



---

---

**UNIVERSIDAD POPULAR  
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y FACULTAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES  
SOCS4 Y SOCS6 EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE  
SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON  
ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA  
LBM. ADRIANA HERNÁNDEZ REYES**

**DIRECTORA DE TESIS:  
D. en Cs. VIRGINIA SEDEÑO MONGE**

**Co-DIRECTORA:  
D. en Cs. ELIZABETH BAUTISTA RODRÍGUEZ**

**ASESORA:  
D. en Cs. Nora Hilda Rosas Murrieta**



Puebla, México.

Octubre del 2019



**UPAEP – Secretaría General**

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

**Tesis Digitales Restricciones de uso:**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD POPULAR  
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE POSGRADOS  
INVESTIGACIÓN Y CONSULTORÍA  
DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

Se aprueba la tesis:

**Análisis de la Transcripción de los Genes *socs4* y *socs6* en Células  
Mononucleares de Sangre Periférica de Pacientes con Esclerosis  
Múltiple**

**Presenta**

LBM Adriana Hernández Reyes

**Comité De Revisión**

\_\_\_\_\_  
D. En Cs. Virginia Sedeño Monge  
Directora

\_\_\_\_\_  
D. En Cs. Elizabeth Bautista Rodriguez  
Co-Directora

\_\_\_\_\_  
D. En Cs. Nora Hilda Rosas Murricta  
Asesor

Puebla, Pue

Septiembre del 2019

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante todo el desarrollo de todo el postgrado académico. Gracias por la ayuda y confianza depositada en mí.

## CONTENIDO

ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN .....	10
ABSTRACT .....	12
CAPITULO 1 .....	14
I.1 INTRODUCCIÓN .....	14
I.II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
I.III OBJETIVOS.....	16
I.IV HIPOTESIS.....	17
I.V JUSTIFICACIÓN .....	17
CAPITULO II.....	18
II. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN .....	18
2.1 Esclerosis múltiple .....	18
2.2 Etiología de la enfermedad .....	19
2.3 Fisiopatología .....	20
2.4 Epidemiología de la EM .....	23
2.5 Diagnóstico, evaluación y clasificación clínica .....	24
2.6 Tratamientos terapéuticos actuales para EM .....	26
2.6.1 Interferón beta (IFN- $\beta$ ) .....	26
2.6.2 Acetato de Glatirámero (AG) .....	27
2.6.3 Otros tratamientos para EM .....	28
2.7 Vía de señalización JAK-STAT .....	30
2.8 Proteínas supresoras de la señalización por citocinas .....	32
2.9 Características de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	33
CAPITULO III.....	36
III. METODOLOGIA .....	36
3.1 Definición de la población .....	36
3.2 Criterios de selección de la muestra .....	36
3.3 Obtención de las muestras .....	37
3.4 Extracción de células mononucleares de sangre periférica.....	37

3.5 Extracción de ARN total de leucocitos método TRIZOL.....	38
3.6 Tratamiento con ADNasa .....	40
3.7 Verificación de la integridad y cuantificación de ARN total .....	41
3.8 Diseño de oligonucleótidos .....	42
3.9 RT-PCR de punto final para la amplificación de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	44
3.10 qRT-PCR en tiempo real con SYBR Green .....	45
3.11 Curva de normalización para los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	47
3.12 Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cuantificación relativa (qRT-PCR).....	48
3.13 Análisis estadístico .....	48
3.14 Análisis del promotor de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	48
3.15 Verificación de los productos amplificados de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> por qRT-PCR en tiempo real mediante secuenciación .....	50
CAPITULO IV .....	52
IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	52
4.1 Definición de los grupos de estudio.....	52
4.2 ARN de células mononucleares.....	52
4.3 Estandarización por RT-PCR de punto final de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	53
4.4 Eficiencia de amplificación por qRT-PCR en tiempo real de los transcritos de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	55
4.5 Validación de amplificación de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	60
4.6 Análisis de qRT-PCR en tiempo real de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> por el método $2^{-\Delta\Delta Ct \pm S}$ en pacientes con EM y en el grupo control.....	61
4.7 Análisis del nivel de transcripción de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> en relación al género .....	62
4.8 Nivel de transcripción de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> en relación a los tratamientos de IFN- $\beta$ y AG.....	63
4.9 Análisis del nivel de la transcripción de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> en relación a la dosis de IFN- $\beta$ .....	65
4.10 Correlación de la progresión de la enfermedad con la transcripción de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	68

4.11 Identificación <i>in silico</i> de los factores de transcripción del promotor de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	69
4.12 Secuenciación de los productos amplificados por qRT-PCR en tiempo real de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	70
DISCUSIÓN.....	72
CAPITULO V.....	75
V.CONCLUSIONES .....	75
VI. ANEXOS.....	76
6.1 Carta de consentimiento informado .....	76
6.2 Hoja de recolección de datos.....	78
6.3 Solución de lisis de eritrocitos .....	79
6.4 Solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% .....	79
6.5 Etanol al 75 %.....	79
6.6 Buffer TAE y TBE.....	80
6.6.1 Buffer de corrida para electroforesis en gel de agarosa TAE 50x .....	80
6.6.2 Buffer de corrida para electroforesis en gel de agarosa TBE 10x .....	81
BIBLIOGRAFÍA .....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desmielinización axonal. ....	18
Figura 2. Modelo de la patogénesis en la esclerosis múltiple .....	22
Figura 3. Prevalencia de la EM por país .....	24
Figura 4. Escala de discapacidad de la EM .....	26
Figura 5. Vía de señalización de JAK-STAT .....	31
Figura 6. Estructura por bloques de la familia de proteínas SOCS .....	32
Figura 7. Ubicación de <i>SOCS4</i> en el cromosoma .....	33
Figura 8. Estructura de las dos variantes de mensajeros de <i>SOCS4</i> .....	34
Figura 9. Ubicación de <i>SOCS6</i> en el cromosoma .....	35
Figura 10. Estructura del ARN mensajero de <i>SOCS6</i> .....	35
Figura 11. Regulación de las interleucinas a través de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	35
Figura 12. Composición de la sangre periférica en los tubos de EDTA .....	38
Figura 13. Método Secuenciación de Sanger.....	50
Figura 14. Muestras del ARN total obtenidas.....	52
Figura 15. Tratamiento con DNasa I en muestras de ARN total.....	53
Figura 16. Ubicación de los oligos de <i>SOCS4</i> en el ARNm .....	54
Figura 17. Ubicación de los oligos de <i>SOCS6</i> en el ARNm .....	54
Figura 18. Productos de amplificación de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> por RT-PCR en punto final ...	55
Figura 19. Curva estándar de <i>SOCS4</i> y <i>HPRT</i> .....	56
Figura 20. Curva de amplificación y disociación de <i>SOCS4</i> y <i>HPRT</i> .....	57
Figura 21. Curva estándar de <i>SOCS6</i> y <i>HPRT</i> .....	58
Figura 22. Curva de amplificación y disociación de <i>SOCS6</i> y <i>HPRT</i> .....	59
Figura 23. Curva de validación de las eficiencias de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> .....	60
Figura 24. Nivel de transcripción de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> en pacientes con EM .....	61
Figura 25. Nivel de transcripción de <i>SOCS4</i> de acuerdo al género .....	62
Figura 26. Nivel de transcripción de <i>SOCS6</i> de acuerdo al género .....	63
Figura 27. Nivel de transcripción de <i>SOCS4</i> de acuerdo a los tratamientos .....	64
Figura 28. Nivel de transcripción de <i>SOCS6</i> de acuerdo a los tratamientos .....	64
Figura 29. Nivel de transcripción de <i>SOCS4</i> de acuerdo al tratamiento de IFN- $\beta$ .....	66

Figura 30. Nivel de transcripción de <i>SOCS4</i> de acuerdo al tipo de IFN- $\beta$ .....	66
Figura 31. Nivel de transcripción de <i>SOCS6</i> de acuerdo las dosis de IFN- $\beta$ .....	67
Figura 32: Nivel de transcripción de <i>SOCS6</i> de acuerdo a los tipos de IFN- $\beta$ .....	67
Figura 33. Sitios de unión a factor de transcripción al promotor del gen <i>SOCS4</i> .....	69
Figura 34. Sitios de unión a factor de transcripción al promotor del gen <i>SOCS6</i> .....	69
Figura 35. Resultados de secuenciación del gen <i>SOCS4</i> .....	70
Figura 36. Resultados de secuenciación del gen <i>SOCS6</i> .....	71
Figura 37. Modelo hipotético de la regulación negativa de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> en la señalización de interleucinas en pacientes con EM tratados con AG	74

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias de <i>SOCS4</i> , <i>SOCS6</i> y <i>HPRT</i> .....	43
Tabla 2: Condiciones para la ampliación por RT-PCR de punto final.....	45
Tabla 3: Condiciones de RT-PCR en tiempo real .....	46
Tabla 4. Tabla de preparación de solución de lisis de eritrocitos .....	79
Tabla 5. Tabla de preparación de NaCl al 0.9% .....	79
Tabla 6. Tabla de preparación de etanol al 75% .....	79
Tabla 7. Tabla de preparación de TAE 10x para 1L .....	80
Tabla 8. Tabla de preparación de TBE 1x para 1L .....	81

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AG</b>	Acetato de glatirámero
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>CT</b>	Cycle threshold – Umbral del ciclo
<b>EDSS</b>	Escala expandida del estado de discapacidad
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>HLA</b>	Antígenos leucocitarios humanos
<b>HPRT</b>	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa
<b>IFN-β</b>	Interferón beta
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRM</b>	Imagen de resonancia magnética
<b>JAK-STAT</b>	Cinasas janus y proteínas transductoras y activadoras de la señalización de la transcripción
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOCS4</b>	Supresores de la señalización de citocinas 4
<b>SOCS6</b>	Supresores de la señalización de citocinas 6
<b>TAE</b>	Tris, Ácido Acético, EDTA
<b>TBE</b>	Tris, Borato, EDTA

## RESUMEN

### ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES *SOCS4* Y *SOCS6* EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

**INTRODUCCIÓN:** La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune, crónica y degenerativa del sistema nervioso central (SNC), caracterizada por inflamación y desmielinización del tejido axonal. Se ha evidenciado la participación de citocinas proinflamatorias tales como: IL-4, IL-6, IL-23, IL-27 e IFN- $\gamma$ , en el progreso de la enfermedad. Se han descrito mecanismos importantes de proteínas que ejercen una retroalimentación negativa, para regular y evitar así la sobreactivación de la vía JAK STAT iniciada por las citocinas proinflamatorias; una de ellas, son las proteínas llamadas supresores de la señalización de citocinas (SOCS) regulan negativamente la vía JAK-STAT.

**OBJETIVO:** En el presente trabajo analizamos los niveles de los transcritos de *SOCS4* y *SOCS6* por qRT-PCR en tiempo real y correlacionarlos con la progresión de la enfermedad y los tratamientos de la EM.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Los transcritos de *SOCS4* y *SOCS6* se cuantificaron mediante RT-PCR en tiempo real, a partir del ARN total de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EM en fase recurrente, en tratamiento con Interferón beta (IFN- $\beta$ ) o acetato de glatirámico (AG), y de un grupo de individuos física y neurológicamente sanos (grupo control). Los datos de la progresión de la enfermedad se obtuvieron a través de la escala EDSS; Los resultados se analizaron utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , los productos amplificados fueron secuenciados por el método de Sanger. Se realizó *in silico* un análisis de la región promotora de ambos genes para identificar los factores de transcripción (STAT).

**RESULTADOS:** Se analizaron 30 muestras de ARN de pacientes con EM de las cuales fueron 19 mujeres y 11 hombres, y 30 muestras del grupo control, las primeras fueron obtenidas del Servicio de Neurología del Hospital del IMSS. Respecto al nivel de transcripción de *SOCS4* el grupo control fue de  $1.0102 \pm 0.20$  y en pacientes con EM fue de  $1.0124 \pm 0.20$  8 ( $p=0.5$ ) y para *SOCS6* fue de  $1.0104 \pm 0.21$  en el grupo control y en pacientes con EM se encontró una disminución,  $0.9858 \pm 0.18$  ( $p=0.6$ ). Para *SOCS4* los pacientes tratados con AG mostraron un incremento ( $p=0.06$ )  $1.1603 \pm 0.22$  comparados con los tratados con IFN- $\beta$ , cuyo valor de transcripción fue de  $0.9498 \pm 0.2$ , para el transcrito de *SOCS6* en pacientes con AG fue menor  $0.7782 \pm 0.15$  en comparación con los tratados con IFN- $\beta$ , que fue de  $1.0605 \pm 0.2$  ( $p=0.14$ ). De acuerdo a las diferentes dosis del IFN- $\beta$ , el nivel de transcripción de *SOCS4* y *SOCS6* fue mayor en la dosis de 12 MUI,  $1.1310 \pm 0.21$  y  $1.3296 \pm 0.23$  respectivamente, en comparación con las dosis inferiores ( $p=0.8$ ,  $p=0.5$ ) (6 y 8 MUI). Referente al tipo de IFN- $\beta$  (1A y 1B), el nivel de transcripción fue mayor en el tipo 1A para ambos genes, de  $1.38 \pm 0.4$  para *SOCS4* y para *SOCS6*  $1.1644 \pm 0.19$  ( $p=0.7$ ,  $p=0.9$ ). Con respecto al género el nivel de transcripción de ambos genes fue menor en mujeres con EM; de  $0.9189 \pm 0.21$  para *SOCS4* y para *SOCS6* de  $0.8974 \pm 0.16$  en comparación con mujeres del grupo control ( $1.0101 \pm 0.2$  para *SOCS4* y de  $1.008 \pm 0.19$  para *SOCS6*) ( $p=0.9$ ,  $p=0.8$ ). El valor de EDSS en los pacientes con EM fue  $2.76 \pm 1.25$ , en pacientes del género femenino fue de  $2.84 \pm 1.19$ , y del género masculino fue de  $2.69 \pm 1.29$ ; en pacientes con IFN- $\beta$  fue de  $3.7 \pm 5.1$  y con AG de  $3.37 \pm 1.45$ . Se realizó análisis de correlación de Spearman, entre el valor de EDSS y el  $\Delta CT$  de *SOCS4* y *SOCS6*, obteniéndose R menor a 0.4, por lo

que no se describen. En el análisis *in silico* se encontraron 32 sitios de unión a STAT1 en la región promotora de *SOCS4* y para *SOCS6*, 9 sitios de unión a STAT6.

**CONCLUSION:** No se encontraron diferencias de los transcritos entre el grupo con EM y el control. Se encontró un incremento del transcrito de *SOCS4* y una disminución de *SOCS6* en pacientes tratados con AG respecto a los tratados con IFN- $\beta$ , además pacientes tratados con 12MUI de IFN- $\beta$  y con el tipo 1A presentaron un mayor nivel de transcripción en ambos genes; por lo que el tipo de inmunomodulador (AG sobre IFN- $\beta$ ) y la dosis si modifican el nivel de transcripción de *SOCS4* y *SOCS6*; se sugiere incrementar el número de muestras para corroborar los resultados. No se encontró correlación entre los niveles de los transcritos y el valor de EDSS. De acuerdo con el análisis *in silico* podemos inferir que la transcripción de *SOCS4* y *SOCS6* está regulada por factores de transcripción STAT, generados por la activación de la vía JAK STAT a través de las interleucinas.

**PALABRAS CLAVE:** Esclerosis Múltiple, JAK-STAT, *SOCS4*, *SOCS6*, IFN- $\beta$ , acetato de glatirámico

## ABSTRACT

### ANALYSIS OF THE TRANSCRIPTION OF GENES *SOCS4* AND *SOCS6* IN MONONUCLEAR CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

**INTRODUCTION:** Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, chronic and degenerative disease of the central nervous system (CNS), characterized by inflammation and demyelination of axonal tissue. The involvement of proinflammatory cytokines such as: IL-4, IL-6, IL-23, IL-27 and IFN- $\gamma$  has been evidenced in the disease progress. Important mechanisms of proteins that exert a negative feedback have been described, to regulate and thus avoid the overactivation of the JAK STAT pathway initiated by the proinflammatory cytokines; One of them are proteins called cytokine signaling suppressors (SOCS) that negatively regulate the JAK-STAT pathway.

**OBJECTIVE:** In this study we analyze the levels of the transcripts of *SOCS4* and *SOCS6* by real-time qRT-PCR and correlate them with disease progression and MS treatments.

**MATERIAL AND METHODS:** The transcripts of *socs4* and *socs6* were quantified by real-time qRT-PCR, from the total RNA of the peripheral blood mononuclear cells of patients with recurrent phase MS, in treatment with Beta Interferon (IFN- $\beta$ ) or glatiramer acetate (GA), and a group of physically and neurologically healthy individuals (control group). Disease progression data were obtained through the EDSS scale; the results were analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, the amplified products were sequenced by the Sanger method. An analysis of the promoter region of both genes was performed *in silico* to identify transcription factors (STAT).

**RESULTS:** 32 samples of RNA from patients with MS were analyzed, of which were 19 women and 11 men and 30 samples from the control group, the first were obtained from the Neurology Service of the IMSS Hospital. Regarding the level of transcription of *SOCS4* the control group was  $1.0102 \pm 0.20$  and in patients with MS was  $1.0124 \pm 0.20$  ( $p=0.5$ ) and for *SOCS6* was  $1.0104 \pm 0.21$  in the control group and in patients with MS was found a decrease,  $0.9858 \pm 0.18$  ( $p=0.6$ ). For *SOCS4* patients treated with GA showed an increase ( $p=0.06$ )  $1,1603 \pm 0.22$  compared to those treated with IFN- $\beta$ , whose transcription value was  $0.9498 \pm 0.2$ , for the transcript of *SOCS6* in patients with GA was less  $0.7782 \pm 0.15$  compared to those treated with IFN- $\beta$ , which was  $1.0605 \pm 0.2$  ( $p=0.14$ ). According to the different doses of IFN- $\beta$ , the level of transcription of *SOCS4* and *SOCS6* was higher at the dose of 12 MUI,  $1.110 \pm 0.21$  and  $1.329 \pm 0.23$  respectively, compared to lower doses ( $p=0.8$ ,  $p=0.5$ ) (6 and 8 MUI). Regarding the type of IFN- $\beta$  (1A and 1B), the level of transcription was higher in type 1A for both genes, from  $1.38 \pm 0.4$  for *SOCS4* and for *SOCS6*  $1.1644 \pm 0.19$  ( $p=0.7$ ,  $p=0.9$ ). With regard to gender, the level of transcription of both genes was lower in women with MS; of  $0.9189 \pm 0.21$  for *SOCS4* and for *SOCS6* of  $0.8974 \pm 0.16$  compared to women in the control group ( $1.0101 \pm 0.2$  for *SOCS4* and  $1.008 \pm 0.19$  for *SOCS6*) ( $p=0.9$ ,  $p=0.8$ ). The EDSS value in patients with MS was  $2.76 \pm 1.25$ , in female patients was  $2.84 \pm 1.19$ , and the male gender was  $2.69 \pm 1.29$ ; in patients with IFN- $\beta$  was  $3.7 \pm 5.1$  and with AG was  $3.37 \pm 1.45$ . Spearman correlation analysis was performed, between the value of EDSS and the  $\Delta CT$  of *SOCS4* and *SOCS6*, obtaining R less than 0.4, so they are not described. In the *in silico* analysis, 32 binding sites for STAT1 were found in the promoter region of *SOCS4* and for *SOCS6*, 9 binding sites for STAT6.

**CONCLUSION:** No differences in transcripts were found between the group with MS and the control. An increase in the transcript of *SOCS4* and a decrease in *SOCS6* were found in patients treated with GA compared to those treated with IFN- $\beta$ , in addition patients treated with 12MUI of IFN- $\beta$  and with type 1A had a higher level of transcription in both genes; so the type of immunomodulator (GA on IFN- $\beta$ ) and the dose if they modify the transcription level of *SOCS4* and *SOCS6*; It is suggested to increase the number of samples to corroborate the results. No correlation was found between the levels of the transcripts and the value of EDSS. According to the *in silico* analysis we can infer that the transcription of *SOCS4* and *SOCS6* is regulated by STAT transcription factors, generated by the activation of the JAK-STAT via the interleukins.

**Key words:** Multiple Sclerosis, JAK-STAT, *SOCS4*, *SOCS6*, IFN- $\beta$ , glatiramer acetate

# CAPITULO 1

## I.1 INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta al sistema nervioso central (SNC) ocasionada por una disfunción del sistema inmunitario, clasificada como neurodegenerativa, pues provoca daños sensoriales, y físicos, originando una gran variedad de síntomas, según la zona del SNC afectada (Bravo-González, F., & Álvarez-Roldán, A. 2017). Las causas de esta enfermedad aún son desconocidas, sin embargo se ha postulado un origen multifactorial; pueden ser factores genéticos que junto con eventos aleatorios y factores ambientales influyen en el desarrollo de la enfermedad (Kamm, C. et al., 2014).

Respecto a la fisiopatología de este padecimiento, la principal característica es la aparición de lesiones o placas formadas por células residentes del SNC y células del sistema inmune, las cuales migran a través de la barrera hematoencefálica e inducen procesos inflamatorios dentro de éste (Flores, L. et al., 2015). Se conoce que los linfocitos T y los macrófagos son las principales células que dirigen la inflamación del SNC y modulan la actividad de la glía y las neuronas a través de diversos mecanismos celulares que conducen a la desmielinización y muerte neuronal en los pacientes con EM (Guerrero-García, J., 2017).

Diversas citocinas proinflamatorias están implicadas en la regulación de las células mieloides y linfoides, por lo tanto, las enfermedades autoinmunitarias son causadas por defectos en genes que codifican para proteínas con actividad inflamatoria o que participan en la ruta de señalización de citocinas. La mayoría de las citocinas utilizan la vía de señalización JAK-STAT (Janus Cinasas - Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción), para transmitir su mensaje, y los supresores de las proteínas de señalización de citocinas (SOCS) son los reguladores más importantes de esta vía. Estas proteínas se unen a los miembros de JAK y a ciertos receptores o moléculas de señalización, y suprimen o inhiben su señalización (Ozkul, C. et al., 2018)

## I.II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EM es una enfermedad del tipo autoinmune, cuyas características afectan directamente al SNC, dando lugar a la inflamación y desmielinización del tejido axonal. Actualmente se han desarrollado múltiples estudios para determinar su etiología y patología; al mismo tiempo, han surgido tratamientos que prometen mejorar la condición de vida de los pacientes, aun cuando estos se encuentran en una fase determinada de la progresión de esta enfermedad (Katsara M, et al. 2018). Tal es el caso del interferón beta (IFN- $\beta$ ) y acetato de glatirámico (GA) cuya accesibilidad es muy amplia, a diferencia de otros tratamientos, la efectividad de dichos tratamientos alcanza un porcentaje bajo, debido a la respuesta de diferentes etapas de la enfermedad.

Además, se han identificado algunas citocinas proinflamatorias como IL-4, IL-6, IL-23, IL-27 e IFN- $\gamma$ , que se encuentran involucradas en la patogénesis de la EM, las cuales son reguladas negativamente por proteínas SOCS, lo cual demuestra su papel importante en la respuesta inmunitaria (Liang, Y., et al. 2014)

No obstante, miembros de esta familia de proteínas podrían estar relacionadas con la EM, debido a la participación de *SOCS6*, el cual inhibe la transcripción de IL-4, IL-6, IL-13, e IL-23 (Rontauroli, S. et al., 2017). Por otro lado, *SOCS4* que inhibir la señalización temprana de IL-1 $\beta$ , y de IL-6, (Ren, S., et al. 2019), y de EGF (Feng, Y., et al. 2016). De tal manera se ha planteado medir los niveles del transcrito de los genes *SOCS4* y *SOCS6*, mediante la técnica de qRT-PCR en tiempo real, a partir de la de extracción de ARN total de leucocitos de sangre periférica, para posteriormente analizar los niveles de expresión, a través del método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , lo cual nos permitirá correlacionar la gravedad de la enfermedad y los tratamientos de IFN- $\beta$  y AG, para poder posteriormente proponerlos como posibles biomarcadores para detectar la progresión de la enfermedad.

### I.III OBJETIVOS

#### Objetivo General:

- Analizar los niveles de transcripción de los genes *SOCS4* y *SOCS6*, mediante qRT-PCR en tiempo real, en células mononucleares de sangre periférica, de pacientes con EM (tratados con IFN- $\beta$  y AG), para correlacionarlos con los tratamientos y la progresión de la enfermedad.

#### Objetivos específicos:

- Estandarizar las condiciones de RT-PCR por punto final, a partir del ARN de leucocitos de personas sanas, para la amplificación de los genes *SOCS4* y *SOCS6*.
- Estandarizar las condiciones de qRT-PCR por tiempo real, a través de una curva de validación de los genes *SOCS4*, *SOCS6* y el gen de referencia *HPRT*, a partir de las diferentes concentraciones de ARN total, para estimar las eficiencias de amplificación de los genes en estudio y el rango dinámico.
- Realizar qRT-PCR por tiempo real a partir del ARN de pacientes con EM y personas sanas, para cuantificar la expresión relativa de los genes *SOCS4* y *SOCS6*.
- Analizar los resultados obtenidos por qRT-PCR por tiempo real por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , entre pacientes con EM y del grupo control.
- Analizar los resultados mediante las pruebas estadísticas, para observar las diferencias entre los grupos de estudio y correlacionar con los tratamientos y la progresión de la enfermedad, con los niveles de transcripción de los genes *SOCS4* y *SOCS6*.
- Analizar *in-silico* la secuencia del promotor de los genes *SOCS4* y *SOCS6* para identificar sitios de unión para los factores de transcripción STATs usando el programa Mathinspector profesional de Genomatix.
- Analizar los productos amplificados por qRT-PCR en tiempo real de los genes *SOCS4* y *SOCS6* usando el método de secuenciación.

## **I.IV HIPOTESIS**

Los niveles de transcripción de los genes *SOCS4* y *SOCS6* en pacientes con EM, están alterados en comparación con personas sanas.

## **I.V JUSTIFICACIÓN**

Desafortunadamente en México no se cuenta con estudios recientes sobre la población que permitan determinar con precisión los casos de EM. La primera evidencia sobre la prevalencia de esta enfermedad fue estimada en el año de 1970, de la cual se establece una prevalencia de 1.6/100.000 habitantes, considerándose una enfermedad de muy baja prevalencia en el país. Se estima que actualmente la prevalencia podría oscilar entre 12 a 13/100.000 habitantes (Rivera, V. M. et al., 2014).

