



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Alteración en la fosforilación de STAT-1 α en macrófagos
alternativamente activados en respuesta al estímulo con IFN- γ ”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

Presenta:

MIREYA BECERRA DÍAZ

ASESOR: Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mis padres, la Sra. Mirella Díaz Esquivel y el Sr. Fausto Becerra Ariza, por ser mi apoyo, por brindarme siempre a pesar de la distancia el amor y la comprensión que me hicieron posible concluir la carrera.

Papi, Mami, sin ustedes pocas de las cosas buenas en mi vida habrían sido posibles, ustedes han sido mi mayor orgullo, mis mejores ejemplos y mi principal impulso, es por eso que cada uno de mis logros siempre se los dedicaré a ustedes.

A mis hermanos Isaac e Iván, que siempre me han dado ánimos y brindado su cariño; con quienes he compartido tantas cosas y a quienes quiero tanto.

A mis tíos la Sr. Estela y el Sr. Pedro y a mis primos Omar y Alan, quienes me aceptaron como parte de su familia durante estos últimos años, gracias por su apoyo y comprensión.

Agradecimientos

A mis padres la Sra. Mirella y el Sr. Fausto y a mis hermanos Iván e Isaac, por tantas cosas en que me han ayudado, por tantas cosas compartidas y por aquellas que aún nos falta vivir.

A mis tíos Pedro y Estela. A mis primos Omar, Alan y Pepe porque me soportaron y escucharon durante toda la carrera. A mis abuelos Malco y Elvira y a mi demás familia por siempre darme ánimos y brindarme su cariño y apoyo.

A mis amigos de toda la vida: Maria Luisa, Araceli, Lupe, Elizabeth, Denisse, Jhonatan, Fernando, Christian y Toño, porque nuestra amistad siempre ha sido un gran apoyo para mí, por darme siempre su confianza, por estar conmigo desde hace tanto.

A mis amigos de la universidad: Jorge, José, Mich, Puga, Pilar, Carmen, Yusvi, Miguelito, Franchini, Marduck y Lorena, por haber compartido tantas cosas, tantos trabajos y tantos momentos agradables.

Al Dr. Luis I. Terrazas, por aceptarme en su equipo de trabajo, por ser mi tutor en este trabajo de tesis, por su apoyo y confianza.

A mis amigos y compañeros en la UBIMED: Maribel, Neto, Erika, Laura, Laura V., Aaxin, Arlett, Rubí, Emmanuel, José Luis, Edith, César, Alicia e Irma, porque todos me ayudaron y de todos aprendí muchas cosas.

A las doctoras Miriam y Elisa, gracias por sus consejos y enseñanzas. Al los doctores Maximiliano y Florencio, quienes me facilitaron amablemente conocer la UBIMED.

ÍNDICE GENERAL

1. Abreviaturas	5
2. Introducción	9
3. Generalidades	12
3.1. La respuesta inmunitaria	12
3.1.1. La respuesta inmunitaria innata	12
3.1.2. La respuesta inmunitaria adaptativa	16
3.1.3. Las citocinas	17
3.1.3.1. Citocinas proinflamatorias	18
3.1.3.2. Citocinas antiinflamatorias	24
3.2. Los macrófagos	26
3.3. Activación de los macrófagos	29
3.3.1. Activación clásica de los macrófagos	32
3.3.2. Activación alternativa de los macrófagos	34
3.3.3. aaMφ en infecciones con protozoarios	37
3.3.4. aaMφ en infecciones con helmintos	39
4. Hipótesis	42
4.1 Hipótesis nula	42
5. Objetivos	42
5.1 Objetivo general	42
5.2 Objetivos particulares	42
6. Material y métodos	43
6.1. La infección	43
6.2. Obtención de células peritoneales	43
6.3. Citometría de flujo	44
6.4. ELISA y RT-PCR	44
6.5 Determinación de citocinas. Método de ELISA sandwich	45
6.6. RT-PCR	46
6.7. Western Blot (Inmunoelectro Transferencia)	46
6.7.1. Obtención de proteínas	46

