripción de los genes IFN de tipo I (IFN-alfa e IFN-beta) y los genes estimulados por IFN (ISG) uniéndose a un

	elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE) en sus promotores. Puede activar de manera eficiente los genes IFN-beta (IFNB) e IFN-alfa (IFNA) y mediar en su inducción a través de la vía independiente de MyD88 activada por virus y la dependiente de MyD88 activada por TLR
Ifngr1	Receptor de interferón gamma 1. Se asocia con IFNGR2 para formar el receptor de IFN-γ. La unión del ligando estimula la activación de la vía de señalización JAK/STAT.
Havcr2	Receptor celular del virus de la Hepatitis A 2. Receptor de superficie celular específico de células Th1 que regula la activación de los macrófagos; inhibe las respuestas auto y aloinmunitarias mediadas por linfocitos tipo 1 (Th1) de T-helper y promueve la tolerancia inmunológica.
Ccl7	Factor quimiotáctico que atrae monocitos y eosinófilos, pero no neutrófilos. Se une a CCR1, CCR2 y CCR3. Ccl7 es un sustrato *in vivo* de la MMP2 (metaloproteinasa de matriz 2) una enzima que degrada componentes de la matriz extracellular.
Cxcl13	Fuertemente quimiotáctico para los linfocitos B, débilmente para monocitos y macrófagos del bazo, pero sin actividad quimiotáctica para los granulocitos. Se une a BLR1 / CXCR5. Puede desempeñar un papel en la dirección de la migración de los linfocitos B a los folículos en los órganos linfoides secundarios.
Tnf	Factor de necrosis tumoral. Citoquina que se une a TNFRSF1A / TNFR1 y TNFRSF1B / TNFBR. Se secreta principalmente por los macrófagos y puede inducir la muerte celular de ciertas líneas celulares tumorales. Bajo ciertas condiciones puede estimular la proliferación celular e inducir la diferenciación celular. El factor de necrosis tumoral alfa participa en la eliminación de Leishmania mediante aumento de actividad de macrófagos y síntesis de NO. Promueve la respuesta celular de tipo Th1. Mejora la fagocitosis y citotoxicidad de los granulocitos. Atrae neutrófilos.
Irf7	Factor regulador de interferón 7. Regulador clave de la transcripción de la respuesta inmune dependiente del interferón tipo I (IFN) y juega un papel crítico en la respuesta inmune innata contra los virus de ADN y ARN. Puede activar de manera eficiente los genes IFN-beta (IFNB) y IFN-alfa (IFNA) y mediar en su inducción a través de la vía independiente de MyD88 activada por virus y la dependiente de MyD88 activada por TLR.
Ccr1	Receptor para una quimiocina tipo C-C. Se une a MIP-1-alfa, RANTES, y de manera menos eficiente, a MIP-1-beta o MCP-1 y posteriormente transduce una señal al aumentar el nivel de iones de calcio intracelular. Responsable de afectar la proliferación de células madre.
Il1r1	Receptor para IL1A, IL1B e IL1RN. Después de unirse a la interleucina-1 se asocia con el corecptor IL1RAP para formar el complejo receptor de interleuquina-1 de alta afinidad que media la activación dependiente de interleuquina-1 de NF-kappa-B, MAPK y otras vías. La señalización implica el reclutamiento de moléculas adaptadoras tales como TOLLIP, MYD88 e IRAK1 o IRAK2 a través de los respectivos dominios TIR de las subunidades receptor / correceptor. Liga ligandos con afinidad comparable y unión de antagonista IL1RN previene la asociación con IL1RAP para formar un complejo de señalización
Stat4	Realiza una doble función: transducción de señal y activación de la transcripción. Involucrado en la señalización de IL12. En respuesta a citocinas y factores de crecimiento, los miembros de la familia STAT son fosforilados por las quinasas asociadas al receptor, y luego forman homodímeros o heterodímeros que se desplazan al núcleo celular donde actúan como activadores de la transcripción. Esta proteína es esencial para mediar respuestas a IL12 en linfocitos y para regular la diferenciación de células T helper.
Pdcd1	Receptor de muerte programada 1. Es un mediador de la apoptósis, presente en muchas células de la respuesta inmune (células T, B, mieloides en células T) que desencadena el agotamiento de las células T en leishmaniasis visceral.
Xcl1	Actividad quimiotáctica para linfocitos, pero no para monocitos o neutrófilos
Il6ra	Parte del receptor de interleucina 6. Se une a IL6 con baja afinidad, pero no transduce una señal. La activación de la señal requiere una asociación con IL6ST. La activación puede conducir a la regulación de la respuesta inmune, reacciones de fase aguda y hematopoiesis.