Actualmente el origen de esta enfermedad autoinmune es desconocido, a pesar de ello, se han reconocido diversos factores, ambientales, geográficos, genéticos, así como virus y bacterias; que podrían considerarse como potenciales causas, aunque existe una alta prevalencia en el sexo femenino, aproximadamente del 60%, y aproximadamente en un 40% en hombres (Dendrou, C. A., et al., 2015)

Se sabe que diversos mecanismos moleculares podrían estar relacionados con la EM, la participación y regulación de citocinas proinflamatorias como: de IL-4, IL-6, IL-23, IL-27 e IFN- $\gamma$ , están relacionada con la fisiopatología de la enfermedad (Martins, et al., 2011). La eficacia de los tratamientos considerados como inmunomoduladores o modificadores de la enfermedad como IFN- $\beta$  y AG, pueden estar asociados a diversos mecanismos de control, de los cuales, el más importante es el que desempeñan miembros de las proteínas SOCS (Liang, Y., et al. 2014), por lo que se pretende encontrar una asociación entre el nivel de transcripción de los genes *SOCS4* y *SOCS6*, con respecto al tratamiento

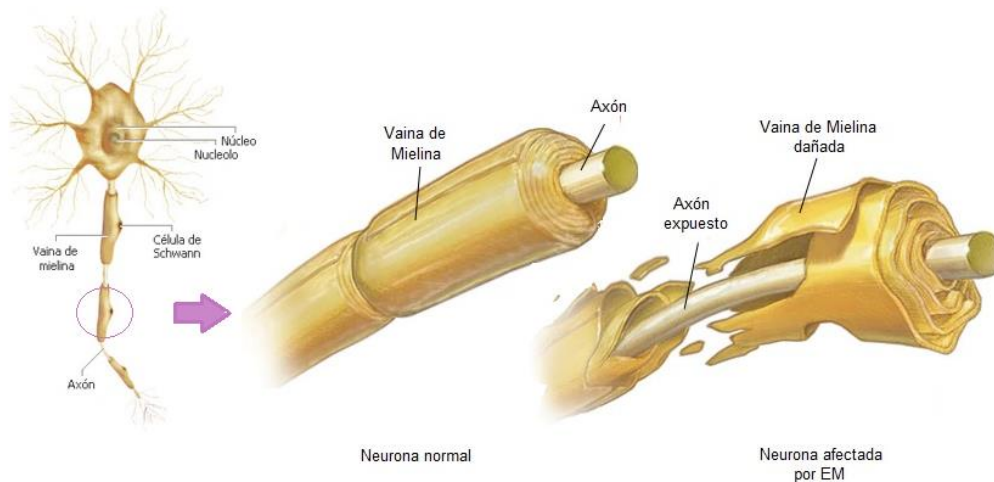
## CAPITULO II

### II. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

#### 2.1 Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta al sistema nervioso central (SNC) ocasionada por una disfunción del propio sistema inmunitario, suele ser clasificada como una enfermedad neurodegenerativa, pues provoca daños sensoriales, y físicos, originando una gran variedad de síntomas, según la zona del SNC afectada (Avsar, T., et al. 2015; Bravo-González, F. & Álvarez-Roldán, A. 2017).

El proceso inflamatorio de la EM afecta, principalmente, a la sustancia blanca, que está conformada por vainas de mielina, lo que da lugar a la formación de un tejido “escleroso” o endurecido en múltiples áreas del encéfalo y de la médula espinal (Martinez-Altarriba, M. et al. 2015). Las lesiones del proceso inflamatorio conducen a una rotura de la barrera hematoencefálica (BHE), donde se infiltran los linfocitos T y los macrófagos invadiendo las principales células del SNC, modulando la actividad de la glía y las neuronas a través de diversos mecanismos celulares que conducen a la desmielinización y daño axonal en los pacientes con EM (Figura 1) (Matías-Guiu, J. et al., 2017).



**Figura 1. Desmielinización axonal.**

Diferencia entre axón de una neurona normal y el axón de una persona con EM. (Tomada y modificada de Mayo Clinic, patient care & health)

En cada episodio inflamatorio se produce pérdida axonal, eventualmente, se produce una degeneración distal y retrógrada, debido a que se desencadena una respuesta contra los antígenos de mielina, como la proteína básica de mielina (PBM), la proteína proteolípida

(PLP), y la glucoproteína de mielina/oligodendrocitos, las cuales pueden ser detectadas mediante inmunoensayos para posible diagnóstico de la enfermedad (Howard, J., Trevick, S., & Younger, D. S. 2016).

## **2.2 Etiología de la enfermedad**

Las causas de la enfermedad aún son desconocidas, pero se ha postulado que tiene una etiología multifactorial, entre predisposiciones genéticas e inmunológicas, factores ambientales y factores biológicos (virus y bacterias), las cuales en conjunto desarrollan la enfermedad. (Quintana et al, 2014).

Aunque no es considerada una enfermedad hereditaria, el riesgo de contraerla entre familiares de primer grado de pacientes con EM es de 10 a 50 veces mayor que la población general, pero entre los factores genéticos de riesgo, se ha demostrado que el gen HLA-DRB1 clase II del complejo de histocompatibilidad principal (MHC), del haplotipo HLA-DR2 (DRB1\*1501, DRB5\*0101, DQA1\*0102, DQB1\*0602) en el cromosoma 6p21 está significativamente asociada con la EM, y el alelo HLA-DR15/DQ6 el más fuerte y HLADRB1\*1501 continúa siendo el principal alelo de susceptibilidad en la EM (Hollenbach, J.A. & Oksenberg, J.R., 2015, Alroughani, R., & Yamout, B., 2018). Recientemente, los alelos del gen alfa del receptor de interleucina-2 (IL-2RA) y el gen alfa del receptor de interleucina-7 (IL-7RA) también se han identificado como factores de riesgo heredables (Garg, N., & Smith, T. W. 2015).

Diversos estudios han sugerido que existe una evidencia creciente de que los niveles bajos de vitamina D están asociados con una un mayor riesgo de EM, por lo que la ingesta suplementaria de vitamina D puede tener un efecto protector (Nielsen, N., et al. 2017). Otro factor como la ubicación geográfica de residencia antes de la adolescencia también es predictiva del riesgo de EM, con mayores tasas de la enfermedad en las latitudes norte y sur en comparación con los países ecuatoriales (Harrison, D. M. 2014).

Las exposiciones virales y otras infecciones pueden predisponer a un huésped a un ataque autoinmune por lo que se ha implicado una asociación con el virus de Epstein-Barr latente (VEB); se ha encontrado la activación del VEB latente en algunas lesiones activas de EM. Otros estudios han encontrado elevados anticuerpos contra otros microorganismos, como virus sarampión, virus de herpes humano tipo 6 (HHV-6), *Chlamydia pneumoniae* y

*Mycoplasma pneumoniae* (Martinez-Altarriba, M. C., et al. 2015; Flores, L., et al. 2015; Howard, J., Trevick, S., & Younger, D. S. 2016). Recientemente se están estudiando otros factores no tan documentados, como la ingesta de sodio, el índice de masa corporal elevado en la adolescencia, la leptina; hormona producida por el tejido adiposo, vitamina A y el alcohol, o relacionados con la teoría de la higiene, defectos en el contacto con helmintos o con *Helicobacter pylori*, todo puede estar ligado al desarrollo de la desmielinización en la EM, pero aún se desconoce cuál es su función en este proceso (Castillo-Álvarez, F., & Marzo-Sola, M. E. 2017; Margarit, B. P., et al. 2019)

### **2.3 Fisiopatología**

La fisiopatología de la enfermedad está desarrollada dentro del SNC, donde la interacción de diferentes factores genéticos de susceptibilidad, como el gen HLA-DRB1\*1501, y diversos factores ambientales provocan una activación anormal del sistema inmune, promoviendo la neurodegeneración, en forma de lesiones focales con desmielinización primaria y cicatrización astrocítica, producto de un proceso inflamatorio crónico que resulta en la liberación de antígenos y moléculas pro-inflamatorias que aumentan y perpetúan la respuesta inmune dentro del SNC (Lassmann, H. 2018).

Las lesiones tempranas de la EM están asociadas a la activación de microglía e infiltración del tejido por macrófagos, produciendo que la barrera hematoencefálica se rompa en los sitios inflamatorios pero conservando la pared del vaso (Figura 2). El sistema inmunitario humoral también puede desempeñar un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad, como lo demuestra la presencia de células B (células T helper tipo 1 (Th1), células T17, CD8 + T y macrófagos) en los sitios activos (Correale, J., et al. 2016).

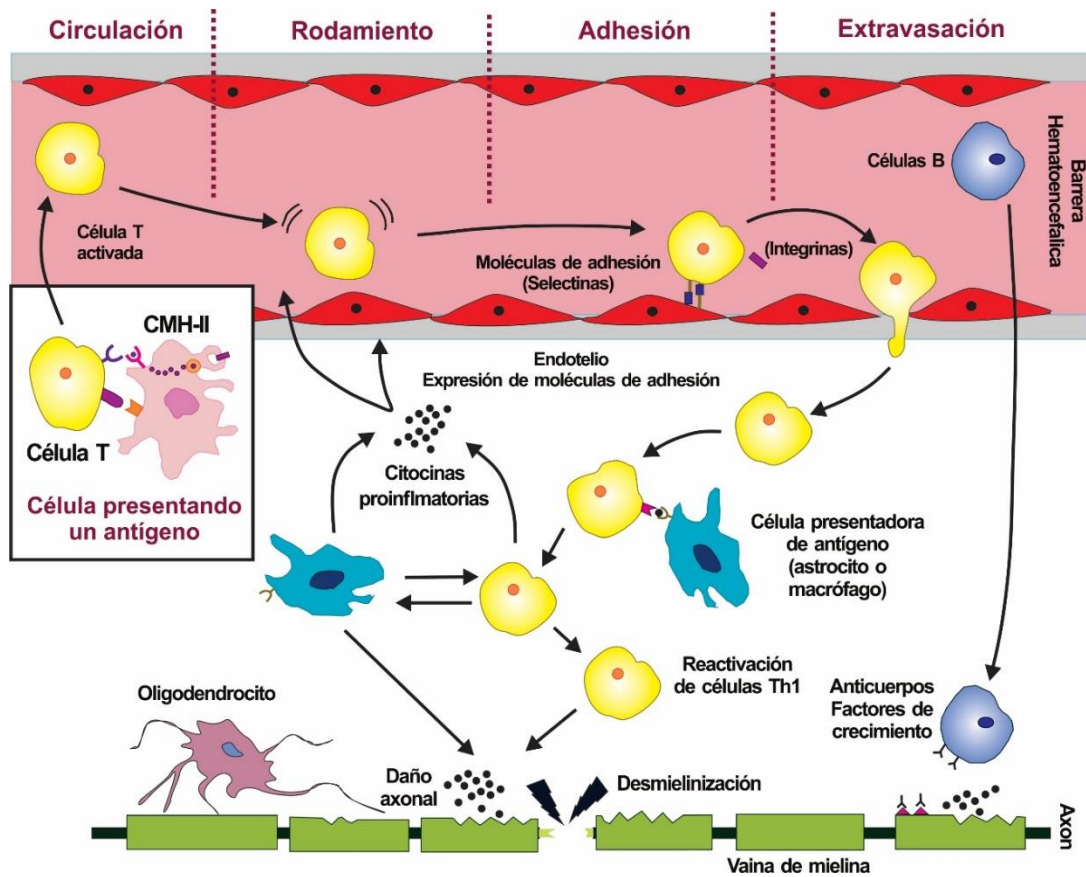
El desarrollo de la EM implica un ataque inmunitario contra los antígenos del SNC mediados por células T reactivas a la mielina, ya que al ser destruida libera diversas proteínas como la PBM, el proteolípido de la mielina (PLP), glicoproteína oligodendrocítica de la mielina o glicoproteína asociada a la mielina (MOG), las cuales son reconocidas por el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH II) que activa el complejo receptor de células T, en un individuo genéticamente susceptible, esta pérdida de autotolerancia puede ser provocada por un antígeno ambiental, presumiblemente un agente infeccioso como un virus (Garg, N., & Smith, T. W. 2015; Margarit, B. P., et al. 2019).

La presencia de células T autoreactivas dentro del SNC es regulada por la expresión de integrinas y por enzimas llamadas metaloproteasas; las cuales realizarán la proteólisis de los componentes de la mielina, pero una vez activados en la periferia migran a través de la barrera hematoencefálica (BHE), este proceso de transmigración implica la interacción entre la integrina VLA-4 (Antígeno de activación muy tardío 4) presente en las células T y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) expresada en el endotelio capilar; este proceso se ve facilitado por la expresión y la regulación positiva de varias moléculas de adhesión, quimiocinas y metaloproteinasas de matriz (MMP) (Figura 2) (Dendrou, C. A., et al. 2015; Dargahi, N., et al. 2017)

Después de ingresar al SNC las células T pueden generar 2 tipos de respuestas: TH1 y TH2, las primeras producen citocinas proinflamatorias como IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , los cuales son la clave en la mediación de la inflamación en la EM, y en conjunto con las células CD4 + T-helper-17 (TH17) que secreta IL-1, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-24, IL-26 y bajos niveles de IL-9 and IFN- $\gamma$ , su expansión es mediada por IL-23, IL-6 e inhibida por IL-27 y activan las células presentadoras de antígenos (CPA), por otra parte las células TH2, producen citocinas antiinflamatorias como la IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-25, y regula así la inmunidad humoral (Quintana, F.J, Pérez-Sánchez, S., & Farez, M. F. 2014; Faissner, S., et al. 2019).

La liberación de citocinas proinflamatorias activa los macrófagos, dando inicio a las lesiones, donde se fagocita la mielina, se promueve la desmielinización activa por secreción de citocinas, radicales libres de oxígeno y enzimas proteolíticas. La desmielinización es el signo más temprano observado en las neuronas afectadas, así como la gliosis, causada por la proliferación de astrocitos cuando hay una evolución de lesión (Lassmann, H. 2018; Dobson, R., & Giovannoni, G. 2019).

Los mecanismos exactos de la desmielinización y la lesión axonal aún no se entienden completamente, pero es probable que incluyan ambos, lesión directa a mielina, como a oligodendrocitos y axones por linfocitos T CD4 + y CD8 +, microglia activada (macrófagos), anticuerpos y complemento, así como los efectos indirectos de las citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , y óxido nítrico (Garg, N., & Smith, T. W. 2015).



## Figura 2. Modelo de la patogénesis en la esclerosis múltiple

En la periferia, las células T se activan mediante péptidos expresados por las células presentando un antígeno. Las células activadas experimentan una serie de cambios que se traducen en la expresión de moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas que favorecen su adhesión a la lámina basal de los capilares cerebrales y su paso a través de la barrera hematoencefálica. La extravasación de las células T al parénquima cerebral es seguida por una reactivación por astrocitos y células de la glía que ahora presentan antígenos al SNC. Esta segunda reactivación desencadena una nueva cascada de procesos inflamatorios con excreción de numerosas citocinas, quimiocinas que al difundir al capilar actúan manteniendo el proceso y dañando la mielina, los oligodendrocitos y las neuronas. (Tomada de <https://www.iqb.es/neurologia/atlas/em/em04.htm>, modificada para esta tesis)

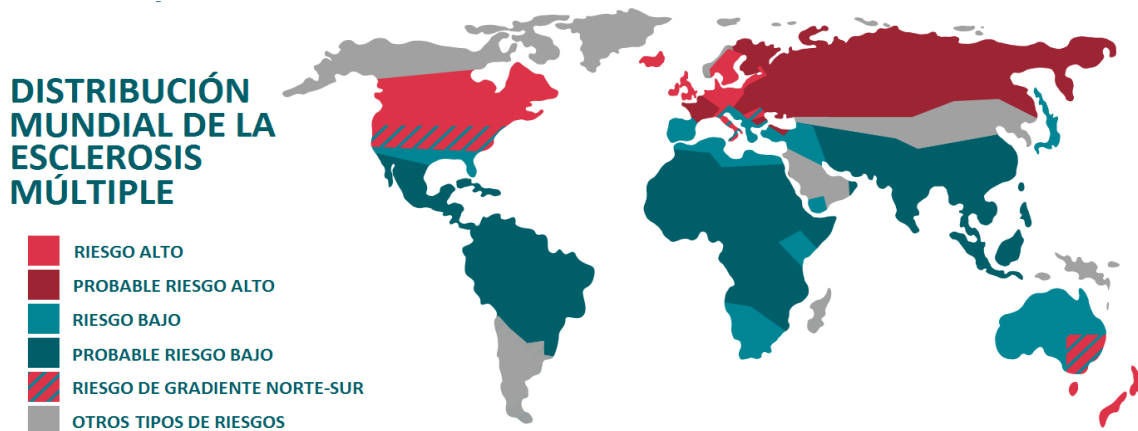
## 2.4 Epidemiología de la EM

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que más de 2.5 millones de personas en todo el mundo sufren de EM, pero con el actual aumento de población mundial, se estima que alcanzará los 8.5 mil millones para 2030, se espera que aumente la incidencia y la aparición de EM en adultos jóvenes, pero puede afectar a individuos más jóvenes y mayores (Katsara, M, Apostolopoulos, V. 2018).

Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en adultos jóvenes entre los 20 y 50 años, con una proporción de 2-3 mujeres por cada hombre. En Estados Unidos, actualmente la EM afecta a 350.000 habitantes. América del Norte y Europa tienen la prevalencia más alta, con 140-108 por cada 100,000 habitantes, respectivamente, y los países de Asia y África tienen la prevalencia más baja de 2.2 y 2.1 respectivamente, aunque existe una variación regional sustancial en diferentes partes de Asia, de 0.77 por cada 100,000 en Hong Kong; 85.80 por cada 100,000 en Irán. El sur de Australia y Nueva Zelanda continúan teniendo las tasas de prevalencia más altas. En América Central y el Caribe la prevalencia de EM es "baja" o "muy baja", de 1.0 a 7.5 casos por cada 100,000 habitantes (Figura 3) (Gracia, F., et al. 2017; Alroughani, R., & Yamout, B. 2018; Oh, J., Vidal-Jordana, A., & Montalban, X. 2018).

En México, la incidencia de la enfermedad no ha sido completamente determinada, sin embargo, la prevalencia ha cambiado: en los años 70's se determinaron menos de 2 casos por 100.000 habitantes y actualmente se establece en un rango entre 13-15/100.000 habitantes, lo que sitúa a México como un país de baja prevalencia (Guadarrama-Ortiz et al, 2014) En México, según las publicaciones de series hospitalarias y poblacionales, se indica un incremento en la prevalencia de la esclerosis múltiple: en el norte de México se habla de que hay 13 casos por cada 100 000 habitantes (Bermúdez-Morales, V., Hernández-Girón, C., Flores, J., et al. 2016; Bertado-Cortés, B., et al. 2016).

La prevalencia de la EM ha aumentado de manera constante y dramática durante el siglo pasado, y esto puede estar relacionado con las condiciones ambientales cambiantes, y este cambio es más evidente en las mujeres, lo que indica que las mujeres son más receptivas a los cambios ambientales (Ransohoff, R. M., Hafler, D. A., & Lucchinetti, C. F. 2015, Dobson, R., & Giovannoni, G. 2019).



**Figura 3. Prevalencia de la EM por país**

Imagen obtenida de: <https://multiplesclerosis.net/what-is-ms/statistics>

## 2.5 Diagnóstico, evaluación y clasificación clínica

El diagnóstico de la EM es un poco complicado, por lo que se basa primero en la clínica, donde las manifestaciones clínicas típicas se relacionan con la localización del foco de desmielinización que incluyen trastornos sensitivos-motores en uno o más miembros (Harrison, D. M. 2014), y se basa en la presencia de dos criterios clínicos; uno de diseminación espacial (DIS), donde se puede observar presencia de síntomas y signos que indiquen la existencia de dos lesiones independientes en el SNC, y uno de dispersión temporal (DIT) donde se pueden observar dos o más episodios de disfunción neurológica, estos criterios también son conocidos como criterios de MacDonald (Dobson, R., & Giovannoni, G. 2019).

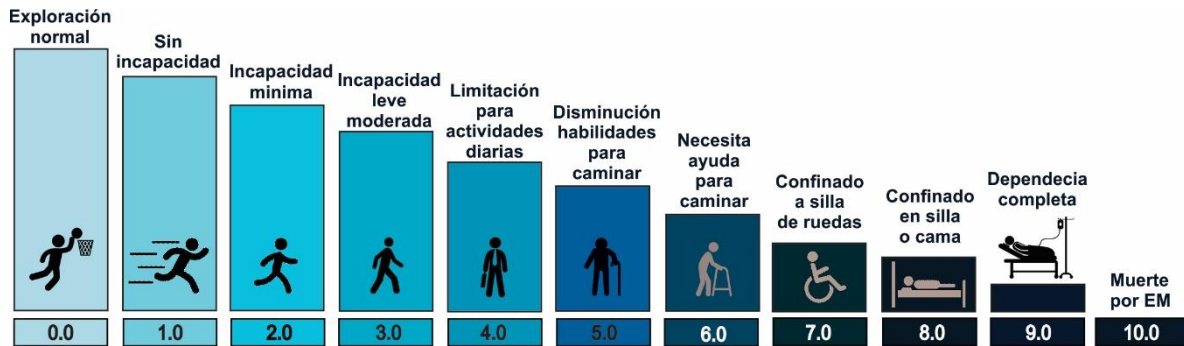
Los criterios clínicos, junto con la imagen de resonancia magnética (IRM); método que se utiliza para localizar las lesiones desmielinizantes, el examen del líquido cefalorraquídeo (LCR); donde se analizan inmunoglobulinas (Ig), en las cuales los pacientes pueden mostrar un aumento, consecuente del aumento en células monocíticas, específicamente de IgG; también es típico en estos pacientes la presencia de bandas aisladas, conocidas como bandas oligoclonales (BO), que son producidas por uno o más clones de células plasmáticas, y los potenciales evocados; método que analiza la distancia de los impulsos nerviosos y proporcionan información sobre el buen funcionamiento de las vías sensoriales (visual, auditiva y somato sensitiva) y motoras, son utilizados para realizar un

buen diagnóstico de la enfermedad (Jarmi, V., et al. 2015; Moreno Moya, L & Herrero González, J.F. 2016; Howard, J., Trevick, S., & Younger, D. S. 2016, ).

Durante el progreso de la enfermedad los pacientes presentan discapacidad física cada vez más severa, impidiendo la función motora normal, por lo que para evaluar esta discapacidad se utiliza la escala ampliada del estado de discapacidad de Kurtzke, o EDSS (siglas en inglés Expanded Disability Status Scale), en el cual los valores van desde 0.0 en pacientes neurológicamente sanos, hasta 10.0 que es la muerte por EM, pero los pacientes que presentan puntuaciones mayores a 5.0 tienen gran discapacidad que limita hacer su vida normal (Figura 4) (Fernández, O., Fernández, V. E., & Guerrero, M. 2015; Huamaní, C., Rojas, McCarthy, C., & Thorpe, J. 2016; Fernández, O., et al. 2016; Huamaní, C., Rojas, E., & Inca, J. 2017).

La evolución de la EM es variada por lo que se describen cuatro formas de evolución de la EM (Martinez-Altarriba, M.C., et al. 2015, Sand, I. K. 2015).

- Remitente recurrente (RR): Es la forma más común y se trata de episodios o brotes de disfunción neurológica más o menos estables y reversibles que se repiten a lo largo del tiempo y van dejando secuelas que pueden ser reversibles, con períodos de relativa estabilidad clínica en el medio.
- Secundaria progresiva (SP): Es la evolución de los pacientes con forma RR tras un periodo de 10 años, empiezan a tener mayor número de brotes y secuelas y se va instaurando afectación mielínica permanente y deterioro continuo.
- Primaria progresiva (PP): La evolución se produce de forma progresiva y constante, sin crisis de empeoramiento. La incapacidad acontece de forma más temprana. Es frecuente en hombres y suele iniciarse alrededor de los 40 años.
- Progresiva recurrente (PR): Es la evolución de la forma PP y tiene exacerbaciones o agravamientos ocasionales tras un curso progresivo, y los pacientes pueden o no experimentar recuperación después de episodios o brotes, suele tener escasas de alteraciones dentro del SNC.



**Figura 4. Escala de discapacidad de la EM**

La evolución de la actividad de la enfermedad varía según la edad y el estado de salud de los pacientes, cada tipo de EM corresponde al resultado de la valoración del EDSS, en todas las fases de la EM el EDSS avanza progresivamente. (Imagen realizada para esta tesis)

## 2.6 Tratamientos terapéuticos actuales para EM

Existen diversas terapias para tratar la EM, a través de mecanismos variados como: la modulación inmune, la mejora de la mielinización, la conducción a través de vías desmielinizadas y la sintomatología sin afectar directamente la enfermedad subyacente. La terapia inmunomoduladora disminuye la activación y proliferación de las células inmunes y su migración hacia el SNC al mejorar la actividad supresora intrínseca o limitar la destrucción causada por los procesos inflamatorios. Estos medicamentos modificadores de la enfermedad incluyen inyectables como interferón beta (IFN- $\beta$ ) y acetato de glatirámico (AG), orales como fingolimod, teriflunomida y dimetilfumarato, anticuerpos monoclonales como natalizumab, y un agente quimioterapéutico como mitoxantrona (Howard, J., Trevick, S., & Younger, D. S. 2016).

### 2.6.1 Interferón beta (IFN- $\beta$ )

El interferón beta (IFN- $\beta$ ) es considerado tratamiento de primera línea, ya que ha demostrado una eficacia en disminuir la tasa de recaída, la duración y la gravedad, en pacientes con EMRR (Ransohoff, R. M., Hafler, D. A., & Lucchinetti, C. F. 2015). El IFN- $\beta$  es producido por numerosas células del organismo tras infecciones víricas o tras la interacción con superantígenos, capaces de interferir con el proceso infeccioso (Toro, J., Reyes, S. & Zamora, A. 2014)

El mecanismo de acción en la EM es disminuir la inflamación y lo realiza; reduciendo a nivel de la sangre periférica la adhesión al endotelio y la migración de los linfocitos T

activados a través de la BHE, evitando su penetración en el SNC, (Garg, N., & Smith, T. W. 2015), disminuyendo la liberación de citocinas proinflamatorias por los linfocitos Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2), aumentando la producción de citocinas antiinflamatorias por los linfocitos Th2 (IL-10) y regulando la presentación antigénica mediante una regulación a la baja de la expresión de moléculas HLA de clase II (Sánchez, M.D., & Hernández, M.J. 2016).

El IFN- $\beta$  se puede clasificar en dos grupos: IFN- $\beta$  1B, que es una proteína recombinante obtenida en *E. Coli.*, la cual actúa reproduciendo la secuencia del IFN- $\beta$  natural salvo por la sustitución en un aminoácido, así mismo, es eficaz en la disminución del número de brotes, y la progresión de la enfermedad, y el IFN- $\beta$  1A, también es una proteína recombinante, obtenida de células del ovario de hámster chino y ayuda a disminuir la progresión, la tasa anual de brotes y el número y el volumen de las lesiones observadas por IRM (Moreno Moya, L & Herrero González, J.F. 2016).

### **2.6.2 Acetato de Glatirámero (AG)**

Conocido también como Copolimero I, está considerado dentro de los fármacos de primera línea, ya que reduce las tasas de recaída y las lesiones y es equivalente a las dosis altas de interferones en estudios comparativos, en pacientes con EMRR (Harrison, D. M. 2014). El AG es un complejo sintético de cuatro aminoácidos (ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina), que imita la proteína básica de mielina (PBM), uno de los autoantígenos dirigidos por las células T (Sánchez, M. D., & Hernández, M. J. 2016).