6.7.2. Electroforesis de las proteínas	47
6.7.3 Transferencia y bloqueo	47
6.7.4. Inmunodetección	48
7. Resultados	49
7.1 Amplificación del gen del Receptor de Manosa (MMR). Reacción en cadena de la polimerasa, Transcriptasa Reversa (RT-PCR)	49
7.2 Expresión de moléculas coestimuladoras utilizadas como marcadores de activación alternativa y receptores involucrados en la respuesta proinflamatoria. Citometría de Flujo.	50
7.3 La infección con <i>T. crassiceps</i> inhibe la producción de IL-12 en los M ϕ estimulados con LPS e IFN- γ . ELISA.	58
7.4 Análisis de la fosforilación de la proteína STAT-1 α . Western Blot (Inmunoelectro transferencia IET)	59
8. Discusión	64
8.1 Los macrófagos de infecciones crónicas con <i>T. crassiceps</i> sobreexpresan el MMR que es un indicador de activación alternativa además de otras moléculas de superficie.	64
8.2 La infección con <i>T. crassiceps</i> induce la disminución de la producción de IL-12 en los macrófagos.	68
8.3 El IFN- γ R se expresa adecuadamente en los macrófagos alternativamente activados.	69
8.4 Los macrófagos alternativamente activados presentan diferente patrón de proteínas que los de activación clásica.	70
8.5 Los macrófagos alternativamente activados no presentan una adecuada fosforilación de la molécula STAT-1 α en respuesta al estímulo con IFN- γ .	70
9. Conclusiones	75
10. Apéndice: Fundamentos de las técnicas utilizadas	76
11. Referencias	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
Figura 1	Vía de señalización de IFN- γ .	23
Figura 2	Diferenciación de las células madre pluripotenciales a monocitos/macrófagos.	26
Figura 3	Vías de señalización por el receptor del Lipopolisacárido.	31
Figura 4	Activación y funciones de los macrófagos en la inmunidad celular.	33
Figura 5	Amplificados de MMR (a) y GAPDH (b) obtenidos por RT-PCR a partir de RNA de macrófagos.	50
Figura 6	Región analizada por Citometría de flujo.	51
Figura 7	Histogramas obtenidos al analizar la presencia de CD23, CCR5 y GR1 en células F480+.	53
Figura 8	Histogramas obtenidos al analizar la presencia de PDL1 y PDL2 en células F480+.	54
Figura 9	Histogramas obtenidos al analizar la presencia de TLR2 y TLR4 en células F480+.	55
Figura 10	Histogramas obtenidos al analizar la presencia de CD14 y IFN- γ R en células F480+.	56
Figura 11	Determinación de IL-12 mediante la técnica de ELISA.	58
Figura 12	Patrón de proteínas de macrófagos estimulados.	59
Figura 13	Imágenes de proteínas identificadas por Western Blot.	61
Figura 14	Densitometrías del experimento 1.	62
Figura 15	Densitometrías del experimento 2.	63
Figura 16	Posibles mecanismos que impiden la adecuada fosforilación de STAT1.	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
Tabla 1	Receptores tipo Toll (TLR).	15
Tabla 2	Diferencias entre macrófagos clásica y alternativamente activados.	36
Tabla 3	Histogramas de la expresión de moléculas de membrana en macrófagos.	57

ABREVIATURAS

° C	Grados Celsius
aaMφ	Macrófago alternativamente activado
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMAC1	Enzima condensadora de acil-malonil 1
AP-1	Proteína activadora 1 (activator protein 1)
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
caMφ	Macrófago clásicamente activado
CAPK	Proteína cinasa ceramida-activada
CCL17	Ligando de quimocina 17
CCR5	Receptor de quimocina
CD	Grupo de diferenciación
CD40L	Ligando de CD40
cDNA	ADN complementario
CIITA	Transactivador de los genes del MHC de clase II
CO ₂	Bióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígeno
CpG	Dinucléotido de de guanina y citocina
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EDA	Extra dominio A
EGR1	Respuesta temprana de crecimiento 1
EGR-2	Respuesta temprana de crecimiento 2
ELISA	Ensayo de inmunoabsorbencia unido a enzima
ERK	Cinasa regulada extracelularmente
FACS	Citometría por análisis de fluorescencia
FcγRI	Receptor de alta afinidad de la fracción constante de las IgG
GAF	Factor activado por IFN-γ

GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GAS	Secuencia activada por IFN- γ
GEMM-CFU	Unidad formadora de colonias de granulocitos/eritrocitos/ megacariocitos/ macrófagos
GM-CFU	Unidad formadora de colonias de granulocitos/ macrófagos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GR1	Molécula de membrana asociada a granulocitos
HRP	Peroxidasa de rábano
HSP60	Proteína de choque térmico 60
IFNGR1	Receptor 1 de IFN- γ (cadena α)
IFNGR2	Receptor 2 de IFN- γ (cadena β)
IFN- γ	Interferón gamma
IFN- γ R	Receptor de IFN- γ
Ig, IgA	Inmunoglobulina, Inmunoglobulina A
IL	Interleucina
IL-1RA	Antagonista del receptor de Interleucina 1
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
IP	Intraperitoneal
IP-10	Proteína inducible 10
IP3	Inositol trifosfato
IRF-1	Factor 1 regulador de Interferón
IRO	Intermediarios reactivos de oxígeno
ISRE	Elementos de respuesta estimulados por IFN
JAK	Janus Cinasa
JNK	c-jun N-terminal cinasa
KDa	KiloDaltones
LBP	Proteína de unión a LPS
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar

mA	miliAmper
M-CFU	Unidad formadora de colonia de macrófagos
MCP-1	Proteína 1 quimiotáctica de monocitos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEK	Cinasa MAPK/ERK
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMR	Receptor de manosa
mV	Milivoltio
M ϕ	Macrófago
NaCl	Cloruro de sodio
NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear kappa B
ng	Nanogramo
NK	Células asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno
P	Punto de fosforilación
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PC-PLC	Fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina
PDL1	Path death ligand-1 (Ligando 1 de muerte programada)
PDL2	Path death ligand-2 (Ligando 2 de muerte programada)
PEC	Célula de exudado peritoneal
PI-PLC	Fosfolipasa específica de fosfatidilinositol
PKC	Proteína cinasa C
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Virus respiratorio sincicial
RT-PCR	Transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa

SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOCS-2	Supresor de señales de citocinas 2
SOCS-3,	Supresor de señales de citocinas 3
SSF	Solución salina fisiológica
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TAK	Cinasa activada por TNF
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
T _H 1	T cooperadora tipo 1
T _H 2	T cooperadora tipo 2
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF	Factor activado por receptor de TNF
UV	Ultravioleta
μ L	Microlitro
Ym1	Quitinasa

INTRODUCCIÓN

El fenómeno de la **inmunidad** consiste en el reconocimiento de sustancias extrañas al organismo mediante la activación de células con receptores específicos, para mantener la homeostasis. Las células y moléculas involucradas en la inmunidad constituyen el **sistema inmunológico** y su respuesta colectiva y coordinada frente a la presencia de una sustancia extraña es conocida como **respuesta inmunitaria** (Abbas, A., 2003).

Para su mejor estudio, los mecanismos de protección se han dividido en mecanismos de respuesta inespecíficos (respuesta innata) y respuesta inmunitaria adaptativa. Estas tienen diferentes características y entran en acción a diferentes tiempos durante la infección. Sin embargo, no son eventos aislados ya que existen vínculos que unen ambas respuestas (Abbas, A., 2003).

Entre los diversos componentes del sistema inmunológico están moléculas como las citocinas, quimiocinas y células como los linfocitos y células presentadoras de antígeno (CPA). Entre estas últimas se encuentran los macrófagos (M ϕ) (Abbas, A., 2003). Los macrófagos son células del sistema fagocítico mononuclear, y tienen entre sus principales funciones fagocitar y desencadenar procesos inflamatorios a partir de la liberación de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas efectoras como el óxido nítrico (Janeway, C. *et al.* 2003).

A pesar de tratarse de células fagocíticas, los M ϕ no siempre pueden eliminar los patógenos ingeridos, es entonces cuando se requiere que sean estimulados por células T_{H1} (que inducen la respuesta celular); estas células actúan sintetizando proteínas asociadas a membrana y algunas citocinas solubles cuyas acciones, tanto locales como distantes coordinan la respuesta inmunológica contra los patógenos intracelulares (Janeway, C. *et al.* 2003). Esta inducción de mecanismos antimicrobianos en los macrófagos es conocida como la **activación de los macrófagos**. (Abbas, A. *et al.* 2003).

Pese a que el estado activado de los M ϕ proporciona al organismo una eficiente respuesta frente a patógenos, no puede mantenerse constante ya que las sustancias que se liberan y actúan destruyendo patógenos también provocan destrucción del tejido debido a su toxicidad para el hospedero (Janeway *et al.* 2003). Sin embargo, estos mediadores tóxicos permiten atacar a patógenos extracelulares de gran tamaño que no podrían fagocitar, tales como los helmintos, no pudiendo evitarse el daño tisular (Noël, W. *et al.* 2004).

Los helmintos parásitos logran modular la respuesta en infecciones crónicas ya que la respuesta frente a la infección es de tipo T_H1 en un principio, ésta se ve modulada hacia una respuesta tipo T_H2 con el paso del tiempo (Terrazas, L. I. *et al.* 1999). Esta modulación afecta también a los macrófagos, los cuales cambian su fenotipo antes pro-inflamatorio hacia un estado más permisivo de tipo T_H2 que da lugar a lo que ahora se conoce como **activación alternativa de los macrófagos** (Rodríguez-Sosa, M. *et al.* 2002).