Cxcl10	Quimiotáctica para monocitos y linfocitos T. Se une a CXCR3

Arg1	Actúa en la homeostasis de la L-arginina en tejidos, compite con la NOS2 por el sustrato intracelular: arginina. El metabolismo de la arginina es un regulador crítico de la respuesta inmune innata y adaptativa. Implicado en una vía efectora antimicrobiana en granulocitos polimorfonucleares (PMN). Tras la muerte celular de las células PMN, se libera del fagolisosoma y se agota la arginina en el microambiente, lo que conduce a la proliferación de las células T y el asesino natural (NK) suprimidas y la secreción de citoquinas.
Il21r	Involucrado en la activación de linfocitos. Este receptor transduce la señal promotora para IL21, y es importante para la proliferación y diferenciación de células T, células B y células asesinas naturales (NK). La unión del ligando de este receptor conduce a la activación de múltiples moléculas de señalización que incluyen JAK1, JAK3, STAT1 y STAT3.
Cd40lg	Glicoproteína de membrana expresada en células T activadas y plaquetas que se une y activa CD40 en la superficie de células presentadoras de antígeno (También puede existir en forma soluble sCD40LG). La estimulación a través de CD40 mejora la supervivencia de APC y promueve la secreción de IL-1, IL-6 IL-8, IL-10, IL-12, TNF-α, MIP-1α y enzimas tales como metaloproteinasas de matriz, así como síntesis de NO
Myd88	Proteína adaptadora que juega un papel clave en las vías de transducción de la familia TLR/IL-1R en la respuesta inmune innata. Activa IRF1 lo que resulta en su rápida migración al núcleo para mediar una inducción eficiente de los genes IFN-beta, NOS2/INOS e IL12A.
Ccr2	Receptor para las quimiocinas CCL2, CCL7 y CCL12. Transduce una señal al aumentar los niveles de iones calcio intracelulares.
Ifng	Producido por células T activadas y células NK. Activa macrófagos y mejora la actividad microbicida. Actúa sobre las células B para inhibir el cambio a isotipos. Promueve la diferenciación de las células T CD4+ al subconjunto Th1. Inhibe la diferenciación de las células Th2 y Th17.
Il6st	La proteína codificada por este gen es un transductor de señal compartido por muchas citoquinas, que incluyen interleucina 6 (IL6), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de la leucemia (LIF) y oncostatina M (OSM). Esta proteína funciona como parte del complejo receptor de citoquinas. La activación de esta proteína depende de la unión de las citoquinas a sus receptores. La unión de IL6 a IL6R induce la homodimerización de IL6ST y la formación de un complejo receptor de alta afinidad, que activa Janus quinasas. Eso causa la fosforilación de residuos de tirosina IL6ST que a su vez activa STAT3. Media las señales que regulan la respuesta inmune, la hematopoyesis, el control del dolor y el metabolismo óseo.
Stat1	Transductor de señal y activador de transcripción que media respuestas celulares a interferones (IFN), a otras citoquinas y otros factores de crecimiento. Después de la unión de IFN de tipo I (IFN-alfa e IFN-beta) a receptores de superficie celular, la señalización a través de proteínas quinasas conduce a la activación de Jak quinasas (TYK2 y JAK1) y a la fosforilación de tirosina de STAT1 y STAT2. Las STAT fosforiladas se dimerizan y se asocian con ISGF3G / IRF-9 para formar un complejo denominado factor de transcripción ISGF3, que ingresa al núcleo.
Nfkb2	Factor de transcripción pleiotrópico presente en casi todos los tipos de células y es el punto final de una serie de eventos de transducción de señales que se inician por una amplia gama de estímulos relacionados con muchos procesos biológicos como inflamación, inmunidad, diferenciación, crecimiento celular, apoptosis.
Tlr9	Componente clave de la inmunidad innata y adaptativa. Los TLR (receptores Toll-like) controlan la respuesta inmune del huésped contra los patógenos a través del reconocimiento de patrones moleculares específicos de los microorganismos. TLR9 es un TLR sensor de nucleótidos que se activa mediante dinucleótidos de citidina-fosfato-guanosina (CpG) no metilados. Actúa a través de MYD88 y TRAF6, lo que lleva a la activación de NF-kappa-B, la secreción de citoquinas y la respuesta inflamatoria.
Il18bp	Se une a IL-18 e inhibe su actividad. Funciona como inhibidor de la respuesta temprana de las citoquinas Th1.
Cxcl9	Codifica una proteína que se cree está involucrada en el tráfico de células T. La proteína codificada se une CXCR3 y es un quimioatrayente para linfocitos pero no para neutrófilos. Involucrada en la respuesta inmune innata y adaptativa de *Leishmania.*