El mecanismo de acción en la EM del AG para disminuir la progresión de la enfermedad, se realiza mediante; el bloqueo de la formación de células T (Th17) reactivas a mielina al disminuir la expresión de citocinas IL-6 e IL-17, inhibiendo la generación de estas células (Meca-Lallana, J. E. 2017), también el AG induce la expresión de células T reguladoras Th2 reactivas de AG, donde la capacidad de las células Th2 reactivas al AG de migrar a través de la BHE daría lugar a un fenómeno conocido como “inhibición de proximidad” de la inflamación en el interior del SNC, es decir, las células Th2 reactivas al AG segregarían citocinas antiinflamatorias, y disminuirían la inflamación local in situ en la reestimulación con antígenos del SNC, también debido a su similitud estructural con PBM compite con esta para adherirse al CMH II (Hauser, S. L., Oksenberg, J. R., & Baranzini, S. E. 2015, Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J., & Weiner, H. L. 2018).

### **2.6.3 Otros tratamientos para EM**

#### **Fingolimod**

Es un modulador del receptor de esfingosina 1-fosfato (S1P), que inhibe la salida de linfocitos de los ganglios linfáticos, lo que resulta en una infiltración reducida de linfocitos potencialmente autoagresivos en el SNC (Harrison, D. M. 2014). Reduce las tasas de recaída y el riesgo de progresión de la discapacidad y la acumulación de nuevas lesiones en las imágenes por resonancia magnética (Alroughani, R., & Yamout, B. 2018).

#### **Teriflunomida**

La teriflunomida es un inhibidor reversible de la enzima mitocondrial dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), que media la síntesis de novo de las células inmunes de proliferación rápida de pirimidinas (Álvarez, A. G., et al. 2015). Su efecto antiinflamatorio en la EM está mediado por la reducción de la actividad de la proliferación de linfocitos T y B, por lo que reduce el riesgo de discapacidad y la acumulación de lesiones que se pueden observar por IRM (Garg, N., & Smith, T. W. 2015)

#### **Dimetilfumarato**

El Dimetilfumarato (DMF) es la última terapia oral aprobada para el tratamiento de la EM. Dentro de su mecanismo de acción reduce el estrés oxidativo relacionado con la muerte neuronal y el daño a la mielina, a través de la vía factor nuclear relacionado con eritroide 2 (Nrf-2), lo que hace que la DMF sea una opción terapéutica potencial para la esclerosis múltiple progresiva (Correale, J., et al. 2016).

#### **Natalizumab**

Natalizumab es un anticuerpo monoclonal (IgG4) que se une a la integrina  $\alpha 4\beta 1$  en los linfocitos bloqueando su interacción con VCAM-1 en las células endoteliales, evitando así la trans migración de linfocitos a través de la BHE (Garg, N., & Smith, T. W. 2015). Este fármaco frena la acumulación de discapacidad no relacionada con recaídas, en personas con EM secundaria progresiva (Huamaní, C., Rojas, E., & Inca, J. 2017), pero cabe destacar que se limita a su uso como agente de segunda línea debido al riesgo de leucoencefalopatía

multifocal progresiva (LMP), una infección cerebral oportunista grave potencialmente mortal (Correale, J., et al. 2016).

### **Mitoxantrona**

La mitoxantrona es un agente antineoplásico sintético, potente inmunosupresor, utilizado para tratar el cáncer; actúa intercalándose con el ácido desoxirribonucleico (ADN) e inhibiendo la actividad de la enzima topoisomerasa II por lo que interrumpe la síntesis de ADN y la reparación del ADN de las células cancerosas (Alroughani, R., & Yamout, B. 2018). Tiene efectos inmunomoduladores incluyen la supresión de linfocitos T y B y la proliferación de macrófagos, y reduce las citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ - e IL-2) (Dargahi, N., et al. 2017). La mitoxantrona está indicada para reducir la discapacidad y la frecuencia de recaída en pacientes con EM recurrente remitente (RR) y secundaria progresiva (SP) (Moreno-Moya, L & Herrero-González, J.F. 2016).

## 2.7 Vía de señalización JAK-STAT

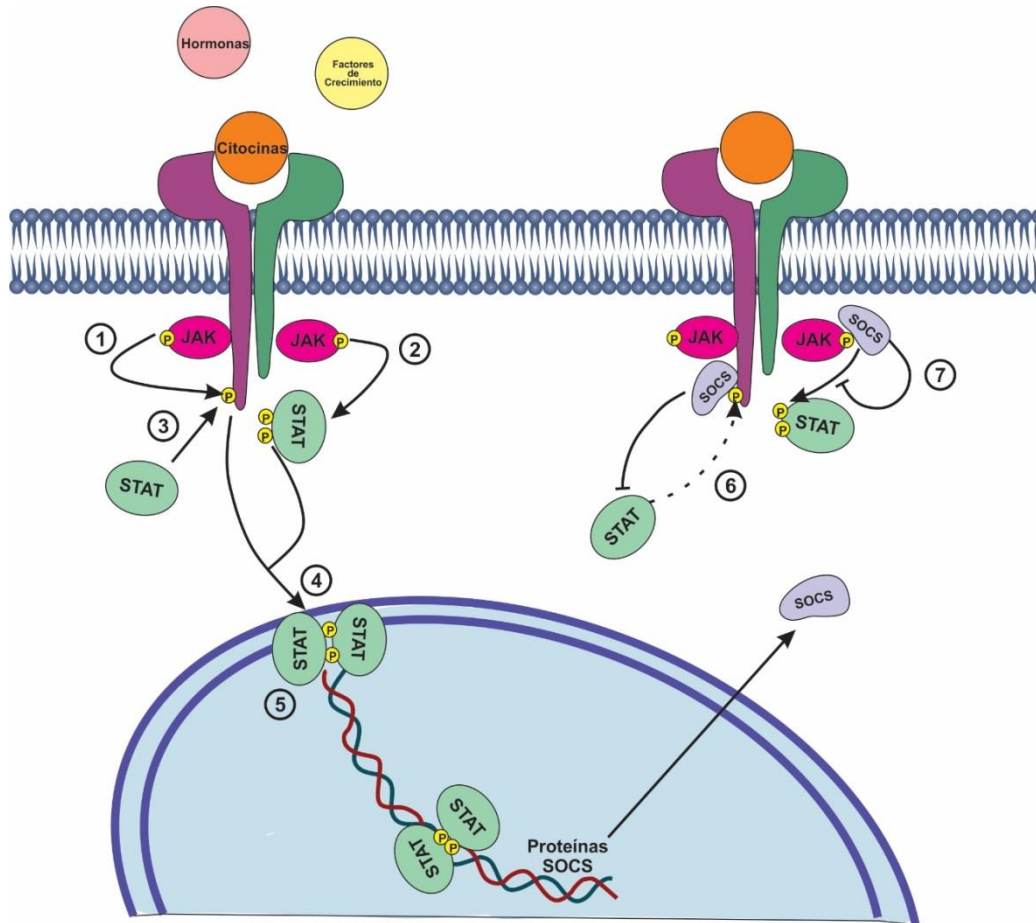
La vía de señalización JAK-STAT se utiliza ampliamente en la transducción de señales activada por numerosas citocinas e interferones. Se compone de dos elementos principales, las cinasas Janus (JAK) y las proteínas Transductoras y Activadoras de la Señalización de la Transcripción (STAT), dichos elementos juegan un papel crítico en el inicio y la regulación de las respuestas inmunes innatas y la inmunidad adaptativa (Yan, Z., Gibson, S. A., Buckley, et al. 2018). Una parte importante de este sistema es la presencia de múltiples mecanismos reguladores para limitar la señalización JAK-STAT, que pueden conducir a diversas patologías si no se controlan, por lo que estos reguladores negativos incluyen miembros específicos del dominio SH2 que contiene tirosina fosfatasa (SHP), proteínas inhibidoras de la STAT activadas (PIAS) y familia de lossupresores de señalización de citocinas (SOCS), siendo estas últimas las más importantes (Thomas, S.J., et al. 2015).

Existe una amplia variedad de ligandos para activar esta vía como; factores de crecimiento, hormonas, citocinas o interleucinas (O'Shea, J.J., et al. 2015), estas últimas relacionadas a la inmunopatología de la EM, ya que la vía JAK-STAT se activa de manera aberrante en la EM debido a la producción excesiva de citocinas, pérdida de expresión de reguladores negativos como los SOCS y al enriquecimiento significativo de genes que codifican componentes de la vía (Benveniste, E. N., et al. 2014)

La activación de la vía se origina tras el acoplamiento de la citocinas a su receptor específico en la membrana celular, lo que activa el sitio quinasa (JH1 realiza la fosforilación y JH2 regula la función JH1) de JAK (JAK2, JAK3 y TYK2), asociados al receptor (Seif, F., et al. 2017), estos JAK activados fosforilan un residuo de tirosina en el dominio citoplasmático del receptor de citocina para proporcionar un sitio de acoplamiento para STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6), después los STAT se unen al receptor de citocinas a través de sus dominios SH2 y son fosforilados en los residuos de tirosina por los JAK, lo que lleva a la formación de homo o heterodímeros a través de las interacciones SH2-fosfato, posteriormente, los STAT dimerizados se translocan desde el citoplasma al núcleo, donde modulan la expresión de genes sensibles a las citocinas mediante la unión a elementos de ADN específicos (Figura 5)(Villarino, A. V., et al. 2015).

La familia SOCS son inhibidores de la retroalimentación negativa de la cascada de señalización de la vía JAK-STAT, aunque hay excepciones, una regla general de la

señalización de citocinas es que cada citocina se une a un receptor específico, esto induce la activación de JAKs y STATs específicos y la señalización se regula por una proteína SOCS particular (Morris, R., Kershaw, N. J., & Babon, J. J. 2018)



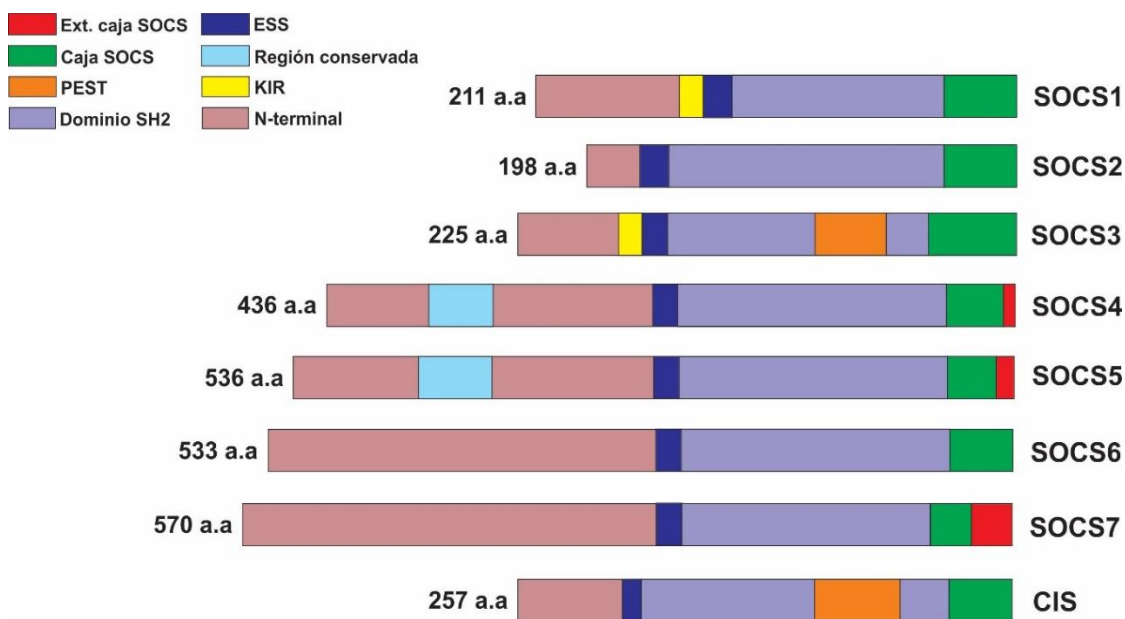
**Figura 5. Vía de señalización de JAK-STAT**

Algunas citocinas, factores de crecimiento y hormonas activan la señalización positiva. 1) Las proteínas JAK fosforilan las tirosinas cinasas del receptor, 2) después se autofosforilan y 3) reclutan a las proteínas STAT, 4) éstas también se autofosforilan y por consiguiente se da el proceso de translocación de las STAT al núcleo, 5) donde se unen a un promotor con la finalidad de expresar o regular genes, entre ellos se expresan genes de la familia SOCS. Las proteínas SOCS regulan negativamente la vía, 6) pueden inhibir el reclutamiento de STAT compitiendo con estas por la fosforilación del grupo fosfato y, 7) pueden inhibir la autofosforilación de JAK. (Imagen realizada para esta tesis).

## 2.8 Proteínas supresoras de la señalización de citocinas

La familia de proteínas SOCS se compone de 8 miembros: SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 y una proteína inducible por citocina SH2 (CIS). (Sasi, W., Sharma, A. K., & Mokbel, K. 2014). En un mecanismo de retroalimentación negativa, la expresión de proteínas SOCS es inducida por STAT activados, lo que resulta en la inhibición de la señalización JAK/STAT (Yan, Z., et al. 2018).

Las proteínas SOCS contienen un dominio SH2, que les permite acoplarse al receptor de citocinas e inhibir la actividad de la quinasa JAK al promover la degradación mediada por proteasomas de todo el complejo de señalización, también contienen una región inhibidora de quinasas (KIR) adicional, que inhibe la actividad catalítica de los JAK (SOCS1 y SOCS3) (Benveniste, E. N., et al. 2014), y un dominio denominado “caja SOCS”, que interactúa con los componentes de la maquinaria de ubiquitina ligasa y media la degradación proteosómica de las proteínas asociadas, más comúnmente JAKs (Figura 6) (Balza et al., 2017, Walid et al. 2014).



**Figura 6. Estructura por bloques de la familia de proteínas SOCS**

Abreviaturas. KIR: Región inhibidora quinasa, ESS: Dominio extendido SH2, PEST: Región rica en Prolina, Ácido Glútamico, Serina y Treonina. (Imagen realizada para esta tesis)

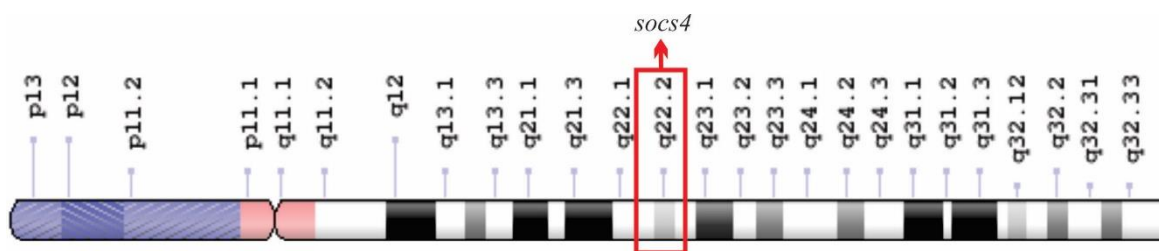
## 2.9 Características de *SOCS4* y *SOCS6*

### Supresoras de la señalización por citocinas 4 (*SOCS4*)

La proteína *SOCS4* se compone de un total de 440 aminoácidos, tiene una estructura similar a *SOCS7* ya que en el dominio N-terminal existe una región conservada, esta proteína se expresa en astrocitos, contiene un dominio SH2 y un dominio “caja *SOCS*” (Figura 6). El gen de *SOCS4* se encuentra presente en el brazo largo q22.3 del cromosoma 14 (Figura 7), del cual derivan dos variantes de ARN mensajero (ARNm).

La variante 1 (NM\_080867.3) está compuesta por 6774 pb, presenta 2 exones; el exón 1 con 236 pb y el exón 2 con 6538 pb, y la variante 2 (NM\_199421.2) está compuesta por 6903 pb, presenta 3 exones; el exón 1 con 236pb, similar al de la variante 1, el exón 2 con 120 pb y el exón 3 con 6538 pb (Figura 8)-

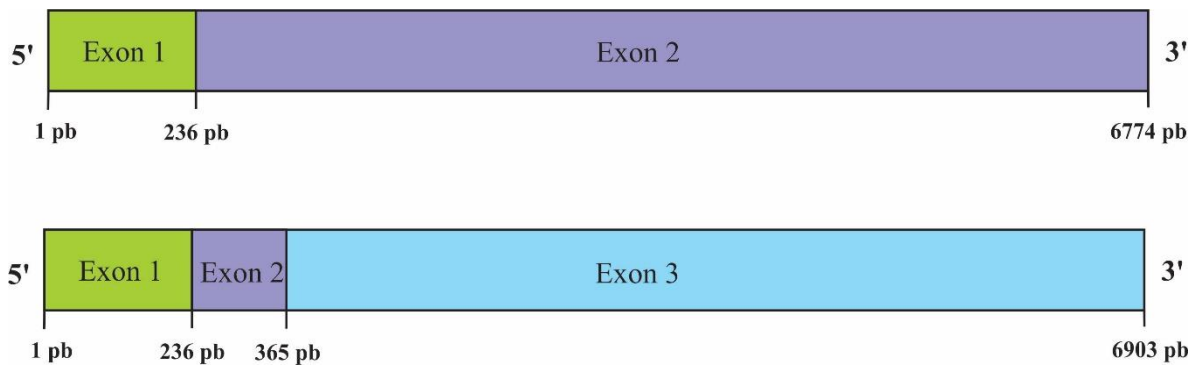
El papel que desempeña *SOCS4* aún no está del todo esclarecido, pero se ha demostrado que juega un papel regulador en la inflamación causada por la influenza y la infección parasitaria (Kedzierski, L., et al. 2015). También se ha demostrado que tiene más alta afinidad al mismo residuo de fosfotirosina EGFR que a STAT3; por lo tanto, también puede inhibir la activación de STAT3 directamente al bloquear la capacidad posterior de acoplarse a EGFR (Sasi, W., Sharma, A. K., & Mokbel, K. 2014). Un estudio demostró que *SOCS4* modula el receptor de señalización de las células T (TCR) y puede cumplir un papel importante para regular las moléculas de adhesión de la matriz celular, como las integrinas (Feng, Y., et al. 2017). Otro estudio sugiere que *SOCS4* puede inhibir la producción temprana de IL-1 $\beta$ , y de IL-6, ya que estas son sinérgicas (Ren, S., et al. 2019), pero aún no ha sido investigado el rol que pueda cumplir *SOCS4* en la EM.



Cromosoma 14

### Figura 7. Ubicación de *SOCS4* en el cromosoma

Ubicado en el brazo largo q22.3 del cromosoma 14 (Imagen realizada para esta tesis)

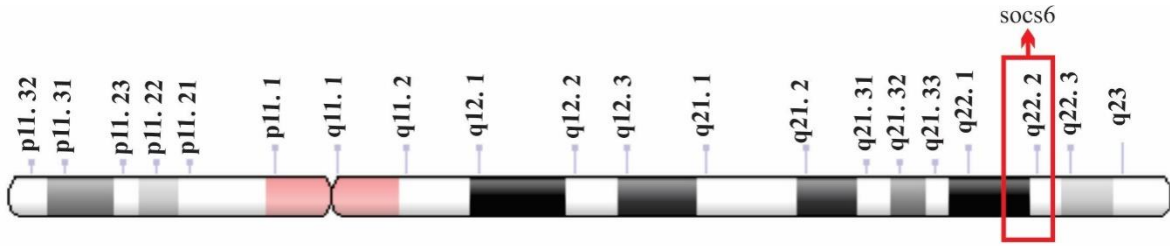


**Figura 8. Estructura de las dos variantes de mensajeros de *SOCS4***  
(Imagen realizada para esta tesis)

### Supresoras de la señalización por citocinas 6 (*SOCS6*)

La proteína *SOCS6* se compone de un total de 535 aminoácidos (Figura 6), se expresa principalmente en el citosol y se asocia con proteínas múltiples. Lo más relevante para la función *SOCS6* es su capacidad para asociarse con Elonginas B y Cullina 5 para ensamblar un complejo E3 ubiquitina ligasa funcional. El gen *SOCS6* se encuentra presente en el brazo largo q22.2 del cromosoma 18 (Figura 9), cuenta con un único ARNm compuesto de 5703 pb (NM\_004232.4), y contiene 2 exones; el exón 1 con 190 pb y el exón 2 con 5513 pb (Figura 10).

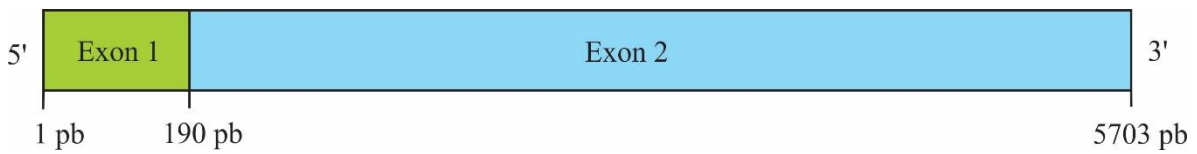
El papel que desempeña *SOCS6* es actuar como un regulador negativo de STAT3 (Sasi, W., Sharma, A. K., & Mokbel, K. 2014), regulando negativamente la vía JAK-STAT, reduciendo la cantidad de STAT3 fosforilada, inhibiendo su activación y disminuyendo los niveles de STAT3 al núcleo (Rontauoli, S., et al. 2017). También se ha demostrado que STAT5 es factor de transcripción para la expresión del gen *SOCS6*, y como STAT5 está relacionado con un rol importante dentro del SNC, este gen podría ser un objetivo terapéutico importante tanto para la reparación de lesiones neuronales como para el tratamiento de enfermedades neurológicas. (Gupta, S., et al. 2011). Este gen está ligado a la tumorigénesis y el desarrollo de tumores en diferentes tipos de cáncer (Sun, Z., et al. 2018), incluidos el cáncer gástrico, de próstata, carcinoma colorrectal y de pulmón de células no pequeñas (Kabir, N. N., et al. 2014), pero aún no ha sido investigado el rol que pueda cumplir *SOCS6* en la EM.



Cromosoma 18

**Figura 9. Ubicación de *SOCS6* en el cromosoma**

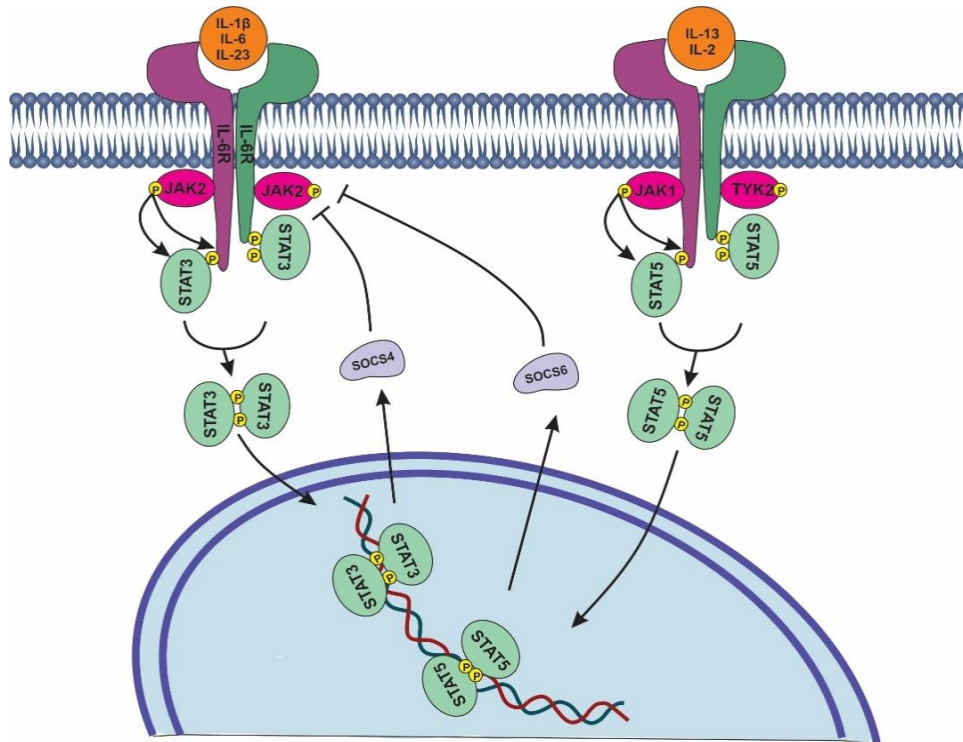
Ubicado en el brazo largo q22.2 del cromosoma 18 (Imagen realizada para esta tesis)



**Figura 10. Estructura del ARN mensajero de *SOCS6***

(Imagen realizada para esta tesis)

De acuerdo a la anterior información acerca de *SOCS4* y *SOCS6* se modificó la siguiente figura:



**Figura 11. Regulación de las interleucinas a través de *SOCS4* y *SOCS6***

Los IFNs activan la vía JAK-STAT, y los SOCS pueden regularla, *SOCS4* y *SOCS6* pueden regular la activación de IL2, IL-6, IL.13, IL-23 e IL-1 $\beta$  al inhibir a STAT3 (Imagen realizada para esta tesis)

## CAPITULO III

### III. METODOLOGIA

Se realizó un estudio descriptivo y transversal, se entregó una carta de consentimiento informado (anexo 6.1) a los pacientes con EM y al grupo control, de acuerdo al Comité de Bioética. Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de pacientes de ambos géneros diagnosticados con EM en fase RR del Servicio de Neurología, del Centro Médico Nacional Manuel Ávila Camacho del Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, México, a través del Neurólogo Raúl Arcega Revilla.

#### 3.1 Definición de la población

Se estableció como población de estudio a los pacientes diagnosticados con EM, bajo tratamiento con IFN- $\beta$  o AG, de acuerdo a los cuales fueron clasificados, además se recopilaron datos como edad, sexo, tiempo de diagnóstico y el valor de EDSS como medida de la actividad de la enfermedad.

#### 3.2 Criterios de selección de la muestra

**Criterios de inclusión:** Se incluyeron únicamente a pacientes con diagnóstico de EM, que se encontraban tomando IFN- $\beta$  o AG, que aceptaran participar de forma voluntaria en el estudio.

**Criterios de no inclusión:** Pacientes que no aceptaran participar en el estudio, que estuvieran tomando un tratamiento diferente a los descritos anteriormente o que decidieran no continuar con el estudio.

**Criterios de exclusión:** Se excluyen aquellos pacientes que cursaran con alguna otra alteración neurológica como: leucoencefalopatías, enfermedad vascular cerebral (EVC), mielínolisis central pontina (MCP), esclerosis lateral amiotrofia o Guillain-Barré.

**Grupo control:** Para este grupo se incluyeron a personas física y neurológicamente sanas, exploradas previamente por el neurólogo, además dichos participantes no deberían estar cursando con alguna enfermedad o estén bajo algún tratamiento clínico específico al momento de la toma de muestra.

### **3.3 Obtención de las muestras**

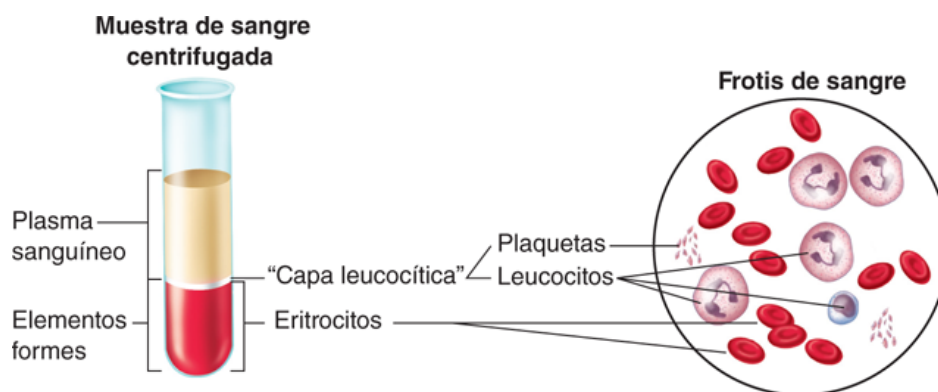
Los pacientes fueron seleccionados de acuerdo con los criterios ya descritos y se les invitó a participar en el estudio de forma voluntaria informándoles sobre el procedimiento. Los pacientes y grupo control que aceptaron fueron agrupados de la siguiente forma: grupo A) individuos neurológicamente sanos, grupo B) pacientes diagnosticados con EM tratados con IFN- $\beta$  (6, 8 o 12 millones), grupo C) pacientes con EM tratados con AG, los grupos B y C, fueron seleccionados mediante la consulta externa del servicio de Neurología.

Se extrajo sangre de la vena de cualquiera de los dos antebrazos de los participantes con previa asepsia en la región (de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 003-SSA2-1993,4.6), la sangre fue recolectada en tubos vacutainer con EDTA, el procedimiento se realizó en el consultorio del Servicio de Neurología y a cargo del médico Residente de Medicina Interna: Francisco Barrientos.

El material fue desechado en contenedor punzocortantes (color rojo, de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, residuos peligrosos biológicos-infecciosos 6.2.1). Los datos fueron almacenados bajo un número de folio, con la finalidad de mantener la confidencialidad de estos. Las cédulas de identificación que contienen datos personales fueron destruidas.

### **3.4 Extracción de células mononucleares de sangre periférica**

**Fundamento:** Se puede observar en los tubos EDTA dos fases perfectamente definidas de la sangre, la primera de ellas representa el plasma sanguíneo, la segunda fase comprende a los glóbulos rojos; entre estas dos fases podemos observar una tercera que corresponde a células mononucleares (leucocitos totales) (Figura 12). Seleccionamos esta última fase y para separarla del resto de la sangre se usó una solución de lisis de eritrocitos, (ver anexo 6.3); esta solución nos permitió obtener leucocitos totales libres de eritrocitos y de otras células que no formen parte de este grupo; el uso de esta solución en frío favorece la lisis de eritrocitos.



Fuente: Stuart Ira Fox: *Fisiología humana*, 14e: [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com)  
 Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

### Figura 12. Composición de la sangre periférica en los tubos de EDTA

Entre el plasma y el resto de la sangre se forma de color blanco un anillo en el cual se puede observar el paquete de leucocitos después de centrifugar.

#### Procedimiento:

Inicialmente las muestras de sangre se centrifugaron por 20 min a 3000 rpm a 4 °C, con la finalidad de obtener las tres fases ya descritas, posteriormente usando una pipeta Pasteur estéril, se extrajo cuidadosamente el anillo blanco de leucocitos y se transfirió a un tubo estéril, al cual se le agregaron 11ml de solución de lisis de eritrocitos a 4 °C, se agitó vigorosamente por 30 segundos, y se incubó por 12 min a 4 °C; una vez terminado este paso, se centrifugó a 4 °C durante 5 min a 1700 rpm, y se desechó el sobrenadante, con la finalidad de obtener los leucocitos totales. Del mismo modo se realizaron 3 lavados con las mismas condiciones hasta obtener un pellet blanco sin eritrocitos. Al final se agregó un lavado con 6 ml de NaCl al 0.9% (solución fisiológica) (ver anexo 6.4), se desechó el sobrenadante nuevamente y de esta forma se obtuvieron los leucocitos totales para la extracción de ARN, algunos fueron almacenados a -20 °C para su posterior uso.

### 3.5 Extracción de ARN total de leucocitos método TRIZOL

**Fundamento:** El método Trizol (guanidin tiocianato-fenol-cloroformó) fue desarrollado por Chomczynski y Sacchi en 1987; el cual se basa en el uso de una solución monofásica de isotiocianato de guanidina y fenol; esta técnica se usó para la lisis de leucocitos. El reactivo mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares; la adición de cloroformo a 15 °C-30 °C permite la disociación completa de complejos nucleoproteicos al modificar la

constante dieléctrica del medio, seguido por centrifugación, separa la solución en una fase acuosa (transparente) que corresponde al ARN el cual permanece soluble, y una fase orgánica (rosa) que corresponde a la fase fenol-cloroformo que contiene productos solubles, ADN y restos celulares. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, la cual después de transferirla se recupera mediante precipitación con alcohol isopropílico. Una vez precipitado el ARN se lava con etanol para evaporar solamente el sobrenadante, ya que es volátil a temperatura ambiente. Finalmente, el ARN se puede hidratar con agua estéril o puede ser tratado con DEPC (dietilpirocarbono), la cual está libre de ARNasa. La simplicidad del método permite el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras, el procedimiento se puede completar en una hora aproximadamente.

### **Procedimiento:**

**Preparación inicial:** Una vez obtenidos los leucocitos totales, se añadió 1 ml de Trizol (Invitrogen); a través de la homogenización mediante el pipeteo se disolvieron por completo los agregados celulares visibles, hasta que se observó ligera viscosidad de la suspensión, posteriormente se transfirió todo el volumen a un tubo eppendorf de 1.5 ml (estéril).

**Separación en dos fases:** Se dejó reposar por 1 min y posteriormente se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de Trizol, y se incubó el tubo durante 5 min a temperatura ambiente. Después de esto el tubo se agita vigorosamente por 30 seg; y se centrifuga a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. Después de centrifugar la muestra se observaron las dos fases, de la cual la fase transparente (incolora) se transfirió a un nuevo tubo eppendorf (estéril) para seguir con el paso siguiente.

**Precipitación del ARN:** A la fase acuosa se le agregaron 0.5 ml alcohol isopropílico o isopropanol; por cada 1 ml de Trizol usados anteriormente. Se mezcló por inversión suavemente por 30 seg y se incubó a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4 °C, una vez terminado se obtuvo un pellet (pastilla blanca).

**Lavado del ARN:** Se desechó el sobrenadante y posteriormente se realizó un solo lavado con etanol al 75% en cada una de las muestras; se usó 1 ml de etanol por cada 1 ml de Trizol, y finalmente se centrifugó a 7500 rpm por 10 min a 4 °C.

**Hidratación del ARN:** Una vez centrifugado se dejó secar por aproximadamente 5 min a temperatura ambiente; y se hidrató con 10  $\mu$ l a 45  $\mu$ l de agua estéril y se almacenó finalmente a -70 °C, para su posterior uso.

Nota: Se tomó la precaución de no secar demasiado el pellet, debido a que puede degradarse o puede impedir la solubilidad de la pastilla.

### **3.6 Tratamiento con ADNasa**

**Fundamento:** Es un método para purificar el ARN extraído; la ADNasa I es una endonucleasa que se dirige a cadenas de ADN, hidroliza los enlaces fosfodiéster generando así mono- y oligodesoxirribonucleótidos con grupos 5'-fosfato y 3'-OH. La actividad enzimática es estrictamente dependiente de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y es activada por iones  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ ; en presencia de iones  $\text{Mg}^{2+}$ . La ADNasa I separa cada cadena de ADN en diferentes sitios de forma aleatoria. En presencia de iones  $\text{Mn}^{2+}$ , la enzima separa ambas cadenas de ADN aproximadamente en el mismo sitio, formando así un fragmento de ADN.

#### **Procedimiento:**

Se usó ADNasa I libre de ARNasa (marca Thermo Fisher Scientific), se agregó por cada 10  $\mu$ l de ARN 1  $\mu$ l de buffer 10x con  $\text{MgCl}_2$ , más 1  $\mu$ l de ADNasa I, y se incubó a 37 °C durante 30 min. Al finalizar la reacción se agregó 1  $\mu$ l de EDTA a 50mM, y se incubó a 65 °C por 10 min, posteriormente se visualizó la integridad de ARN en el gel de electroforesis.

### **3.7 Verificación de la integridad y cuantificación de ARN total**

#### **Electroforesis en gel de agarosa**

**Fundamento:** Esta técnica consiste en la separación de moléculas de ácidos nucleicos (o proteínas) a través de una matriz de agarosa (acrilamida o almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico (de 100 volts) con ayuda de TAE 1x (anexo 12.6), el cual es un tampón o buffer. En los ácidos nucleicos, el ácido fosfato es un elemento importante debido a la fuerte carga negativa que posee en condiciones de pH neutro; de tal manera esto nos permite que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante el proceso. En esta técnica el ARN se muestra con dos bandas, que corresponden a las subunidades ribosomales 18S y 28S; mientras el ADN normalmente se observa como una banda muy intensa, por arriba de las dos bandas de ARN, debido a que es muy pesado para migrar hacia el polo positivo.

#### **Procedimiento:**

Se preparó la bandeja del gel de la cámara de electroforesis, sellando los bordes por presión o usando topes (o con cinta adhesiva), se colocó el peine que tiene el tamaño de pozos que se va a usar (1.5mm). Posteriormente se pesó 0.3 g de agarosa (1%): y se disolvió en 35 ml de buffer TAE 1x, se calentó hasta disolverse. Después se dejó enfriar hasta que alcanzo una temperatura soportable al tacto; y se agregaron 3  $\mu$ l de bromuro de etidio. Posteriormente se vertió en la bandeja y se dejó gelificar por 10 min. Una vez terminado este proceso se llenó el tanque de la cámara de electroforesis con buffer TAE 1x hasta cubrir por completo el gel. Se mezclaron 2  $\mu$ l de muestra con 1  $\mu$ l de buffer de carga y 3  $\mu$ l de agua estéril y se colocó en su respectivo pozo, del mismo modo se realizaron las demás muestras. Se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder, y se aseguró un voltaje de 100 volts, durante 30 min. Después de finalizar el tiempo de corrida, se visualizó el gel con un transiluminador.

#### **Cuantificación de ARN total**

**Fundamento:** En función de la longitud de onda 260nm/280nm podemos obtener un cociente para expresar la pureza del ADN o ARN; la longitud de 260nm detecta los ácidos nucleicos y se señala con un valor de 1.65 a 1.9 aproximadamente, por lo que un valor menor a estos indicará contaminación con proteínas. Las muestras de ARN puras se miden a una

longitud de onda 280nm en donde se debe de obtener un valor entre 1.8 a 2.0 que nos indica que es una muestra pura; otra relación de pureza es medir la longitud de onda 230nm/260nm de la cual se obtiene un cociente entre 0.3 y 0.6 que nos indica que una muestra está libre de sales, hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias.

**Procedimiento:**

Una vez obtenidas las muestras de ARN se tomó una alícuota de la cual se usó 1 µl para la lectura en el nanofotómetro (P-360 marca IMPLEN), primero se coloca un blanco con agua estéril, posteriormente se colocan las muestras de ARN y se tomaron los datos de la concentración.

### **3.8 Diseño de oligonucleótidos**

**Fundamento:**

Uno de los elementos indispensables para la optimización y elaboración del PCR, es diseñar pequeñas secuencias de ácidos nucleicos cortos que nos permiten identificar un gen o sus variantes, estas se denominan como oligonucleótidos, primers o iniciadores, y son específicos para el análisis ya que nos permiten seleccionar una región específica de nuestro gen de interés; su elaboración normalmente es *In silico* con ayuda de diferentes herramientas bioinformáticas, las cuales nos permiten establecer diferentes condiciones o criterios para su respectivo uso en el laboratorio; estos criterios dependen de los ajustes que el operador decida, por lo que, existen infinidad de oligos de un solo gen, los criterios que normalmente se emplean van desde el tamaño del amplicon, Tm, porcentaje de GC%, tamaño de oligos, bucles, dímeros que pueden formar, entre otros.

**Procedimiento:**

Inicialmente se realizó el análisis *In silico* de los oligos para valorar su uso, el primero en analizar fue *SOCS4*, del cual solo se han reportado dos variantes; la variante 1 (NM\_199421.2) que contiene 6903 pb, y para la variante 2 (NM\_080867.3) con 6774 pb. Para el ARNm de *SOCS6* (NM\_004232.4), de igual manera, solo se ha reportado una sola variante, que contiene 5703 pb, por lo que en esta secuencia se llevó a cabo el diseño; se usó

como gen de referencia a la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (*hprt*), del cual ya se tenía elaborado el diseño por trabajos previos (Sedeño Monge, et al. 2014).

Nos apoyamos en bases de datos como NCBI. Además de otros softwares para la construcción de oligos, el primero fue PrimerQuest Tool, es un software de acceso gratuito, de la empresa Integrated DNA Technologies, Inc., en el cual se analizan las diferentes opciones de oligos, las características que tiene este software nos permitieron evaluar y determinar la mejor opción.

Posteriormente se usó Oligo Explorer 1.2 de la empresa Gene Link, el cual puede evaluar de forma más precisa los criterios de diseño, este software nos permitió trabajar a lo largo de la secuencia de interés, y nos brindó información como: Tm, porcentaje de GC%, bucles y dímeros del par elegido, además de ello obtuvimos datos sobre el comportamiento de los oligos al momento de la reacción de PCR obteniendo así las condiciones de la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Secuencias de *SOCS4*, *SOCS6* y *HPRT*

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i> (5'→3')	<i>Longitud</i>	<i>Producto</i> ( <i>pb</i> )	<i>Tm</i> (°C)	<i>Referencia</i>
<i>S-SOCS4</i>	ATCGATGCCCTTCCAATCC	20	128	60	Rojas- Morales, E.
<i>AS-SOCS4</i>	CCCATGTTCCCATCCTGTTAC	21			
<i>S-SOCS6</i>	TTGATCCGAACTCTGCTCCT	20	123	60	Rojas- Morales, E.
<i>AS-SOCS6</i>	CCCAGTACCATCCTTGCTTTG	21			
<i>S-HPRT</i>	CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGATG	25	137	60	Lara- Sampablo A, 2012
<i>AS-HPRT</i>	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTC	23			

**Nota:** El Tm mostrado en la tabla es la que se obtuvo después de hacer el RT-PCR de punto final para estandarizar los oligos, que a su vez se usó para el tiempo real.

### 3.9 RT-PCR de punto final para la amplificación de *SOCS4* y *SOCS6*

**Fundamento:** Es una técnica comúnmente usada para amplificar fragmentos de ARNm, considerando que esta molécula es muy sensible al calor, es necesario sintetizarla en ADN complementario (ADNc) el cual es mucho más estable; este tipo de molécula tiene la función de conservar la secuencia de ARNm, por lo que a esta conversión se le denomina transcripción reversa (RT) y la lleva a cabo la enzima “retrotranscriptasa o transcriptasa reversa (Reverse Transcriptase)”. El mecanismo de RT consiste en los siguientes pasos: 1) la unión de los oligos a la secuencia de ARNm. 2) la enzima inicia la extensión de la secuencia mediante la incorporación de nucleótidos complementarios, basta con una molécula de ARNm que este intacta entre los dos sitios de unión de los oligos para conseguir la amplificación, 3) finalmente se obtiene la hebra de ADNc complementario al ARNm (ARN-ADNc).

Posteriormente comienza la amplificación en sucesivo de ciclos según el mecanismo de PCR: 1) desnaturalización, la hebra de ADNc liberada actúa como molde para una segunda hebra de ADNc, 2) alineación, los oligos nuevamente se alinean al templado, 3) extensión, se agregan nucleótidos para crear moléculas de ADNc, al finalizar este proceso se visualiza el producto obtenido mediante electroforesis.

#### **Procedimiento:**

Se usó el sistema comercial Verso 1-Step RT-PCR ReddyMix Kit (marca Thermo Scientific), de acuerdo al diseño de oligos de *SOCS4* y *SOCS6* se establecieron las condiciones de amplificación. La muestra de ARN que se usó, fue obtenida de leucocitos totales de un control (paciente sano), se prepararon reacciones independientes para cada gen de la siguiente manera; 0.2 µl de Verso Enzyme Mix que incluye inhibidor de ARNasa para proteger el ARN de su degradación, 5 µl de 2X 1-Step PCR ReddyMix el cual es un tampón de reacción que permite la transcripción inversa y la amplificación por PCR, 0.5 µl de enzima RT Enhancer que elimina la contaminación de ADN en caso de que la muestra presente trazas del mismo; en cuanto a la concentración final de oligos, se ajustaron a una concentración 10 µM para *SOCS4*, *SOCS6* y *HPRT*, se usaron 1.65 µl Oligo Sentido y 1.65 µl Oligo Antisentido para cada reacción, finalmente se usó 1 µl de ARN para un volumen final de

reacción de 10  $\mu$ l., se usó 1  $\mu$ l de ARN más 1.3  $\mu$ l de agua, para un volumen final de reacción de 10  $\mu$ l, en la siguiente tabla se muestran las condiciones para la amplificación de los genes.

**Tabla 2.** Condiciones para la ampliación por RT-PCR de punto final

	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
<i>Síntesis de ADNc</i>	50 °C	15 min	1 Ciclo
<i>Inactivación Verso*</i>	95 °C	2 min	1 Ciclo
<i>Desnaturalización</i>	95 °C	20 seg	
<i>Alineación</i>	60 °C	30 seg	40 Ciclos
<i>Extensión</i>	72 °C	1 min	
<i>Extensión Final</i>	72 °C	5 min	1 Ciclo

Nota: Condiciones para la amplificación de *SOCS4* y *SOCS6*, \*es la inactivación de la enzima Verso después de la síntesis de ADNc (complementario).

### 3.10 qRT-PCR en tiempo real con SYBR Green

**Fundamento:** Existen diferencias entre RT-PCR de punto final y en tiempo real, la primera técnica nos permite obtener el producto sólo al final de la reacción, mientras la qRT-PCR en tiempo real nos permite cuantificar la cantidad de producto obtenido en cualquier momento de la amplificación. El qRT-PCR en tiempo real es una técnica que se divide en dos pasos: 1) la síntesis de ADNc y 2) la amplificación por PCR; para la detección se usó SYBR Green, este es un agente no específico cuya función es intercalarse entre las bases a lo largo del ADN durante la hibridación, este agente tiene una emisión de fluorescencia a 520 nm, que aumenta notablemente la emisión de fluorescencia cuando se une a ADN de doble cadena, por lo tanto, el incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de fluorescencia emitida.

A diferencia del sistema con sondas TaqMan de hidrolisis, SYBR Green detecta productos de amplificación inespecíficos, por lo tanto, para asegurar que la fluorescencia emitida es debida sólo a la formación del producto deseado, al final del PCR se agrega una etapa, que a través de un gradiente creciente de temperatura se puede monitorear la cinética de disociación de los productos, es decir, se valida la obtención de un solo producto, este proceso se denomina como la curva de disociación (curva melting).

### **Retrotranscripción, procedimiento:**

Se usó el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (marca Thermo Scientific), que contiene todos los componentes necesarios para realizar la RT. Cada reacción se elaboró de la siguiente manera: 4 µl Buffer 5X, 2 µl de dNTPs Mix a 10 mM, 1 µl Hexámeros, 1 µl Inhibidor de ARNasa RiboLock, 1 µl enzima RT RevertAid M-MuLV, se calculó de forma independiente la cantidad de ARN total de cada muestra (200 a 1300ng) y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua estéril. Se usaron las siguientes condiciones para la síntesis de ADNc; 25 °C por 10 min, 48 °C por 30 min, 95 °C por 5 min, Holder 4°C, se almacenaron a -20 °C (solo si el ADNc no es usado en ese momento).

### **PCR en tiempo real, procedimiento:**

Se usó el equipo Rotor-Gene Q (Qiagen) y el producto comercial SYBR Green PCR Master Mix (marca Thermo Scientific), los componentes de la siguiente manera: 5 µl de Buffer SYBR Green, los oligos se agregaron según la reacción que corresponde a cada gen: 0.9 µl sentido y antisentido de *HPRT* 10 µM, 0.9 µl sentido y antisentido de *SOCS4* o *SOCS6* 10 µM. A cada reacción se le agregaron 2 µl de ADNc y se llevó a un volumen final de 10 µl con agua estéril. Se usó tira de micro tubos para reacción, posteriormente se programaron las condiciones del equipo que se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 3: Condiciones de RT-PCR en tiempo real**

<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
50 °C	2 min	1 Ciclo
94 °C	2 min	1 Ciclo
94 °C	60 seg	
*61 °C	30 seg	40 Ciclos
72 °C	60 seg	
<b>Curva de disociación</b> 1 Ciclo		
<i>Se estableció un rango de temperatura de 60 °C a 95 °C, se estableció un incremento de la temperatura en un intervalo de 0.5 °C por cada 5 seg.</i>		

Nota: \*La temperatura para la amplificación de ambos genes *SOCS* y el gen de referencia *HPRT* fue la misma que se obtuvo en el RT-PCR punto final.

### 3.11 Curva de normalización para los genes *SOCS4* y *SOCS6*

**Fundamento:** La curva de validación o normalización permite comprobar las eficiencias de los genes de problema (estudio) con respecto a un gen de referencia; esto consiste en construir un línea recta con el valor  $\Delta CT$  de ambos genes ( $CT_{problema} - CT_{referencia}$ ) en función de la concentración de ARN expresada en logaritmo base 10; bajo condiciones experimentales los reactivos de la curva de amplificación se encuentran en abundancia y la eficiencia es cercana o igual al 100%; es decir se observa la fase geométrica en esta etapa que tiene un comportamiento  $2^n$ , y nos permite a su vez calcular el rango dinámico de la concentración del ARN en cual  $\Delta CT$  es constante a diferentes concentraciones del ácido nucleico.

Durante la fase geométrica de la curva de amplificación se puede identificar el ciclo umbral CT (ciclo umbral o fraccional) en el cual la fluorescencia supera la línea umbral que representa cuantos ciclos le tomo a cada muestra generar la cantidad suficiente de fluorescencia para llegar a la detección. El CT es un valor inversamente proporcional a la cantidad del ácido nucleico y es el fundamento para calcular la cantidad de ARNm, mientras mayor cantidad de ARN se encuentre en una muestra, menor número de ciclos requerirá para alcanzar el umbral de detección.

#### **Procedimiento:**

Se realizó qRT-PCR en tiempo real de una muestra de ARN de una persona sana, de la cual previamente se realizaron diluciones seriadas (1:2) del ARN extraído, para pasarlos a cDNA, para *SOCS4* en el rango de 4.29 a 0.13 ng/ $\mu$ l (4.29, 2.14, 1.07, 0.53, 0.26, 0.13), y para *SOCS6* en el rango de 2.52 a 0.16 ng/ $\mu$ l (2.52, 1.26, 0.63, 0.31, 0.16), a cada concentración se le realizó la RT, posteriormente se realizó la PCR en tiempo real siguiendo las condiciones previamente establecidas en la tabla 3, y se realizó por duplicado cada una de las reacciones, una vez que se obtuvieron los datos, se calculó la eficiencia de la amplificación de cada gen con respecto a *HPRT*.

### 3.12 Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cuantificación relativa (qRT-PCR)

**Fundamento:** El algoritmo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (también conocido como delta-delta-Ct o algoritmo DDCT), es un método usado para cuantificar y analizar los cambios relativos (qRT-PCR) en la expresión génica a nivel fisiológico este método consiste en obtener cuantificaciones rápidas de muchos genes de interés (gen problema) con respecto a un gen de referencia, o gen de expresión constitutiva (Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001). La expresión del gen problema se compara con la expresión del gen de referencia, en cada una de las muestras.

Forma de obtención de cálculo de  $-\Delta\Delta Ct$ :

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{gen problema } SOCS4/SOCS6)} - Ct_{(\text{gen de referencia } HPRT)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{pacientes de EM})} - Ct_{(\text{grupo control})}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct \pm S} = \text{donde } S = \text{desviación estándar} = (S_1^2 + S_2^2)^{1/2}$$

$S_1$  es la desviación estándar de los CT de *SOCS4/SOCS6* en el grupo control y  $S_2$  es la desviación estándar de los CT de *SOCS4/SOCS6* en el grupo de EM.

$2^{-\Delta\Delta Ct \pm S}$ : veces de incremento y decremento de la transcripción de los genes *SOCS4/SOCS6* del grupo de EM respecto al grupo control.

### 3.13 Análisis estadístico

El análisis se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVI, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para ver la normalidad en la distribución de los datos. Para comparar dos muestras se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney/T-student y para identificar diferencia entre más de dos grupos se utilizó la prueba Kruskal-Wallis/ANOVA, además se realizó análisis de correlación a través del coeficiente de correlación de Spearman,  $\rho$  (rho).

### 3.14 Análisis del promotor de los genes *SOCS4* y *SOCS6*

**Fundamento:** La región promotora es una secuencia de ADN que localiza antes del sitio de inicio de la transcripción de un gen. En esta región se incluyen secuencias de unión a elementos reguladores o factores de transcripción que regulan directamente la expresión de los genes. El análisis *in silico* del promotor de un gen mediante herramientas bioinformáticas permite el análisis de datos genómicos, regulación y expresión génica, creación y evaluación de redes y vías, búsquedas en la literatura, análisis y extracción de secuencias y visualización

de la anotación del genoma. El software Genomatix es una herramienta bioinformática que ofrece soluciones integradas y bases de datos para anotación genómica y análisis de regulación, entre sus herramientas incluye análisis del factor de transcripción, anotación del genoma que integra una amplia variedad de fuentes de transcripción y un enfoque especial en las regiones reguladoras y tecnología de análisis para tecnologías genómicas de alto rendimiento (microarrays y secuenciación de próxima generación). Mathinspector una herramienta de este software que utiliza una gran biblioteca de descripciones de matriz para sitios de unión de factores de transcripción para localizar coincidencias en secuencias de ADN, al momento de la búsqueda asigna una calificación de calidad a las coincidencias y, por lo tanto, permite el filtrado basado en la calidad y la selección de coincidencias.

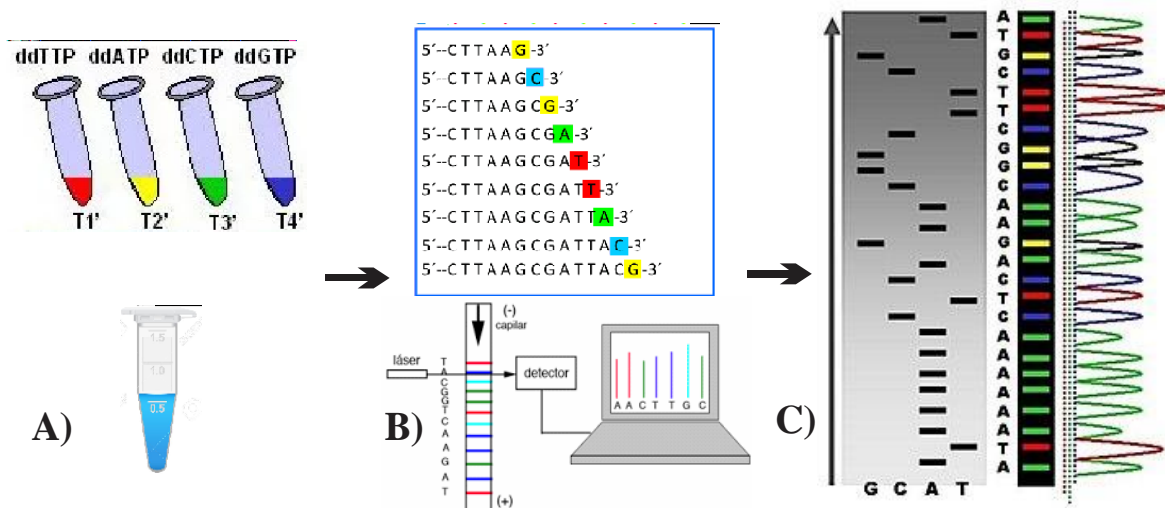
### **Procedimiento:**

Se utilizó el software Genomatix suite v3.10, dentro de sus herramientas se seleccionó el programa MatInspector, el cual busca secuencias para el análisis e identificación de sitios de unión de factores de transcripción. Para identificar el promotor de los genes seleccionados, se busca en NCBI la secuencia de los genes: *SOCS4*; secuencia de referencia de NCBI: NC\_000014.9 - Cromosoma 14, *SOCS6*; secuencia de referencia de NCBI: NC\_000018.10 - Cromosoma 18. Posteriormente con el programa SnapGene Viewer, se insertó la secuencia del gen en formato FASTA, se comparó la primera línea de la secuencia del ARNm de los genes, en formato FASTA, para identificar el sitio de inicio de la transcripción; *SOCS4*: Secuencia de referencia de NCBI: NM\_080867.2, *SOCS6*: Secuencia de referencia de NCBI: NM\_004232.3.

Se identificó el sitio de inicio de la transcripción y se seleccionó 2000 pb sitio arriba del inicio de la transcripción como promotor proximal para todos los genes. En NCBI se buscó las secuencias de los genes y se seleccionaron los 2000 pb sitio arriba, esta secuencia se introdujo en el programa Mathinspector para analizar los sitios de los factores de transcripción. Posteriormente se buscó el factor de transcripción a analizar con un score de 0.9 a 1, con esto referimos que realmente existen estos sitios de unión en la región promotora. Posteriormente se seleccionó el factor de transcripción que se investigó y apareció una gráfica que contiene los sitios de unión, se cuentan estos sitios para su posterior análisis.

### 3.15 Verificación de los productos amplificados de *SOCS4* y *SOCS6* por qRT-PCR en tiempo real mediante secuenciación

**Fundamento:** La secuenciación de ADN es una técnica que determina la secuencia de bases de los nucleótidos (Adeninas, Timinas, Citocinas y Guaninas) de un fragmento de ADN. La técnica se basa en una modificación de la PCR con dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar. La información obtenida en los secuenciadores automáticos se guarda en forma de un cromatograma es el gráfico que arroja el secuenciador después de analizar la electroforesis, el cual muestra el orden de las bases a partir de curvas de fluorescencia, una por cada base (figura 13).



**Figura 13. Método Secuenciación de Sanger**

El método de Secuenciación A) se lleva a cabo en cuatro tubos, cada tubo contiene el molde, el cebador, los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), la polimerasa y undideoxinucleótido trifosfato (ddNTP) distinto en cada caso. B) La separación de los fragmentos se realiza mediante electroforesis capilar, los fragmentos migran de acuerdo a su tamaño, el fluoróforo con el que van marcados es detectado por un láser, C) éste envía una señal que es interpretada por el equipo en forma de un pico en un cromatograma. (Imagen realizada para la tesis)

#### **Procedimiento:**

Se utilizó el kit DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>-5 (marca ZYMO Research) para purificar los productos obtenidos por RT-PCR en tiempo real de los genes *SOCS4* y *SOCS6*, cuenta con unas columnas Zymo-Spin<sup>TM</sup>, un tubo colector, un buffer de unión de ADN, un buffer de lavado de DNA y un buffer de elución de DNA. La reacción de purificación se

realizó de la siguiente manera: se agregaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, 350-400 µl de buffer de unión de ADN y 50-100 µl de muestra de los productos obtenidos por qRT-PCR en tiempo real, se mezcló brevemente por 10 segundos en el vórtex, después se transfirió toda la mezcla a una columna Zymo-Spin™ en un tubo colector, se centrifugó por 30 segundos y se decantó el sobrenadante, luego se agregó 200 µl de buffer de lavado a la columna, se centrifugó por 30 segundos, se vuelve a repetir otro lavado con el buffer de lavado, posteriormente se agregó de 20 a 30 µl de buffer de elución a la matriz de la columna y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml y se centrifugó por 30 segundos para eludir el ADN. Ya que se tiene el tubo de 1.5 ml se procedió a hacer una purificación del templado, posteriormente se hace una PCR de secuenciación y una electroforesis capilar en un gel de poliacrilamida para la detección de las bandas, el resultado fue arrojado en forma de un cromatograma para su posterior análisis.

## CAPITULO IV

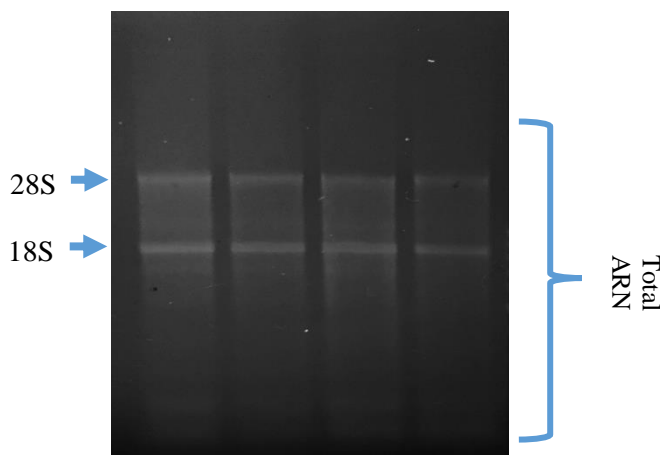
### IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN

#### 4.1 Definición de los grupos de estudio

Se seleccionaron 30 pacientes de ambos géneros con diagnóstico de EM. fase RR del Servicio de Neurología del Centro Médico Manuel Ávila Camacho del Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, México, de los cuales 11 fueron hombres con un rango de edad entre 24-55 años y 19 mujeres con 23-61 años. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo al tratamiento de IFN- $\beta$  (dosis de 6, 8 y 12 millones de unidades internacionales (MUI) (n=22) y con AG (20 mg una única dosis) (n=8). El grupo control estuvo conformado por 30 personas física y neurológicamente sanas, 15 hombres en un rango de edad 24-50 años y 15 mujeres con 24-63 años. El promedio de EDSS se obtuvo a través del archivo del paciente como una medida de la actividad de la enfermedad, de acuerdo a esto fue de  $2.6 \pm 0.96$  para el grupo tratado con IFN- $\beta$  y  $3.6 \pm 1.36$  para el grupo con AG.

#### 4.2 ARN de células mononucleares

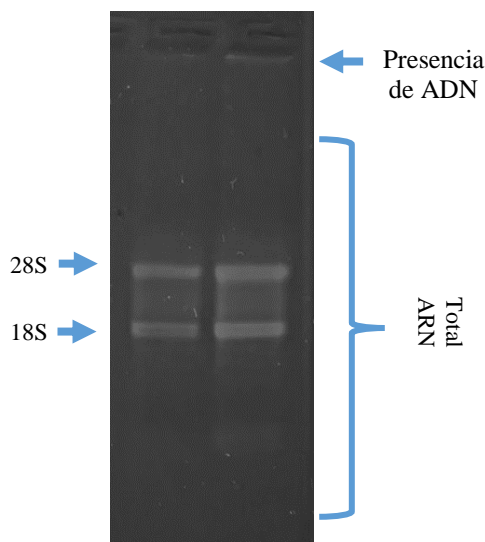
Se realizó extracción y cuantificación del ARN de las muestras de los grupos de estudio. La verificación de la integridad se muestra en la figura 14. Las muestras tuvieron una concentración promedio de 570 ng/ $\mu$ l, cada muestra fue almacenada a  $-70^\circ\text{C}$  para su posterior uso.



#### Figura 14. Muestras del ARN total obtenidas

Gel de electroforesis al 1%. Se muestra ARN total obtenido de leucocitos de sangre periférica, las dos bandas intensas corresponden a las subunidades 28S y 18S.

A pesar de los cuidados y manejos establecidos, algunas muestras presentaron trazas o contaminación de ADN, el cual fue eliminado mediante tratamientos con DNAsa I (figura 15), posteriormente se cuantificaron.



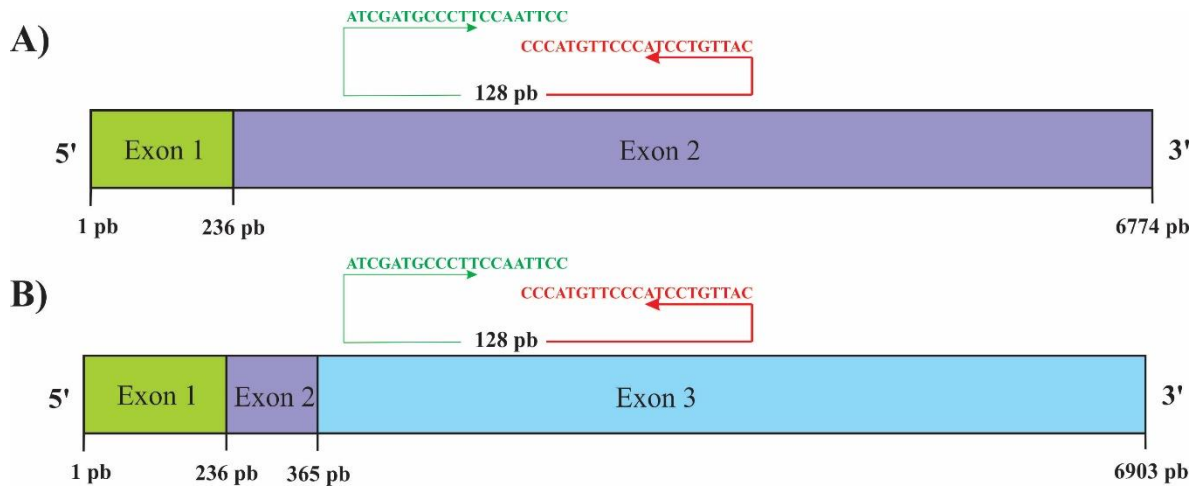
**Figura 15. Tratamiento con DNAsa I en muestras de ARN total**

Verificación de la integridad del ARN después del tratamiento con DNAsa I, el cual se muestra en el carril 1 y en el 2, el ARN sin tratamiento, éste último presenta contaminación con ADN

### 4.3 Estandarización por RT-PCR de punto final de *SOCS4* y *SOCS6*

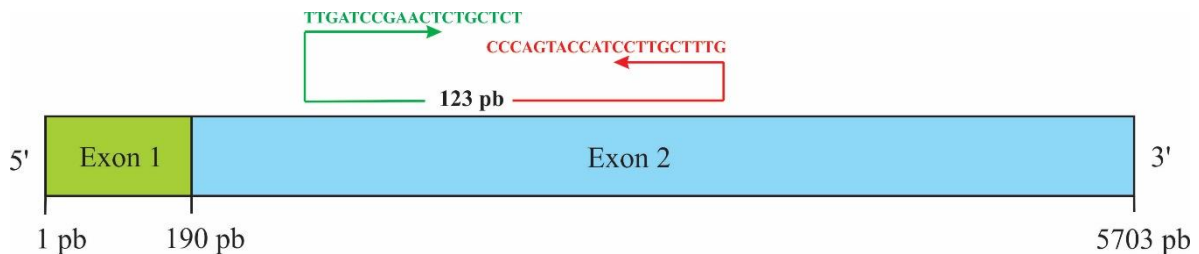
Debido a que el gen de *SOCS4* presenta 2 variantes del ARNm, se realizó un alineamiento para establecer que los oligonucleótidos amplificaran la misma secuencia y ubicar en qué región del gen se encuentran, los oligonucleótidos se ubicaron en el exón 2 para la variante 1 y en el exón 3 para la variante 2 (Figura 16), así mismo los oligos para *SOCS6* fueron diseñados y se ubicaron en el exón 2 (Figura 17).

Se usaron las condiciones descritas previamente en la metodología para la amplificación de *SOCS4* y *SOCS6* por RT-PCR de punto final, utilizando una muestra de leucocitos del grupo control. El ARN de la muestra se cuantificó a una concentración total de 582 ng/μl, la temperatura de alineamiento para ambos genes fue de 60 °C, a una concentración de los oligos de 10 μM para ambos genes, este ajuste nos permitió obtener los productos de amplificación que se muestran en la figura 18.



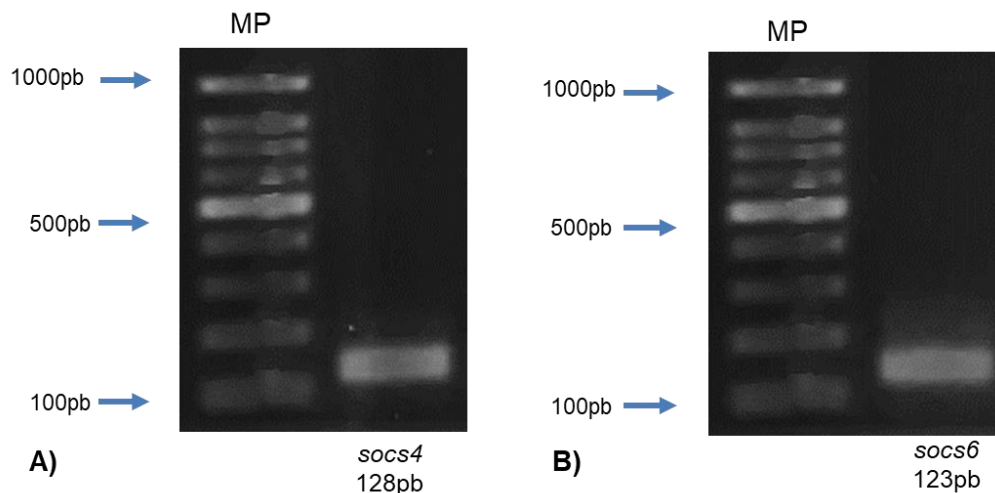
**Figura 16. Ubicación de los oligos de *SOCS4* en el ARNm**

Los oligos para amplificar el transcrito de las dos variantes de ARNm se ubicaron A) en el exón 2 para la variante 1, y b) en el exón 3 para la variante 2, en ambas variantes el producto amplificado es de 128 pb. (Imagen realizada para la tesis)



**Figura 17. Ubicación de los oligos de *SOCS6* en el ARNm**

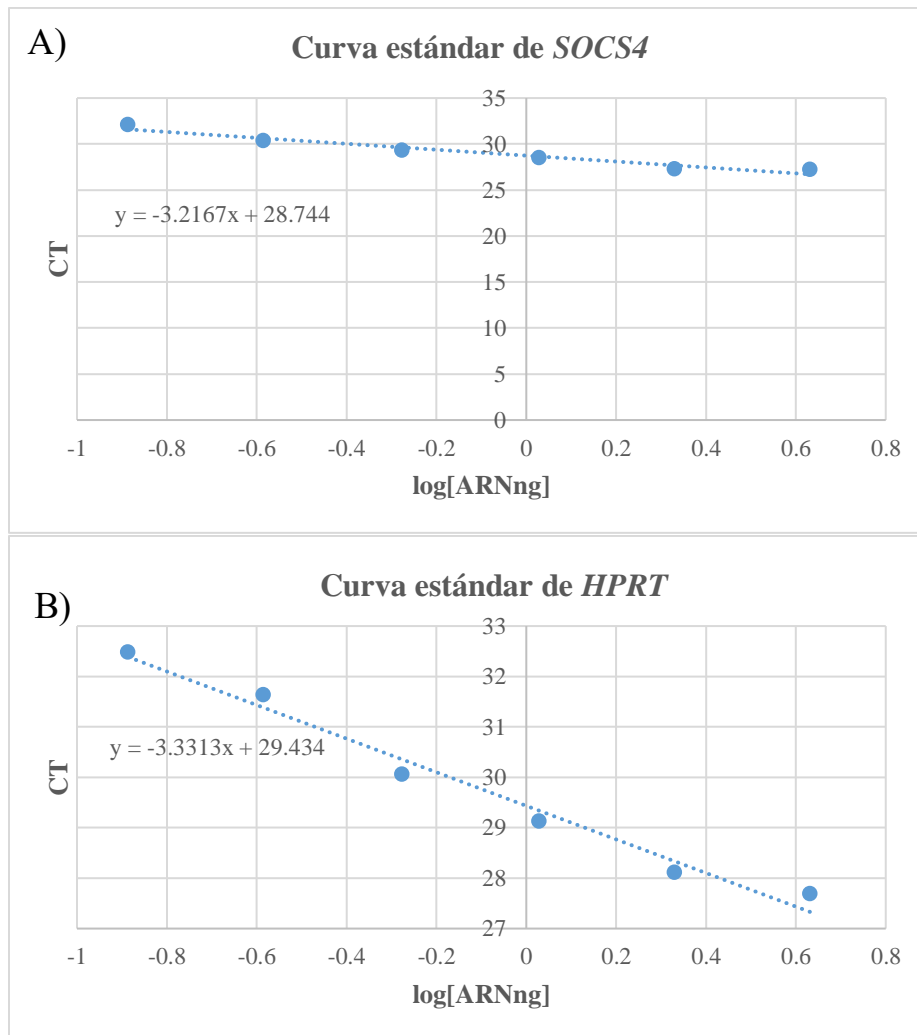
Los oligos para amplificar el transcrito de *SOCS6* se ubicaron en el exón 2, el producto amplificado es de 123 pb. (Imagen realizada para la tesis)



**Figura 18. Productos de amplificación de *SOCS4* y *SOCS6* por RT-PCR en punto final** Verificación de los productos de *SOCS4* y *SOCS6*, gel de electroforesis al 1%, Ambos productos se obtuvieron a 60 °C como temperatura de alineamiento, y la concentración de los oligos establecida fue de 10  $\mu$ M para ambos genes.

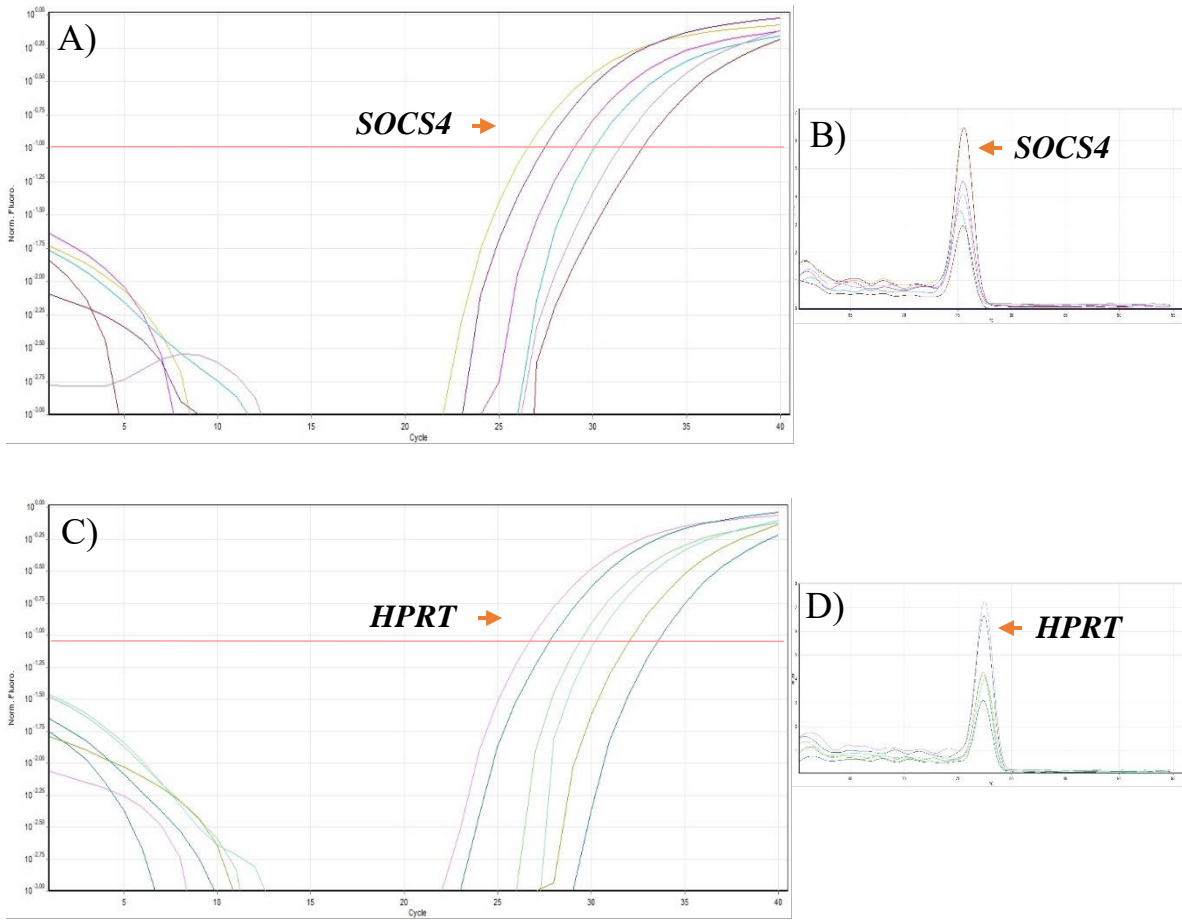
#### 4.4 Eficiencia de amplificación por qRT-PCR en tiempo real de los transcritos de *SOCS4* y *SOCS6*

Para la estandarización de las condiciones de amplificación por RT-PCR en tiempo real de los genes *SOCS4* y *SOCS6* con respecto a *HPRT*, se realizó la curva de amplificación a diferentes concentraciones de ARNm; para *SOCS4* se utilizaron 4.29, 2.14, 1.07, 0.53, 0.26 y 0.13 ng/ $\mu$ l, para *SOCS6* se utilizaron 2.52, 1.26, 0.63, 0.35 y 0.15 ng/ $\mu$ l. Se realizó RT para obtener ADNc y posteriormente PCR en tiempo real, cada reacción se realizó por duplicado, las eficiencias de amplificación fueron las siguientes; para *SOCS4* fue de 104% ( $m=-3.21$ ) y *HPRT* 99% ( $m=-3.33$ ) (figura 19), para *SOCS6* fue de 86% ( $m=-3.58$ ) y *HPRT* 81% ( $m=-3.74$ ) (figura 21); para ambos genes se agregó al PCR en tiempo real la curva de disociación, para verificar que no se formaran productos inespecíficos (figura 20 y figura 22).



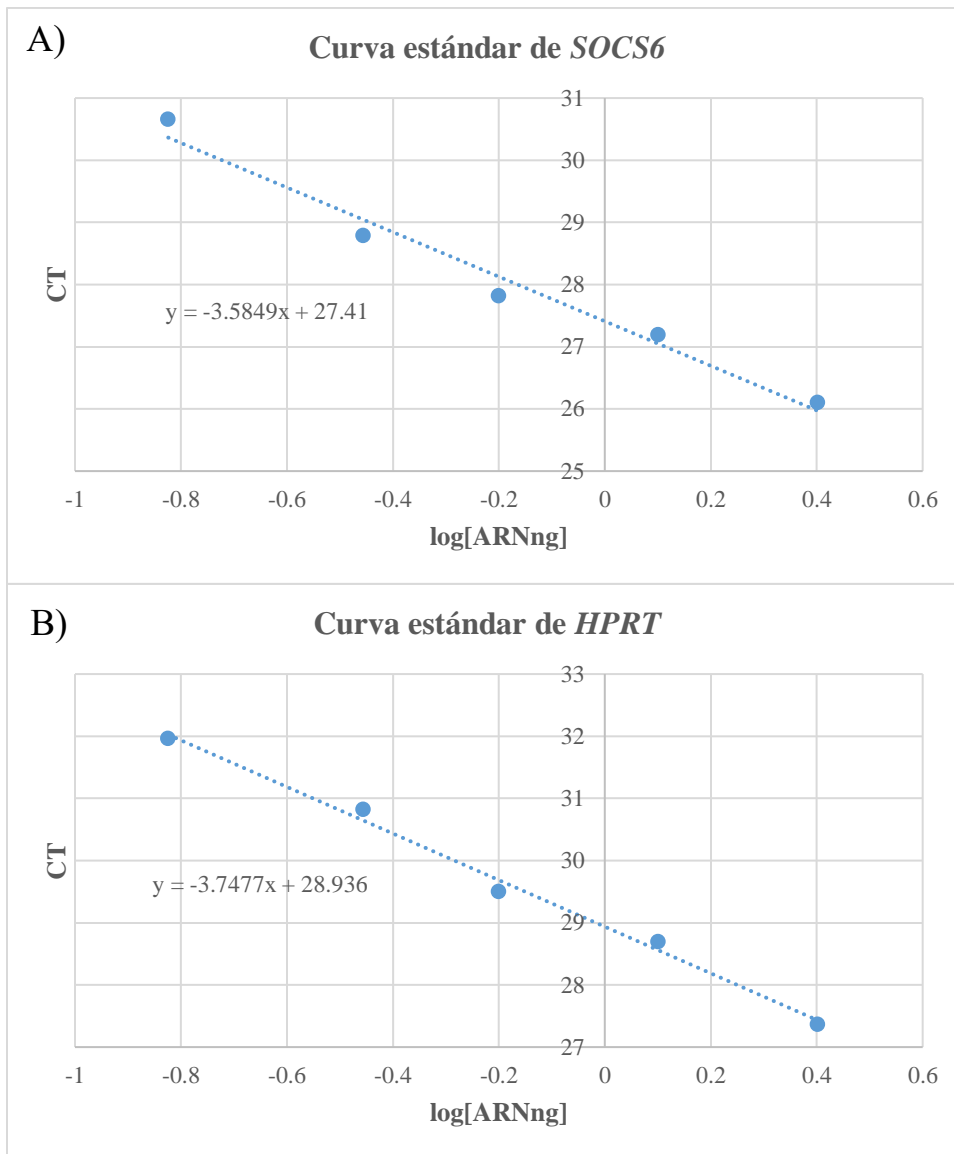
**Figura 19. Curva estándar de *SOCS4* y *HPRT***

Se gráfica el CT en función del logaritmo de la concentración de ARNm: A) Curva estándar del gen *SOCS4*, la eficiencia de amplificación es de 104% ( $m=-3.21$ ) B) Curva estándar del gen *HPRT*, se obtuvo una eficiencia del 99% ( $m=-3.33$ )



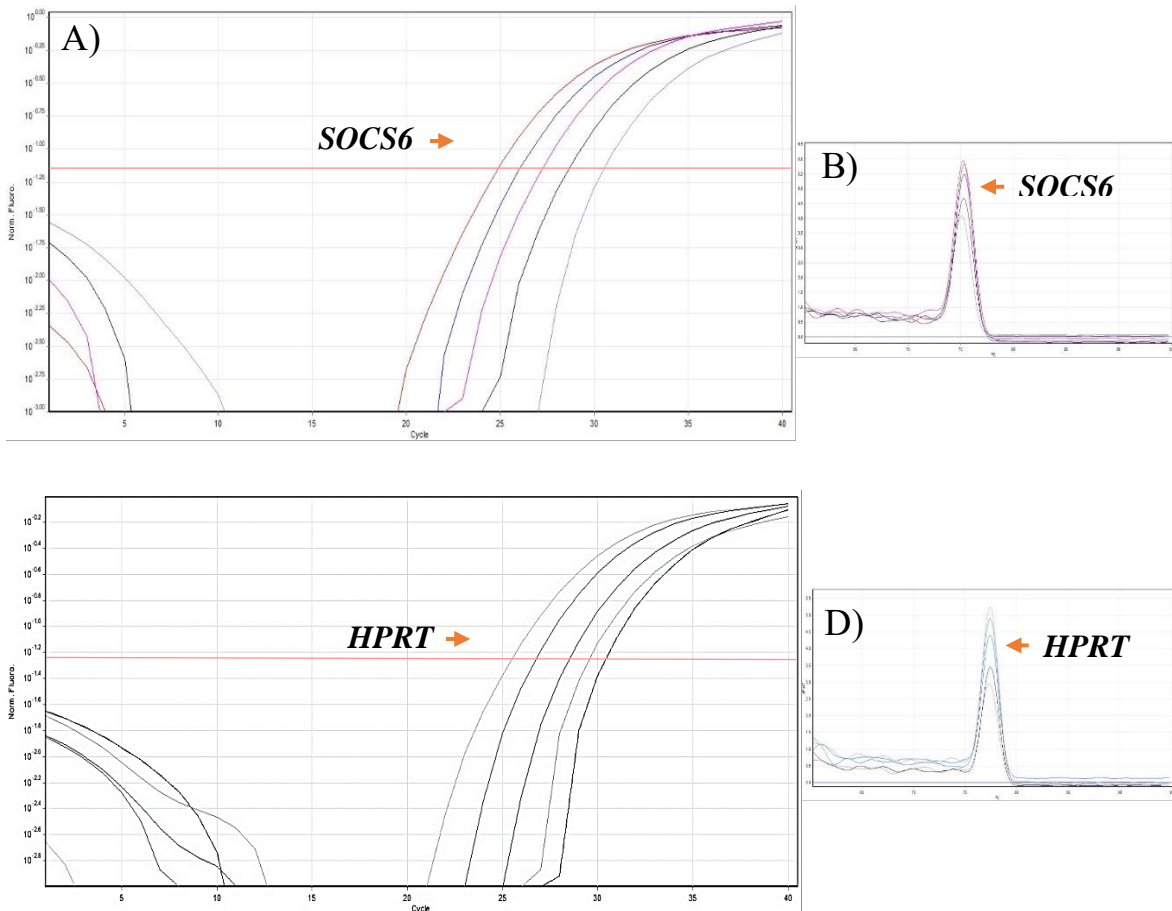
**Figura 20. Curva de amplificación y disociación de *SOCS4* y *HPRT***

Se muestran las gráficas de amplificación y las curvas de disociación de los genes a diferentes concentraciones de ARNm. A) Curva de amplificación y B) curva de disociación para *SOCS4*, C) curva de amplificación y D) curva de disociación para *HPRT*



**Figura 21. Curva estándar de *SOCS6* y *HPRT***

Se gráfica el CT en función del logaritmo de la concentración de ARNm: A) Curva estándar del gen *SOCS6*, la eficiencia de amplificación es de 86% ( $m=-3.58$ ), B) Curva estándar del gen *HPRT*, se obtuvo una eficiencia del 81% ( $m=-3.74$ )



**Figura 22. Curva de amplificación y disociación de *SOCS6* y *HPRT***

Se muestran las gráficas de amplificación y las curvas de disociación de los genes a diferentes concentraciones de ARNm A) Curva de amplificación y B) curva de disociación para *SOCS6*, C) curva de amplificación y D) curva de disociación para *HPRT*.

#### 4.5 Validación de amplificación de los genes *SOCS4* y *SOCS6*

Una vez verificadas las eficiencias de amplificación de cada gen se construyó la curva de validación, en la que se obtuvo una gráfica lineal con una pendiente de 0.1146 para los genes *SOCS4* y *HPRT* (Figura 23 A) y para las eficiencias de los genes *SOCS6* y *HPRT* se obtuvo una pendiente de 0.1627 (Figura 23 B). La concentración óptima para la amplificación de *SOCS4* en las muestras del grupo control y de pacientes con EM fue tomado del punto medio del rango de concentraciones usadas 1.07 ng/μl y 0.53 ng/μl, siendo de 0.8 ng/μl, para *SOCS6* la concentración óptima fue de 0.63 ng/μl. Con estos resultados validamos el método  $\Delta\Delta CT$ , porque las pendientes obtenidas nos indican que las eficiencias de amplificación de los genes *SOCS4* y *SOCS6* con *HPRT* son semejantes para estas muestras, esto indica que *HPRT* puede ser utilizado como gen de referencia para el analizar la cuantificación relativa de la transcripción de *SOCS4* y *SOCS6*.

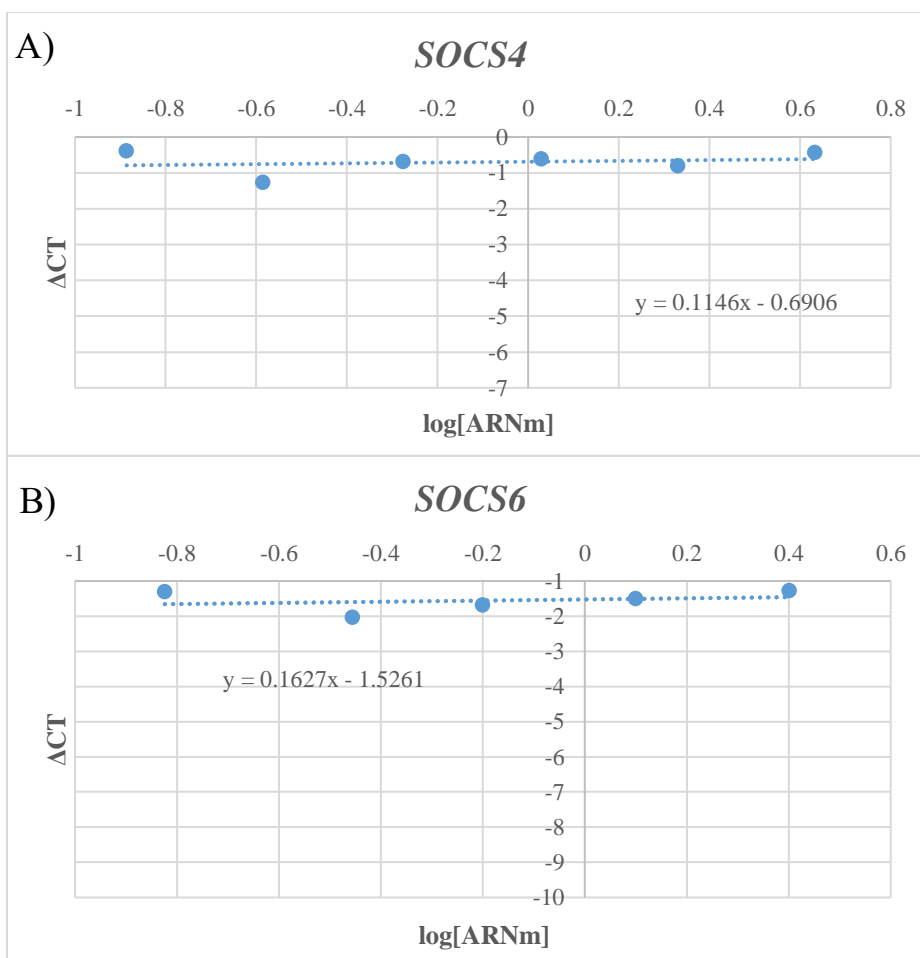


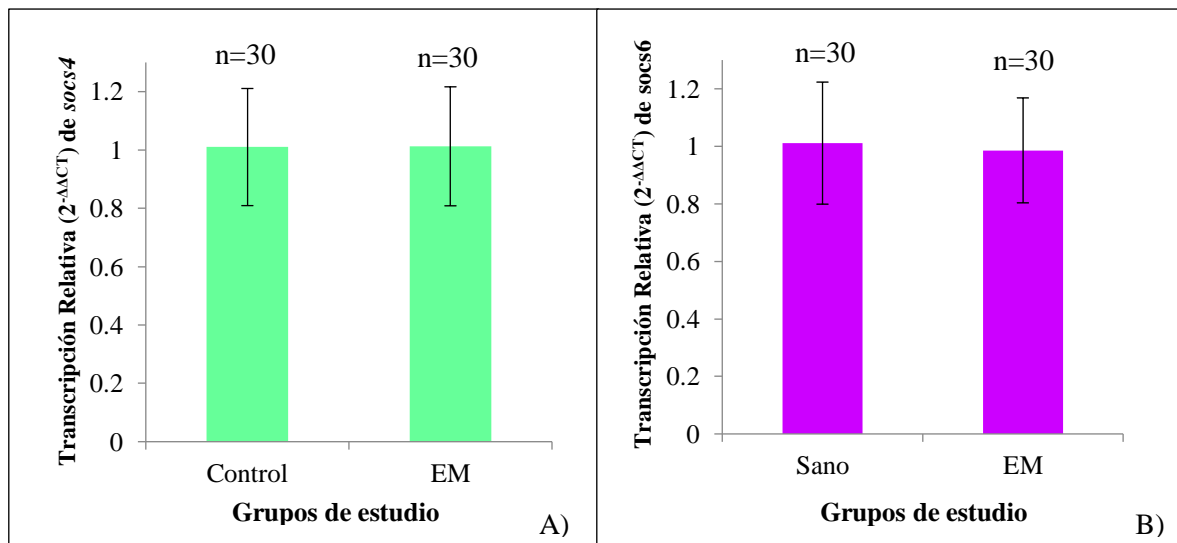
Figura 23. Curva de validación de las eficiencias de los genes *SOCS4* y *SOCS6*

Se grafica el logaritmo de la concentración de ARN total de células mononucleares de sangre periférica (leucocitos) de una persona sana, para *SOCS4* en un rango de 4.29 a 0.13ng vs  $\Delta CT$  ( $CT_{SOCS4}-CT_{HPRT}$ ) y para *SOCS6* de 2.52 a 0.15 ng vs  $\Delta CT$  ( $CT_{SOCS6}-CT_{HPRT}$ ). A) la pendiente fue de 0.1140 para *SOCS4* y *HPRT* y B) 0.1627 para *SOCS6* y *HPRT*, indicando que a diferentes concentraciones de ARNm, el  $\Delta CT$  se mantiene constante.

#### 4.6 Análisis de qRT-PCR en tiempo real de los genes *SOCS4* y *SOCS6* por el método $2^{-\Delta\Delta CT \pm S}$ en pacientes con EM y en el grupo control

El nivel de transcripción de *SOCS4/SOCS6* fue calculado por el método  $2^{-\Delta\Delta CT \pm S}$ , el cual indica las veces de diferencia del transcrito de *SOCS4/SOCS6* del grupo de EM respecto al grupo control, éste último es estimado como la unidad, ya que al calcular  $\Delta\Delta CT = (\Delta CT_{control} - \Delta CT_{control}) = 0$ , y por la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT \pm S}$ ,  $2^0 = 1$ .

Respecto al grupo control cuyo nivel de transcripción para *SOCS4* fue de  $1.01002 \pm 0.20$ , y para el grupo con EM fue de  $1.0124 \pm 0.20$  (Figura 24.A), lo que parece indicar que no hay alguna modificación ( $p=0.53$ ). Para *SOCS6* el nivel de transcripción del grupo control fue de  $1.0104 \pm 0.21$ , y en pacientes con EM fue de  $0.9858 \pm 0.18$  (Figura 24.B), para *SOCS6* se encontró una disminución no significativa ( $p=0.65$ ) lo que parece indicar que la enfermedad no modifica de forma importante la transcripción.



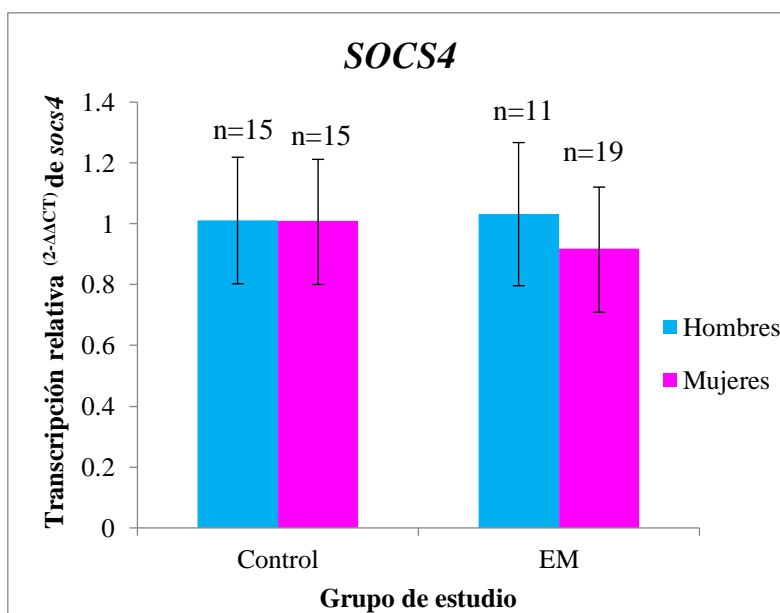
**Figura 24. Nivel de transcripción de *SOCS4* y *SOCS6* en pacientes con EM**

Cuantificación relativa de la expresión de *SOCS4* y *SOCS6*. Se grafica el valor de  $2^{-\Delta\Delta CT \pm S}$  calculado entre los  $\Delta CT$  de los diferentes grupos de estudio, expresado como veces de incremento de ARN respecto al control. A) La cuantificación de *SOCS4* en pacientes con EM fue de  $1.0124 \pm 0.20$ ; B) en *SOCS6* fue de  $0.9858 \pm 0.18$ .

#### 4.7 Análisis del nivel de transcripción de los genes *SOCS4* y *SOCS6* en relación al género

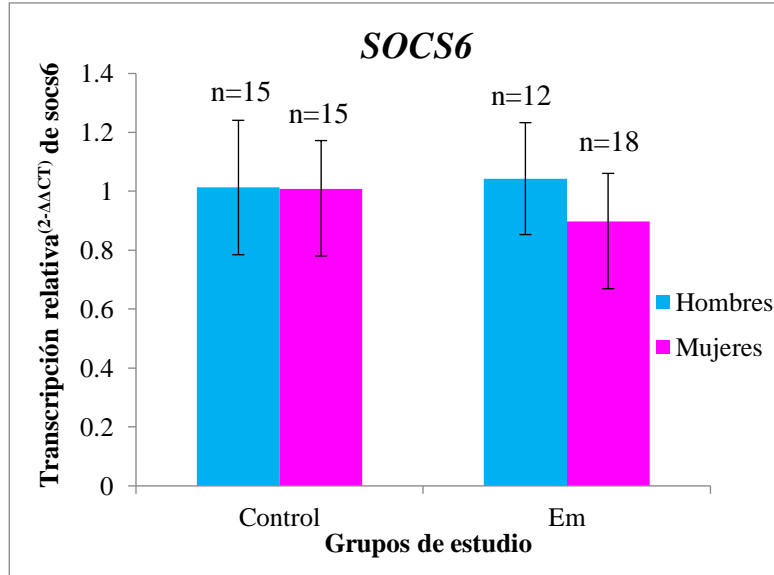
Cuando se agrupó la población de acuerdo al género, el nivel de transcripción de *SOCS4* para hombres del grupo control fue de  $1.0107 \pm 0.21$  y para mujeres de  $1.0101 \pm 0.20$  ( $p=0.57$ ). Para los pacientes del género masculino el nivel fue de  $1.0248 \pm 0.17$  y para mujeres  $0.9189 \pm 0.21$  ( $p=0.9$ ). Al hacer comparación entre grupo control y grupo con EM, en mujeres y en hombres no hay diferencia significativa ( $p=0.6$  y  $p=0.8$ )(figura 25). y para los hombres

Para *SOCS6* el nivel de transcripción para hombres del grupo control es de  $1.0129 \pm 0.23$  y para mujeres  $1.008 \pm 0.19$  ( $p=0.7$ ). La transcripción para los pacientes masculinos fue de  $1.0438 \pm 0.13$  y para pacientes mujeres una menor transcripción, de  $0.8974 \pm 0.16$  ( $p=0.8$ ). Al comparar entre el género masculino entre el grupo control y con EM no hubo diferencias significativas ( $p=0.5$ ), y entre el género femenino entre el grupo control y con EM ( $p=0.8$ ), no se encontró diferencia significativa (figura 26).



**Figura 25. Nivel de transcripción de *SOCS4* de acuerdo al género**

Cuantificación relativa de la expresión de *SOCS4* con respecto al género. Se grafica el valor de  $2^{-\Delta\Delta CT \pm S}$  calculado entre los  $\Delta CT$  de los diferentes grupos de estudio, expresado como veces de incremento de ARN respecto al control.

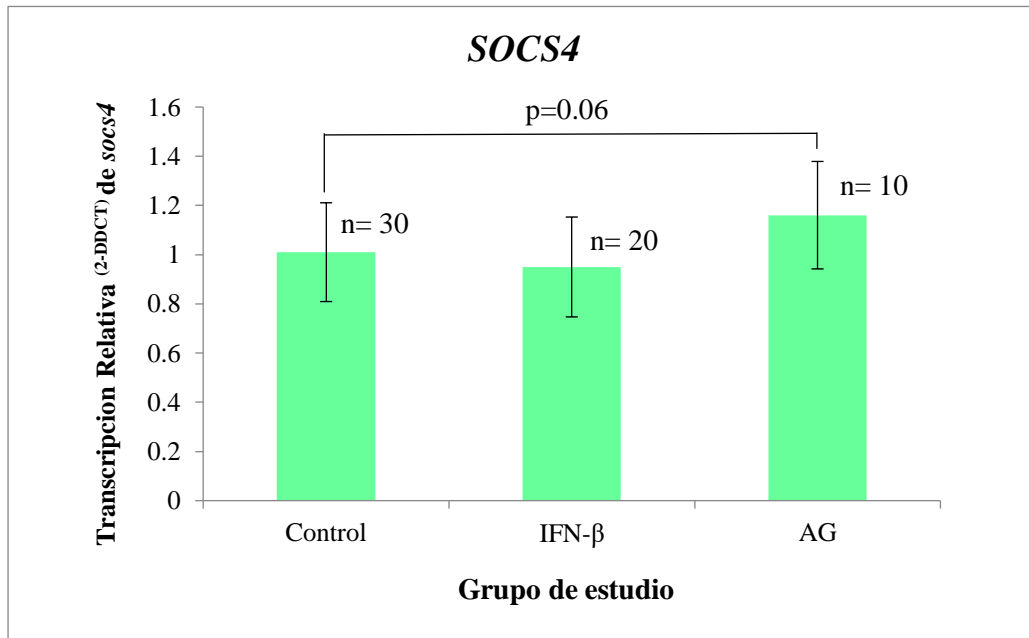


**Figura 26. Nivel de transcripción de *SOCS6* de acuerdo al género**

Cuantificación relativa de la expresión de *SOCS6* con respecto al género. Se grafica el valor de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  calculado entre los  $\Delta CT$  de los diferentes grupos de estudio, expresado como veces de incremento de ARN respecto al control.

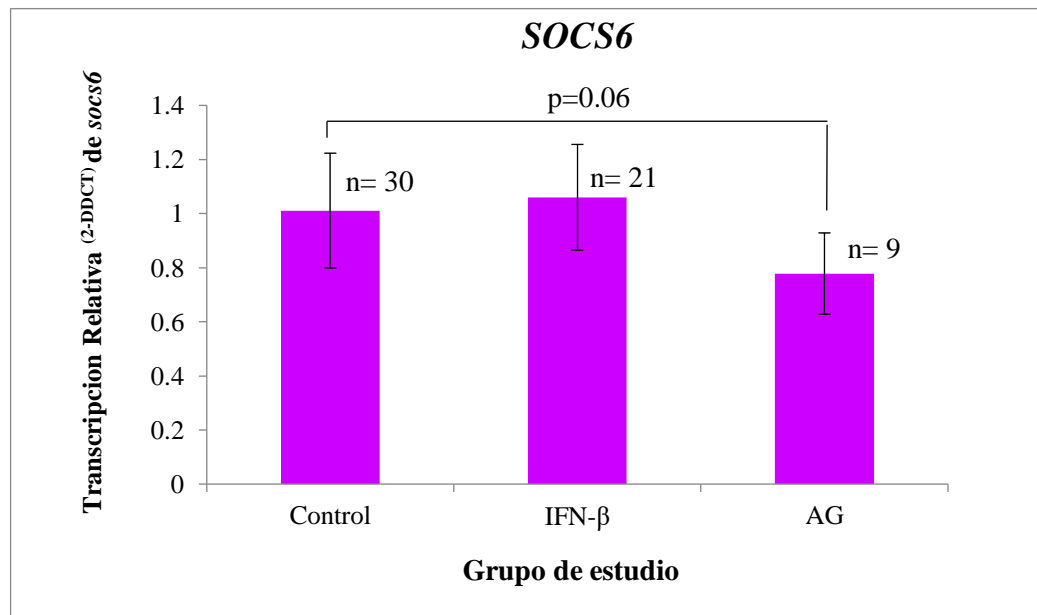
#### 4.8 Nivel de transcripción de los genes *SOCS4* y *SOCS6* en relación a los tratamientos de IFN- $\beta$ y AG

Cuando los pacientes se agruparon de acuerdo al tratamiento, IFN- $\beta$  o AG, el nivel de transcripción de *SOCS4* fue menor,  $0.9498 \pm 0.20$  para IFN- $\beta$  en comparación con la transcripción en pacientes tratados con AG  $1.1603 \pm 0.22$  ( $p=0.06$ ) (figura 27), lo que parece indicar que la transcripción de *SOCS4* si puede ser modificada por el tratamiento con AG. Respecto al nivel de transcripción de *SOCS6*, para los pacientes tratados con AG la transcripción fue menor,  $0.7782 \pm 0.15$  en comparación con la transcripción en pacientes tratados con IFN- $\beta$ ,  $1.0605 \pm 0.20$ , donde se mostró una disminución ( $p=0.14$ ) (figura 28). Por otra parte, la transcripción de *SOCS6* en pacientes tratados con AG respecto al grupo control tuvo un disminución ( $p=0.06$ ), indicando que el AG puede modificar la transcripción.



**Figura 27. Nivel de transcripción de *SOCS4* de acuerdo a los tratamientos**

Cuantificación relativa de la expresión de *SOCS4* con respecto al tratamiento con IFN-β y AG. Se grafica el valor de  $2^{-\Delta\Delta CT \pm S}$  calculado entre los  $\Delta CT$  de los diferentes grupos de estudio, expresado como veces de incremento de ARN respecto al control. La transcripción de *SOCS4* fue de  $0.9498 \pm 0.20$  para IFN-β y  $1.1603 \pm 0.22$  para AG.



**Figura 28. Nivel de transcripción de *SOCS6* de acuerdo a los tratamientos**

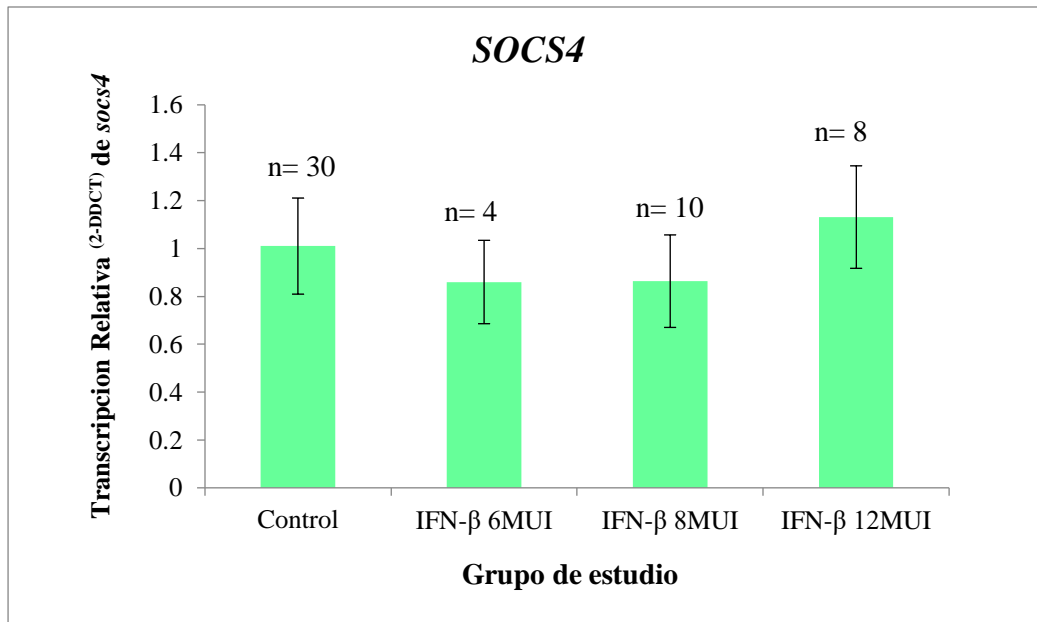
Cuantificación relativa de la expresión de *SOCS6* con respecto al tratamiento con IFN-β y AG. Se grafica el valor de  $2^{-\Delta\Delta CT \pm S}$  calculado entre los  $\Delta CT$  de los diferentes grupos de estudio, expresado como veces de incremento de ARN respecto al control. La transcripción de *SOCS6* fue de  $1.0605 \pm 0.20$  para IFN-β y  $0.7782 \pm 0.15$  para AG.

#### **4.9 Análisis del nivel de la transcripción de *SOCS4* y *SOCS6* en relación a la dosis d IFN-β**

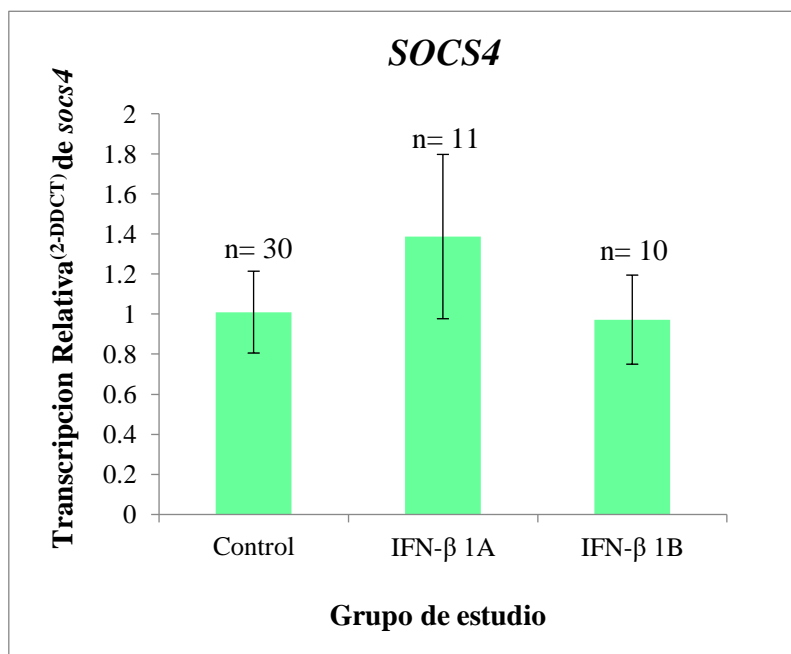
Los pacientes son tratados con tres diferentes dosis de IFN-β; 6, 8 y 12 MUI, la primera y la tercera dosis corresponden a un IFN-β tipo 1A y la segunda dosis es un IFN-β tipo 1B.

Se agruparon a los pacientes de acuerdo a las tres dosis de IFN-β (6, 8 y 12 MUI); para la transcripción de *SOCS4* fue de  $0.859824 \pm 0.17$ ,  $0.863304 \pm 0.19$ ,  $1.131070 \pm 0.21$ , respectivamente (Figura 29), se encontró una disminución de la transcripción en las dosis de 6 y 8 MUI y un incremento en la dosis de 12 MUI ( $p=0.4$ ,  $p=0.2$ , y  $p=0.8$ , respectivamente). Para los tipos de IFN-β se obtuvo una mayor transcripción, de  $1.3869 \pm 0.41$  para IFN 1a, respecto al tipo 1B de  $0.9724 \pm 0.22$ , no hubo diferencia significativa entre ambos tipos de IFN-β ( $p=0.7$ ) ni con respecto al control ( $p=0.5$ ) (figura 30).

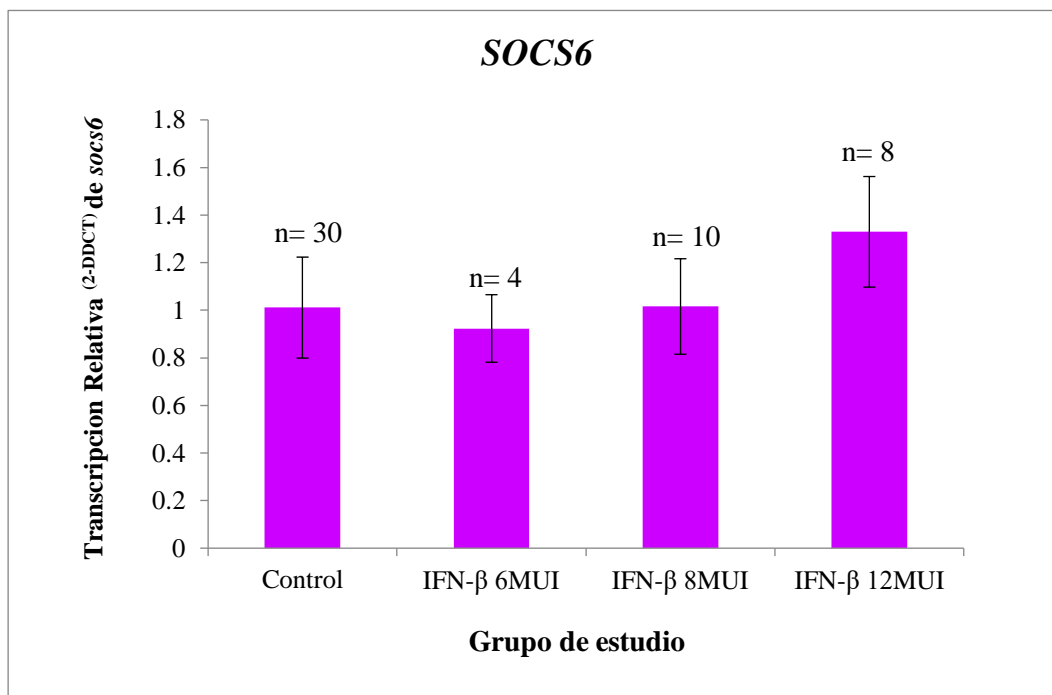
La transcripción de *SOCS6* para las tres dosis de IFN-β (6, 8 y 12 MUI), fue de  $0.9233 \pm 0.14$ ,  $1.0157 \pm 0.20$  y  $1.3296 \pm 0.23$  respectivamente (figura 31), no se presentó diferencia significativa entre las tres dosis ( $p=0.7$ ), ni con respecto al control ( $p=0.6$ ,  $p=0.9$ , y  $p=0.5$ , respectivamente). Para los tipos de IFN-β se obtuvo una transcripción de  $1.1644 \pm 0.19$  para 1A y para 1B de  $1.0157 \pm 0.20$ , no hubo diferencia significativa entre ambos tipos de IFN-β ( $p=0.9$ ) ni con respecto al control ( $p=0.9$ ) (figura 32)



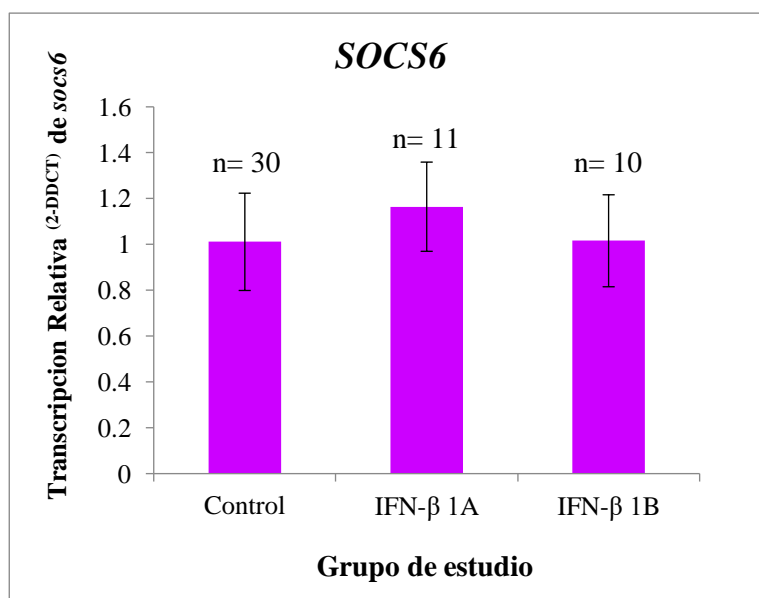
**Figura 29. Nivel de transcripción de *SOCS4* de acuerdo al tratamiento de IFN-β**  
 Cuantificación relativa de la expresión de *SOCS4* con respecto a la dosis de IFN-β (6, 8 y 12 MUI). Se gráfica el valor de  $2^{-\Delta\Delta CT \pm S}$  calculado entre los  $\Delta CT$  de los diferentes grupos de estudio, expresado como veces de incremento de ARN respecto al control. La transcripción de *SOCS4* respecto a la dosis fue de  $0.859824 \pm 0.17$ ,  $0.863304 \pm 0.19$ , y  $1.131070 \pm 0.21$ .



**Figura 30. Nivel de transcripción de *SOCS4* de acuerdo al tipo de IFN-β**  
 Cuantificación relativa de la expresión de *socs4* con respecto a los tipos de IFN-β (1A y 1B). Se grafica del valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$  calculado entre los  $\Delta CT$  de los diferentes grupos de estudio expresado como veces de incremento de ARN respecto al grupo control. La transcripción de *SOCS4* respecto a los tipos fue de  $1.3869 \pm 0.41$  y  $0.9724 \pm 0.22$ .



**Figura 31. Nivel de transcripción de *SOCS6* de acuerdo las dosis de IFN-β**  
 Cuantificación relativa de la expresión de *socs6* con respecto a la dosis de IFN-β (6, 8 y 12 MUI). Se gráfica el valor de  $2^{-\Delta\Delta CT \pm S}$  calculado entre los  $\Delta CT$  de los diferentes grupos de estudio, expresado como veces de incremento de ARN respecto al control. La transcripción de *SOCS4* respecto a la dosis fue de  $0.859824 \pm 0.17$ ,  $0.863304 \pm 0.19$ , y  $1.131070 \pm 0.21$ .



**Figura 32. Nivel de transcripción de *SOCS6* de acuerdo a los tipos de IFN-β**  
 Cuantificación relativa de la expresión de *SOCS6* con respecto a los tipos de IFN-β (1A y 1B). Se grafica del valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$  calculado entre los  $\Delta CT$  de los diferentes grupos de estudio, expresado como veces de incremento de ARN respecto al grupo control. La transcripción de *SOCS6* respecto a los tipos fue de  $1.1644 \pm 0.19$  y  $1.0157 \pm 0.20$ .

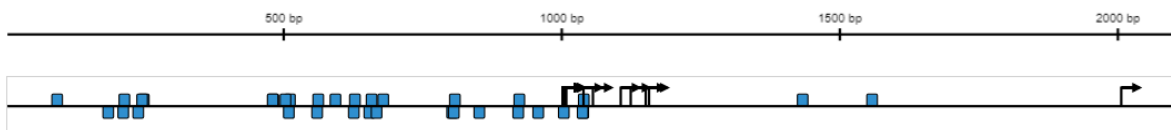
#### **4.10 Correlación de la progresión de la enfermedad con la transcripción de los genes *SOCS4* y *SOCS6***

Un análisis de correlación de Spearman fue aplicado entre el nivel de transcripción de los genes *SOCS4/SOCS6* ( $\Delta$ CT) y la actividad de la enfermedad (EDSS). Para *SOCS4* se obtuvo un  $R=0.3$  y una  $p=0.7$  y para *SOCS6* un  $R= -0.2$  y una  $P=0.79$ , por lo que se encontró una correlación negativa débil y no significativa entre la progresión de la enfermedad (EDSS) y la transcripción de ambos genes. El promedio de EDSS, en los pacientes con EM fue de  $2.76\pm 1.25$ , en pacientes del género femenino fue de  $2.84\pm 1.19$ , y del género masculino fue de  $2.69\pm 1.29$ . En pacientes tratados con IFN- $\beta$  fue de  $3.7\pm 5.1$  y con AG de  $3.37\pm 1.45$ .

Posteriormente se realizó el análisis para corroborar si hay una correlación entre la transcripción de los genes de estudio *SOCS4/SOCS6* en el grupo control y en el grupo con EM, se realizó un análisis de correlación, donde se encontró una  $R=-0.1$  y una  $p=0.5$ , y se obtuvo con estos resultados correlación negativa débil y no significativa.

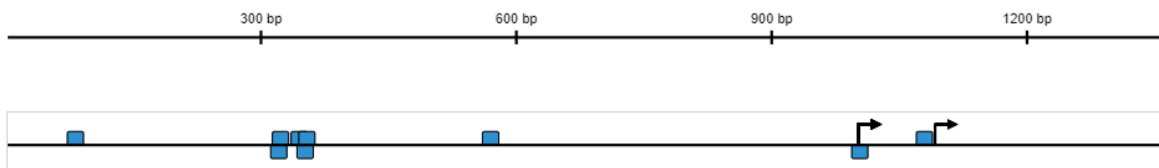
#### 4.11 Identificación *in silico* de los factores de transcripción del promotor de los genes *SOCS4* y *SOCS6*

El análisis de los promotores de los genes *SOCS4* y *SOCS6* consistió en encontrar secuencias o sitios de unión a factores de transcripción, principalmente se enfocó en los sitios de unión a STAT. Se analizó primero el gen *SOCS4*, se identificaron 32 sitios de unión a STAT1 (Figura 33). Para el gen *SOCS6* se identificaron 9 sitios de unión a STAT6 (Figura 34)



**Figura 33. Sitios de unión a factor de transcripción al promotor del gen *SOCS4***

Sitios de unión al factor de transcripción STAT1 dentro de 2000 pb río arriba del sitio del inicio de transcripción del gen *SOCS4*.

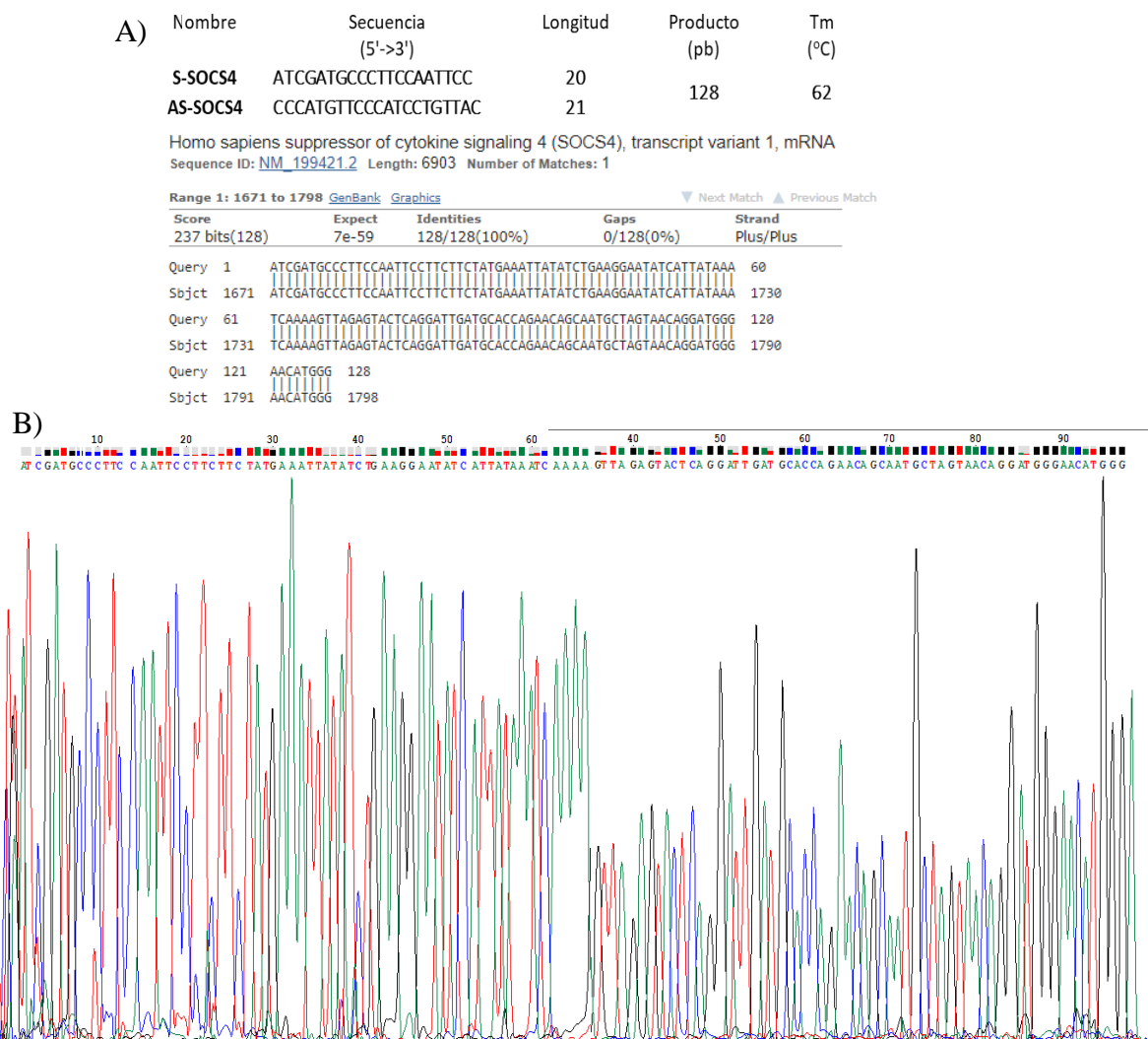


**Figura 34. Sitios de unión a factor de transcripción al promotor del gen *SOCS6***

Sitios de unión al factor de transcripción STAT6 dentro de 2000 pb río arriba del sitio del inicio de transcripción del gen *SOCS6*.

## 4.12 Secuenciación de los productos amplificados por qRT-PCR en tiempo real de los genes *SOCS4* y *SOCS6*

Se realizó un análisis de secuenciación por el método de Sanger a los productos de *SOCS4* y *SOCS6*, estos productos fueron tomados del análisis por qRT-PCR en tiempo real de muestras de pacientes con EM. Después de obtener la secuencia se realizó un alineamiento en BLAST, donde se muestra que los productos amplificados corresponden a la región amplificada del ARNm para *SOCS4* de 128 pb (Figura 35) y para *SOCS6* de 123 pb (Figura 36).



**Figura 35. Resultados de secuenciación del gen *SOCS4***

Análisis de secuenciación de *SOCS4*. A) Alineamiento de la secuencia obtenida B) Cromatograma

A)

Nombre	Secuencia (5'→3')	Longitud	Producto (pb)	Tm (°C)
S-SOCS6	TTGATCCGAACTCTGCTCCT	20	123	62
AS-SOCS6	CCCAGTACCATCCTTGCTTTG	21		

Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 6 (SOCS6), mRNA  
Sequence ID: [NM\\_004232.4](#) Length: 5703 Number of Matches: 1

Range 1: 1209 to 1331 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
228 bits(123)	5e-56	123/123(100%)	0/123(0%)	Plus/Plus

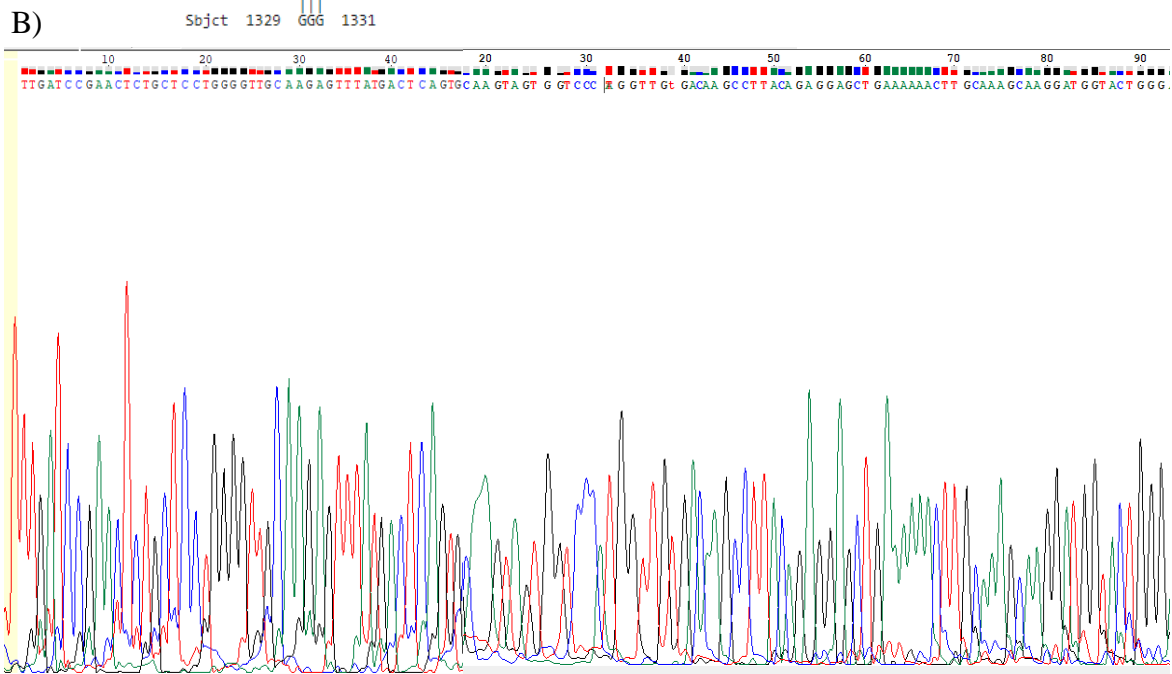
```

Query 1      TTGATCCGAACTCTGCTCCTGGGGTTGCAAGAGTTTATGACTCAGTGCAAAGTAGTGGTC 60
Sbjct 1209   TTGATCCGAACTCTGCTCCTGGGGTTGCAAGAGTTTATGACTCAGTGCAAAGTAGTGGTC 1268

Query 61     CCATGGTTGTGACAAGCCTTACAGAGGAGCTGAAAAAATTGCAAAGCAAGGATGGTACT 120
Sbjct 1269   CCATGGTTGTGACAAGCCTTACAGAGGAGCTGAAAAAATTGCAAAGCAAGGATGGTACT 1328

Query 121    GGG 123
Sbjct 1329   GGG 1331

```



**Figura 36. Resultados de secuenciación del gen *SOCS6***  
Análisis de secuenciación de *SOCS6*. A) Alineamiento de la secuencia obtenida B) Cromatograma

## DISCUSIÓN

La EM es una enfermedad inflamatoria crónica progresiva del SNC, de etiología multifactorial, en la cual la respuesta autoinmune contra las proteínas de mielina del SNC conduce a una respuesta inflamatoria crónica, activada por citocinas proinflamatorias como: IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-21, IL-23, IL-27, e IFN- $\gamma$ , las cuales activan la vía de señalización JAK-STAT, y son regulados negativamente por las proteínas SOCS (Liu, Y., et al. 2015).

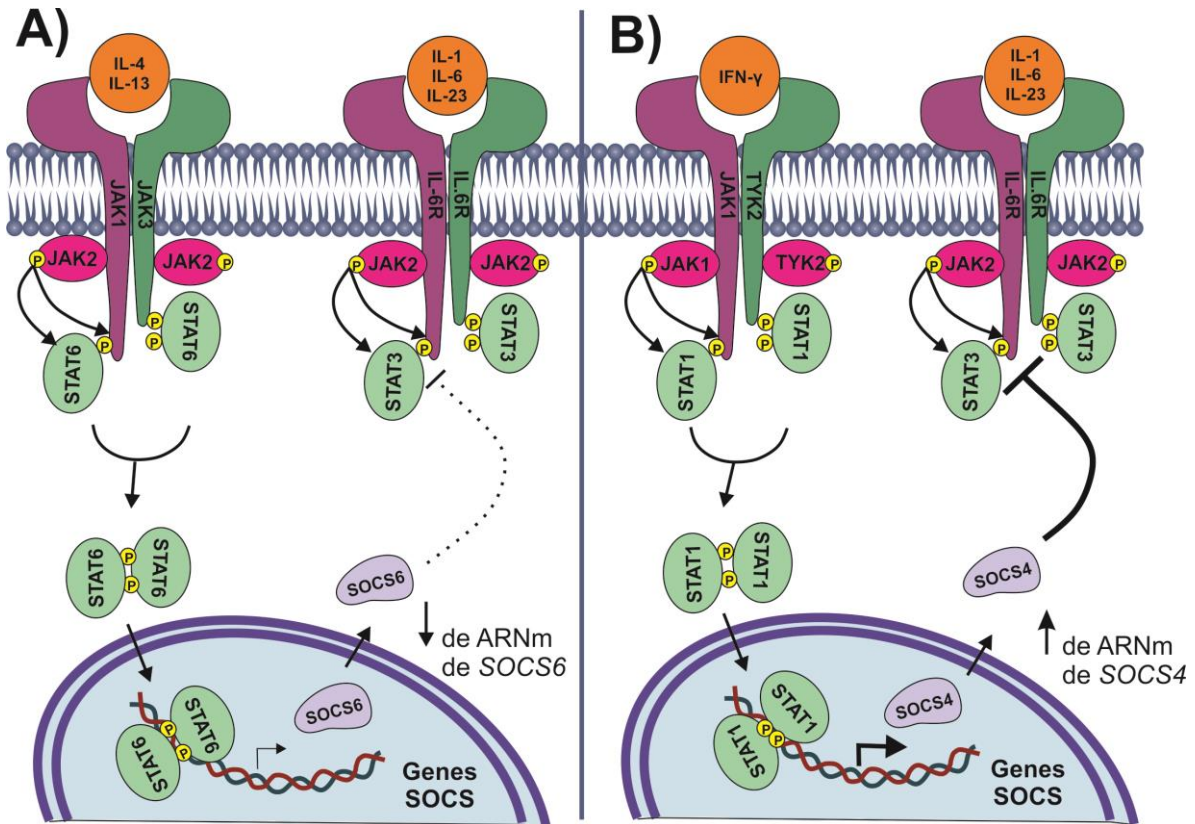
Esta investigación se enfocó en el estudio de los niveles de transcripción de *SOCS4* y *SOCS6* por PCR en tiempo real en pacientes con EM en etapa remitente recurrente (RR), en el cual no encontramos cambio significativo en la transcripción de ambos genes en pacientes con EM en comparación con el grupo control, otros artículos (Toghi et al., 2017) han medidos algunos de los miembros de la familia SOCS, sin embargo no se han reportado resultados referentes a *SOCS4* y *SOCS6*, diversos estudios han demostrado que *SOCS4* puede inhibir la señalización temprana de IL-1 $\beta$ , y de IL-6, (Ren, S., et al. 2019), ya que al inhibir la activación de STAT3 impide la fosforilación y por lo tanto se bloquea la señalización de estas citocinas (Sasi, W., et al. 2014), no hay reportes sobre cuales factores de transcripción regulan la expresión de *SOCS4*, en el análisis *in silico* encontramos sitios de unión para STAT1. Para *SOCS6* se conoce que inhibe la activación de STAT3 (Rontauroli, S., et al. 2017) y STAT5 es un factor de transcripción para su propia expresión (Gupta, S., et al. 2011), en nuestros resultados sobre el análisis del promotor encontramos sitios de unión para STAT6, por lo que podríamos inferir que interleucinas como IL-4 e IL-13 que activan STAT6 (Benveniste et al., 2014), promueven indirectamente la transcripción de *SOCS6*.

La EM es una enfermedad que afecta a mujeres en mayor proporción (Bove, R. 2016), en nuestro grupo de estudio, el 63% correspondió a éste género, además encontramos una menor transcripción de *SOCS4* y de *SOCS6* en este género, respecto a los hombres, mientras en el grupo de personas sanas, no hubo diferencia en el transcrito en cuanto a géneros, por lo que sería importante la información del nivel del transcrito al momento de realizar pruebas confirmatorias de la enfermedad, cabe destacar que no se ha reportado ésta medición por géneros.

Los fármacos de primera línea que se utilizan como tratamiento son los inmunomoduladores IFN- $\beta$  y AG, en nuestro estudio se analizó a pacientes con EM que estaban siendo tratados con cualquiera de éstos tratamientos; en *SOCS4* los pacientes tratados

con AG tuvieron una transcripción incrementada respecto al grupo control y al grupo tratado con IFN- $\beta$ . De acuerdo al esquema de tratamiento de los pacientes, el AG se administra posterior a la falta de respuesta con IFN- $\beta$ , a lo que podríamos inferir que el aumento del transcrito de *SOCS4* podría aumentar la inhibición negativa de STAT3, la cual es activada por citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23. Respecto a las dosis de IFN- $\beta$  ocurre algo similar en cuanto a la dosis de 12 MUI, ya que de acuerdo al esquema de tratamiento, esta dosis se administra por la falta de respuesta de las dosis previas (6 y 8 MUI), de la misma forma hay un aumento del transcrito de *SOCS4* en pacientes tratados con IFN- $\beta$  1A. En contraste para *SOCS6*, en los pacientes tratados con AG hay una menor transcripción, se ha documentado que *socs6* inhibe la señalización de IL-6 e IL-23, las cuales participan en la fisiopatología de la EM (Rontauoli, S. et al., 2017). Para el caso de las dosis de IFN- $\beta$ , en pacientes tratados con la dosis más alta, de 12 MUI mostraron un incremento del transcrito de *SOCS6*, de la misma forma para pacientes tratados con IFN- $\beta$  1A. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos inferir que los tratamientos más eficaces son IFN- $\beta$  12 MUI, IFN- $\beta$  1A y AG, ya que por una parte el EDSS es menor y en cuanto a la transcripción restablecen e incluso superan los niveles normales del transcrito de *SOCS4* en comparación con pacientes tratados con IFN- $\beta$  6 y 8 MUI, de igual forma, para *SOCS6* los tratamientos de IFN- $\beta$  12 MUI e IFN- $\beta$  1A reestablecen e incluso superan los niveles normales del transcrito en comparación con pacientes tratados con IFN- $\beta$  6 y 8 MUI, pero respecto a AG hay una disminución del transcrito de *SOCS6*, y esto puede estar relacionado con el mecanismo de acción de AG, ya que suprime significativamente la activación de STAT1 y STAT3, lo que afecta la activación de las células T (Ahn, Y. H., et al. 2017). Teniendo en cuenta esta información y nuestros resultados hicimos un modelo del papel que tienen *SOCS4* y *SOCS6* en los tratamientos de la EM (Figura 37).

Cabe destacar que ya se han hecho estudios de la participación de los SOCS en pacientes con EM (Sedeño Monge, et al. 2014 y Toghi, M., et al. 2017), por lo que nuestro estudio agrega la medición de los miembros de la familia SOCS, *SOCS4* y *SOCS6*.



**Figura 37. Modelo hipotético de la regulación negativa de SOCS4 y SOCS6 en la señalización de interleucinas en pacientes con EM tratados con AG**

A) En nuestros resultados encontramos una menor transcripción de *SOCS6*, este es regulado por STAT6 que a su vez es activado por IL-4 e IL-13; la menor transcripción de *SOCS6* podría expresar la menor inhibición de interleucinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 e IL-23. B) Por otra parte, encontramos una mayor transcripción de *SOCS4*, cuya transcripción es regulada por STAT1, el cual es activado por IFN- $\gamma$ ; *SOCS4* inhibe la señalización de IL-1, IL-6 e IL-23. En este último podemos inferir que la mayor transcripción de *SOCS4* es debida a mayores niveles de IFN- $\gamma$ . Abreviaturas:  $\downarrow$  disminución,  $\uparrow$  aumento,  $\top$  inhibición,  $\blacktriangleright$  mayor transcripción,  $\blacktriangleleft$  menor transcripción.

## CAPITULO V

### V. CONCLUSIONES

1. La transcripción de *SOCS4* y *SOCS6* en pacientes con EM del género femenino se encontró disminuida en comparación con el grupo de pacientes con EM del género masculino.
2. La transcripción de *SOCS4* se encontró incrementada en pacientes tratados con AG, INF- $\beta$  12 MUI e IFN- $\beta$  1A comparados con pacientes tratados con IFN- $\beta$  6 y 8 MUI, con lo que se infiere que dichos tratamientos restablece los niveles de los transcritos de *SOCS4*.
3. La transcripción de *SOCS6* se encuentra disminuida en pacientes con AG, mientras que hay un incremento de los transcritos de *SOCS6* en pacientes tratados con IFN- $\beta$  12 MUI e IFN- $\beta$  1A, lo que infiere que estos tratamientos restablecen los niveles de los transcritos de *SOCS6*.
4. El promotor para *SOCS4* contiene tantos sitios de unión a STAT1 y para *SOCS6* es STAT6.

## VI. ANEXOS

### 6.1 Carta de consentimiento informado

<b>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLINICA</b>
<b>Lugar y Fecha:</b>  
<b>Por medio del presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:</b> <b>“Análisis de la transcripción de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple”.</b> Tiene por objetivo investigar la participación de los genes <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> en el proceso fisiopatológico de la esclerosis múltiple a través de la cuantificación de la transcripción de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> en leucocitos de sangre periférica.  _____
<b>Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número:</b> (Dirección _____ de _____ Investigación, _____ UPAEP) :
<b>El objetivo del estudio es:</b> <u>Cuantificar la transcripción de <i>SOCS4</i> y <i>SOCS6</i> por qRT-PCR en tiempo real en ARN de leucocitos de sangre periférica.</u>
<b>Se me ha explicado que mi participación consistirá en:</b> <u>Donar una muestra de sangre periférica.</u>
<b>Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:</b> <u>Ninguno</u>

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

\_\_\_\_\_

**Nombre y firma del paciente**

\_\_\_\_\_

**Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable**

**Testigo**

\_\_\_\_\_

**Nombre, firma**

**Testigo**

\_\_\_\_\_

**Nombre, firma**

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: \_\_\_\_\_

## 6.2 Hoja de recolección de datos

### Datos Personales del Paciente

Nombre:		Número de Folio:		
Sexo:	Masculino <input type="checkbox"/>	Femenino <input type="checkbox"/>	Fecha:	
Dirección:			Edad:	
Localidad:			Teléfono:	
No. Seg. Social:			Celular:	
Ocupación:				

### Datos para el protocolo

Fecha de diagnóstico:			
Tratamiento anterior:		Dosis:	
Tratamiento actual:		Dosis:	
Observaciones sobre el tratamiento(s):			

### Datos del familiar o tutor responsable

Nombre:		Parentesco:		
Sexo:	Masculino <input type="checkbox"/>	Femenino <input type="checkbox"/>	Ocupación:	
Dirección:			Edad:	
Localidad:			Teléfono:	
			Celular:	

### Observaciones

--

\_\_\_\_\_  
Firma del Paciente o Familiar

### 6.3 Solución de lisis de eritrocitos

**Tabla 4. Tabla de preparación de solución de lisis de eritrocitos**

<i>REACTIVO</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>CANTIDAD PARA 1L</i>
<i>NH<sub>4</sub>Cl</i>	0.15 M	8.29g
<i>KHCO<sub>3</sub></i>	10 mM	1.0g
<i>Na<sub>2</sub>EDTA</i>	0.1 mM	37.2 mg

Con ayuda de un matraz aforado, disuelva en 1000 ml de agua destilada y filtre con ayuda de una bomba de vacío, finalmente esterilice a 15 lb por durante 15 minutos y guarde a 4°C en frasco o botella ámbar, perfectamente sellado.

### 6.4 Solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%

**Tabla 5. Tabla de preparación de NaCl al 0.9%**

<i>REACTIVO</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>CANTIDAD PARA 100 ml</i>
<i>NaCl</i>	0.9 %	0.9g

Con ayuda de un matraz aforado, disuelva en 100 ml de agua destilada el NaCl y homogenice bien, y guarde en frascos de vidrio, a 17°C.

### 6.5 Etanol al 75 %

**Tabla 6. Tabla de preparación de etanol al 75%**

<i>REACTIVO</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>	<i>CANTIDAD PARA 1L</i>
<i>Etanol</i>	Puro	750 ml
<i>Agua</i>	Destilada	250 ml

Una vez medidas las cantidades con ayuda de un matraz aforado, disuelva en 1000 ml de agua destilada, y guarde en frasco a 15 °C.

## 6.6 Buffer TAE y TBE

### 6.6.1 Buffer de corrida para electroforesis en gel de agarosa TAE 50x

Tabla 7. Tabla de preparación de TAE 10x para 1L

TAE 50x (Tris-Ac. Glacial-EDTA) Buffer para electroforesis

Reactivo	Concentración	Cantidad para 500 ml
Tris base	-	121.0 g
Ácido acético glacial	-	28.55 ml
EDTA	0.5 M pH= 8	50.0 ml

Primero prepare la solución de EDTA 0.5 M de preferencia 100 ml.

$$g = (PM) (L) (M)$$

PM EDTA: 372.24 g/mol

$$0.1L = 100ml$$

g EDTA =	372.24 g	0.1 L	0.5 mol	= 18.612gEDTA
	mol		L	

Se pesa y disuelve el EDTA con ayuda de un matraz aforado de 100 ml, y se lleva a un pH=8 con ayuda de NaCl o HCL

Se prepara 100 ml de **ácido clorhídrico 1M (1M HCl)** agregando 8.62 ml de HCl concentrado a 91 ml de H<sub>2</sub>O destilada, previamente colocados en un vaso de precipitados de 250 ml. ¡No agregar el agua al ácido! Mezcle en una plancha agitadora magnética durante 5 minutos. Afore a 100 ml con dH<sub>2</sub>O.

Prepare 100 ml de **hidróxido de sodio 10M (10M NaOH)** agregando 40 g de NaOH a 40 ml de H<sub>2</sub>O destilada previamente colocados en un vaso de precipitados de 250 ml. Mezcle con una barra magnética en una plancha agitadora hasta que el NaOH se haya disuelto por completo. Afore a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada. ¡Precaución, esta reacción es exotérmica!.

Una vez terminado el proceso de elaboración de TAE, se lleva a esterilizar a 10 lb por 10 min, para que esta solución rinda un poco más y no tarde en descomponerse.

## 6.6.2 Buffer de corrida para electroforesis en gel de agarosa TBE 10x

**Tabla 8. Tabla de preparación de TBE 1x para 1L**

*TBE 10x (Tris-Borato-EDTA) Buffer para electroforesis*

<i>Reactivo</i>	<b>Concentración final 1X</b>	<b>Cantidad para 1L</b>
<i>Tris Base</i>	89 mM	108 g
<i>Ácido Bórico</i>	89 mM	55 g
<i>0.5 M EDTA (pH 8.0)</i>	2 mM	40 ml
<i>Agua</i>		1000 ml

Para la preparación del buffer Tris-borato, es necesario la preparación de una solución de EDTA al 0.5 molar y un pH de 8.

Procedimiento:

1. Se realizaron los cálculos para la preparación de la solución de EDTA con 0.5 M

50mL	0.5M <sub>EDTA</sub>	372.24 g	= 9.306 g <sub>EDTA</sub>
	1000 ml	1 mol <sub>EDTA</sub>	

2. Para una solución de 50 ml, pesar 9.306 g<sub>EDTA</sub> y hacer una pre-disolución en un vaso de precipitado de 35 ml de agua destilada con 9.306 g<sub>EDTA</sub>.
3. Disolver la solución de EDTA con la ayuda de la parrilla y la barra magnética y agregar poco a poco el hidróxido de sodio, de 8 a 9 gotas.
4. Medir el pH cuando se está agregando el hidróxido, pH óptimo de la solución es de 8.
5. Aforar a 50 ml, agregar la pre-disolución a un matraz de aforo y completar el aforo a 50 ml.

**Nota:** El EDTA se empezara a disolver después que se ajuste el pH a 8. El tiempo de la solubilidad del EDTA es de aproximadamente 40 min después del ajustar el pH.

### Para la preparación de 1 litro de TBE 5X.

1. Realizar los cálculos para la disolución 5X.

#### TRIS

1000 ml	0.089 M <sub>TRIS</sub>	121.14g	=10.78146	5X	= 53.90 g
	1000 ml	1 mol <sub>TRIS</sub>			

#### Ácido bórico

1000ml	0.089M <sub>ac. Bórico</sub>	61.83 g	= 5.50287	5X	= 27.51435 g
	1000ml	1 mol <sub>ac. Bórico</sub>			

2. Pesar cada una de las sales
3. Realizar un pre disolución de cada una de estas.
4. Agregar cada una de las pre-disoluciones y agregar 800ml
5. Agregar 20 ml de solución de EDTA 0.5M
6. Aforar a un litro

NOTA: El buffer bien preparado tendrá un pH de 8.3 aproximadamente

#### Gel de agarosa al 1%

Normalmente una cámara de electroforesis usa un volumen de 30-45 ml de agarosa no es necesario preparar un volumen alto, para ello se disuelve con TAE o TBE:

Para un gel de agarosa 1% (g)	1g de Agarosa	V. estándar	30 ml	= 0.3g de agarosa
	V. estándar	100 ml	V. a preparar	

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, Y. H., Jeon, S. B., Chang, C. Y., Goh, E. A., Kim, S. S., Kim, H. J., ... & Park, E. J. (2017). Glatiramer acetate attenuates the activation of CD4+ T cells by modulating STAT1 and- 3 signaling in glia. *Scientific reports*, 7, 40484.
- Alroughani, R., & Yamout, B. (2018). Multiple Sclerosis. *Seminars in Neurology*, 38(02), 212–225.
- Álvarez, A. G., Lahoz, L. J., Blasco, J. B., Perez, V. C., & Calvelo, F. R. (2015). Nuevos tratamientos en la Esclerosis Múltiple. *Atalaya Médica Turolense*, (7), 15-21.
- Arts, P., Plantinga, T. S., van den Berg, J. M., Gilissen, C., Veltman, J. A., van Trotsenburg, A. S., ... & Netea, M. G. (2015). A missense mutation underlies defective SOCS 4 function in a family with autoimmunity. *Journal of internal medicine*, 278(2), 203-210.
- Avsar, T., Duras, İ. M., Uygunoğlu, U., Tütüncü, M., Demirci, N. O., Saip, S., & Turanlı, E. T. (2015). CSF proteomics identifies specific and shared pathways for multiple sclerosis clinical subtypes. *PloS one*, 10(5), e0122045.
- Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J., & Weiner, H. L. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*, 97(4), 742–768.
- Balza, E., Zanellato, S., Poggi, A., Reverberi, D., & Rubartelli, A. (2017). Suppressors of cytokine signaling: Potential immune checkpoint molecules for cancer immunotherapy.
- Benveniste, E. N., Liu, Y., McFarland, B. C., & Qin, H. (2014). Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(8), 577-588.
- Bermudez-Morales, V., Hernández-Girón, C., Flores, J., González-Carranza, A., Marina, V. M., Flores-Aldana, M., & Corona, T. (2016). Relación de infección por virus de Epstein-Barr (EBV) en pacientes con esclerosis múltiple (EM), en México. *Neurología Argentina*, 8(2), 89-95.
- Bertado-Cortés, B., Villamil-Osorio, L., Carrera-Pineda, R., Martínez-Cortés, C., & Guerrero-Cantera, J. (2016). Características clínicas y demográficas de los pacientes

- con esclerosis múltiple. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(2), S186-S190.
- Bove, R. (2016, April). Women's issues in multiple sclerosis. In *Seminars in neurology* (Vol. 36, No. 02, pp. 154-162). Thieme Medical Publishers.
- Castillo-Álvarez, F., & Marzo-Sola, M. E. (2017). Papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la esclerosis múltiple. *Neurología*, 32(3), 175-184.
- Correale, J., Gaitán, M. I., Ysraelit, M. C., & Fiol, M. P. (2016). Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain*, 140(3), 527-546.
- Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M. E., de Courten, M., Matsoukas, J., & Apostolopoulos, V. (2017). Multiple sclerosis: immunopathology and treatment update. *Brain sciences*, 7(7), 78.
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545.
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis—a review. *European journal of neurology*, 26(1), 27-40.
- Faissner, S., Plemel, J. R., Gold, R., & Yong, V. W. (2019). Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Nature reviews. Drug discovery*.
- Fernández, O., Cuevas, C., Arcega, R., Núñez-Orozco, L., Carrasco-Vargas, H., Ordoñez-Boschetti, L., ... & Blaisdel, C. (2016). Esclerosis múltiple: situación actual y tendencias futuras. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 17(6), 3-22.
- Fernández, O., Fernández, V. E., & Guerrero, M. (2015). Esclerosis múltiple. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(77), 4610-4621.
- Feng, Y., Sanders, A. J., Ruge, F., Morris, C. A., Harding, K. G., & Jiang, W. G. (2016). Expression of the SOCS family in human chronic wound tissues: Potential implications for SOCS in chronic wound healing. *International journal of molecular medicine*, 38(5), 1349-1358.
- Feng, Y., Sanders, A. J., Morgan, L. D., Owen, S., Ruge, F., Harding, K. G., & Jiang, W. G. (2017). In vitro significance of SOCS-3 and SOCS-4 and potential mechanistic links to wound healing. *Scientific reports*, 7(1), 6715.

- Flores, L., Gabriel-Ortiz, G., Pacheco-Moisés, F. P., & Bitzer-Quintero, O. K. (2015). Mecanismos patogénicos en el desarrollo de la esclerosis múltiple: ambiente, genes, sistema inmune y estrés oxidativo. *Investigación Clínica*, 56(2), 201-214.
- Garg, N., & Smith, T. W. (2015). An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and behavior*, 5(9), e00362.
- Gracia, F., Parajeles Vindas, A., Panday, A., Guirado-Romero, A. E., Molina Klee, B., & Treviño-Frenk, I. (2017). Esclerosis múltiple en América Central y el Caribe: Estado actual y recomendaciones clínicas. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 18(1), 76-88.
- Guadarrama-Ortiz, Parménides, Regalado Guerra, Ximena, Castillo-Rangel, Carlos, & Ángeles-Castellanos, Manuel. (2014). Esclerosis múltiple: enfermedad neurológica de alto impacto social: de vuelta al antiguo tratamiento. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 57(6), 5-10.
- Guerrero-García, J. J. (2017). Participación de los astrocitos en la patogénesis de la esclerosis múltiple. *Neurología*.
- Gupta, S., Mishra, K., Surolia, A., & Banerjee, K. (2011). Suppressor of cytokine signalling-6 promotes neurite outgrowth via JAK2/STAT5-mediated signalling pathway, involving negative feedback inhibition. *PloS one*, 6(11), e26674.
- Hamid, K. M., Isiyaku, A., Kalgo, M. U., Yahaya, I. S., & Mirshafiey, A. (2017). JAK-STAT Lodges in multiple sclerosis: pathophysiology and therapeutic approach overview. *Open Access Library Journal*, 4(04), 1.
- Harrison, D. M. (2014). In the clinic. Multiple sclerosis. *Annals of internal medicine*, 160(7), ITC4.
- Hauser, S. L., Oksenberg, J. R., & Baranzini, S. E. (2015). Multiple Sclerosis. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*, 1001–1014.
- Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J., & Duschl, A. (2006). Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine & growth factor reviews*, 17(3), 173-188.
- Hollenbach, J. A., & Oksenberg, J. R. (2015). The immunogenetics of multiple sclerosis: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*, 64, 13-25.
- Howard, J., Trevick, S., & Younger, D. S. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurologic clinics*, 34(4), 919-939.

- Huamaní, C., Rojas, E., & Inca, J. (2017). Esclerosis múltiple de alta actividad:¿ se puede iniciar precozmente el tratamiento con drogas de alta eficacia?. *Acta Médica Peruana*, 34(4), 301-308.
- Jarmi, V., de Elías, R., Kiener, O., Villate, S., Vrech, C., & Barzón, S. (2015). Bandas oligoclonales: aporte e interpretación en pacientes con sospecha de esclerosis múltiple. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 49(2), 257-265.
- Kabir, N. N., Sun, J., Rönstrand, L., & Kazi, J. U. (2014). SOCS6 is a selective suppressor of receptor tyrosine kinase signaling. *Tumor Biology*, 35(11), 10581-10589.
- Kamm, C. P., Uitdehaag, B. M., & Polman, C. H. (2014). Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *European neurology*, 72(3-4), 132-141.
- Kaskow, B. J., & Baecher-Allan, C. (2018). Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(4).
- Katsara, M., & Apostolopoulos, V. (2018). Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Therapeutics. *Medicinal Chemistry*, 14(2), 104-105.
- Kedzierski, L., Clemens, E. B., Bird, N. L., Kile, B. T., Belz, G. T., Nicola, N. A., ... & Nicholson, S. E. (2015). SOCS4 is dispensable for an efficient recall response to influenza despite being required for primary immunity. *Immunology and cell biology*, 93(10), 909-913.
- Kobayashi, D., Nomoto, S., Kodera, Y. et al. *World J Surg* (2012). Suppressor of Cytokine Signaling 4 Detected as a Novel Gastric Cancer Suppressor Gene using Double Combination Array Analysis. *World Journal of Surgery*. 6: 362.
- Lassmann, H. (2018). Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis. *Frontiers in immunology*, 9.
- Lee, M., & Rhee, I. (2017). Cytokine signaling in tumor progression. *Immune network*, 17(4), 214-227.
- Liang, Y., Xu, W.-D., Peng, H., Pan, H.-F., & Ye, D.-Q. (2014). SOCS signaling in autoimmune diseases: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *European Journal of Immunology*, 44(5), 1265–1275. doi:10.1002/eji.201344369
- Lin, H. Y., Lai, R. H., Lin, S. T., Lin, R. C., Wang, M. J., Lin, C. C., ... & Chen, J. Y. (2013). Suppressor of cytokine signaling 6 (SOCS6) promotes mitochondrial fission via regulating DRP1 translocation. *Cell death and differentiation*, 20(1), 139.

- Liu, Y., Gibson, S. A., Benveniste, E. N., & Qin, H. (2015). Opportunities for translation from the bench: therapeutic intervention of the JAK/STAT pathway in neuroinflammatory diseases. *Critical Reviews™ in Immunology*, 35(6).
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Martins, T. B., Rose, J. W., Jaskowski, T. D., Wilson, A. R., Husebye, D., Seraj, H. S., & Hill, H. R. (2011). Analysis of Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokine Serum Concentrations in Patients With Multiple Sclerosis by Using a Multiplexed Immunoassay. *American Journal of Clinical Pathology*, 136(5), 696-704.
- Martinez-Altarriba, M. C., Ramos-Campoy, O., Luna-Calcaño, I. M., & Arrieta-Antón, E. (2015). Revisión de la Esclerosis Múltiple (1). A propósito de un caso. *SEMERGEN-Medicina de Familia*, 41(5), 261-26
- Margarit, B. P., Monteiro, G. C., Herán, I. S., Delgado, F. R., & Izquierdo, A. Y. (2019). Esclerosis múltiple. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(78), 4587-4597.
- Matías-Guiu, J., Gomez-Pinedo, U., & Matias-Guiu, J. A. (2017). Novedades en esclerosis múltiple: la remielinización como objetivo terapéutico. *Med Clin (Barc)*, 148(8).
- McCarthy, C., & Thorpe, J. (2016). Some recent advances in multiple sclerosis. *Journal of neurology*, 263(9), 1880-1886.
- Meca Lallana, J. E. (2017). Efecto del acetato de glatirámero sobre la espasticidad en esclerosis múltiple recurrente remitente. Universidad Católica de Murcia, España.
- Moreno Moya, L & Herrero González, J.F (2016) Esclerosis Múltiple. Manifestaciones clínicas, Diagnóstico, Tratamiento y Estudio poblacional (Tesis de grado) Universidad de Alcalá, España.
- Morris, R., Kershaw, N. J., & Babon, J. J. (2018). The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Science*, 27(12), 1984-2009.
- Oh, J., Vidal-Jordana, A., & Montalban, X. (2018). Multiple sclerosis: clinical aspects. *Current opinion in neurology*, 31(6), 752-759.
- O'Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual review of medicine*, 66, 311-328.

- Quintana, Francisco J, Pérez-Sánchez, Soledad, & Farez, Mauricio F. (2014). Inmunopatología de la esclerosis múltiple. *Medicina (Buenos Aires)*, 74(5), 404-410.
- Ransohoff, R. M., Hafler, D. A., & Lucchinetti, C. F. (2015). Multiple sclerosis—a quiet revolution. *Nature Reviews Neurology*, 11(3), 134.
- Ren, S., Chen, X., Huang, R., Zhou, G. G., & Yuan, Z. (2019). SOCS4 expressed by recombinant HSV protects against cytokine storm in a mouse model. *Oncology reports*, 41(3), 1509-1520.
- Rivera, V. M., Tulio Medina, M., Duron, R. M., & Macias, M. A. (2014). Multiple sclerosis care in Latin America. *Neurology*, 82(18), 1660–1661.
- Rontauroli, S., Norfo, R., Pennucci, V., Zini, R., Ruberti, S., Bianchi, E., ... & Guglielmelli, P. (2017). miR-494-3p overexpression promotes megakaryocytopoiesis in primary myelofibrosis hematopoietic stem/progenitor cells by targeting SOCS6. *Oncotarget*, 8(13), 21380.
- Sánchez, M. D., & Hernández, M. J. (2016). Tratamiento de las enfermedades desmielinizantes. *Esclerosis múltiple. Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(23), 1337-1349.
- Sand, I. K. (2015). Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*, 28(3), 193-205.
- Sasi, W., Sharma, A. K., & Mokbel, K. (2014). The role of suppressors of cytokine signalling in human neoplasms. *Molecular biology international*, 2014.
- Sedeño-Monge, V., Arcega-Revilla, R., Rojas-Morales, E., Santos-López, G., Perez-García, J. C., Sosa-Jurado, F., ... & Reyes-Leyva, J. (2014). Quantitative analysis of the suppressors of cytokine signaling 1 and 3 in peripheral blood leukocytes of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 273(1-2), 117-119.
- Seif, F., Khoshmirasafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., & Bahar, M. (2017). The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Communication and Signaling*, 15(1), 23.
- Sun, Z., Liu, Q., Hong, H., Zhang, H., & Zhang, T. (2018). miR-19 promotes osteosarcoma progression by targeting SOCS6. *Biochemical and biophysical research communications*, 495(1), 1363-1369.

- Thomas, S. J., Snowden, J. A., Zeidler, M. P., & Danson, S. J. (2015). The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *British journal of cancer*, 113(3), 365.
- Toghi, M., Taheri, M., Arsang-Jang, S., Ohadi, M., Mirfakhraie, R., Mazdeh, M., & Sayad, A. (2017). SOCS gene family expression profile in the blood of multiple sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences*, 375, 481-485.
- Toro, J., Reyes, S. & Zamora, A. (2014). Controversias en Neurología: Esclerosis Múltiple. *Acta Neurol Colomb*, Vol. 30 No. 1, 32-48.
- Villarino, A. V., Kanno, Y., Ferdinand, J. R., & O'Shea, J. J. (2015). Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *The Journal of Immunology*, 194(1), 21-27.
- Walid Sasi, Anup K. Sharma, and Kefah Mokbel, "The Role of Suppressors of Cytokine Signalling in Human Neoplasms," *Molecular Biology International*, vol. 2014, Article ID 630797, 24 pages, 2014.
- Walker, D. G., Whetzel, A. M., & Lue, L. F. (2015). Expression of suppressor of cytokine signaling genes in human elderly and Alzheimer's disease brains and human microglia. *Neuroscience*, 302, 121-137.
- Yan, Z., Gibson, S. A., Buckley, J. A., Qin, H., & Benveniste, E. N. (2018). Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clinical Immunology*, 189, 4-13.
- Zhou, D., Chen, L., Yang, K., Jiang, H, Xu, W., Luan, J.. (2017). SOCS molecules: the growing players in macrophage polarization and function. *Oncotarget*, 8, 60710-60722.