A diferencia de los macrófagos clásicamente activados (caM ϕ), los aaM ϕ no responden al IFN- γ produciendo IL-12, NO y demás sustancias proinflamatorias (Goerdt, S. *et al.* 1999), por el contrario parecen responder al estímulo con IL-4 e IL-13 (Stumpo, R. *et al.* 1999), también presentan alta expresión del receptor de manosa, de L-arginasa, entre otros (Gordon, S. 2003).

Anteriormente se ha trabajado con un modelo experimental basado en la infección intraperitoneal de ratones con el helminto *Taenia crassiceps* y, se ha observado que este parásito induce un ambiente de citocinas de tipo T_H2 en su hospedero cuando la infección se encuentra en un estado crónico (mayor de 4 semanas); con lo que se logra también la generación de aaM ϕ . Aunque los mecanismos mediante los cuales los helmintos modulan la respuesta inmunitaria no han sido bien esclarecidos, parecen ser que el cambio de T_H1 a T_H2 propiciado por los mismos parásitos tiene como función inducir para ellos un ambiente más permisivo con lo que logran su mejor establecimiento (Reyes, J. L. y Terrazas, L. I. 2007).

Los aaM ϕ no responden de forma habitual cuando son estimulados con IFN- γ . En un principio se pensó en alguna deficiencia en la expresión del receptor para esta molécula, sin embargo, mediante el análisis por citometría de flujo, se ha encontrado que no existen diferencias significativas en la expresión del receptor de IFN- γ entre aaM ϕ y caM ϕ (Rodríguez-Sosa, M. et al 2006). Por lo anterior, se puede sugerir que la causa por la que los aaM ϕ no respondan de manera similar a los clásicos frente al IFN- γ sea debida a alguna diferencia en algún paso de la cadena de señalización.

Es por esto que en este trabajo se estudia una de las moléculas de la cascada de señalización del IFN- γ en ambos tipos de macrófagos activados, es decir, se evalúa la fosforilación de la molécula STAT1 α tanto en caM ϕ como en aaM ϕ inducidos por *Taenia crassiceps*, en respuesta al estímulo con IFN- γ ya que esta molécula se ha encontrado alterada en infecciones con otro tipo de parásitos (Rosas, L., et al. 2006) y también existen estudios que relacionan estrechamente a esta molécula con el desarrollo de la respuesta inmunitaria T_H1 (Rosas, L. et al. 2003).

De modo que en este trabajo se utilizaron diferentes técnicas para evaluar la activación de los macrófagos, evidenciar las diferentes características y analizar su capacidad de fosforilar a la proteína STAT1 α . Se analizaron moléculas de superficie como TLR2, TLR4, IFN- γ R, CCR5, PD-L1, PD-L2, CD14, CD23 y GR1 mediante citometría de flujo, también se analizó la expresión del RNA mensajero para el MMR mediante RT-PCR, la síntesis de IL-12 a través de la técnica de ELISA utilizando como muestras sobrendantes de cultivo de macrófagos y por último, el análisis de la fosforilación de la molécula STAT1 α por la técnica de Western Blot.

3. GENERALIDADES

3.1 LA RESPUESTA INMUNITARIA

El término inmunidad se refiere a la protección que un organismo tiene frente a las enfermedades, y más específicamente frente a enfermedades infecciosas. Las células y moléculas involucradas en la inmunidad constituyen el sistema inmunológico y, su respuesta colectiva y coordinada frente a la presencia de una sustancia extraña es conocida como respuesta inmunitaria (Abbas, A., 2003)

El sistema inmunológico tiene entre otras funciones, la defensa contra microorganismos infecciosos, sin embargo, las sustancias extrañas no infecciosas también pueden desencadenar respuestas inmunitarias (alergias). Además, los mecanismos por los cuales el individuo se protege de las infecciones y elimina sustancias extrañas que en ocasiones son capaces de causar daño en tejidos y hasta patologías; de ahí que un término más completo de inmunidad es la reacción a sustancias peligrosas que incluye a los microorganismos y macromoléculas como proteínas y polisacáridos que se da en el organismo a pesar de las consecuencias fisiológicas o patológicas que pueda ocasionar. Por lo tanto la inmunología es el estudio de la inmunidad y de los eventos moleculares y celulares que ocurren después de que un organismo entra en contacto con microbios o sus macromoléculas (Abbas, A., 2003).

3.1.1 La respuesta inmunitaria innata

Los mecanismos inespecíficos de defensa (MID) (respuesta inmunitaria innata) consisten en células y mecanismos bioquímicos de defensa que se encuentran presentes desde antes de que ocurra una infección y que responden rápidamente frente a las infecciones. Estos mecanismos responden únicamente a microorganismos y lo hacen esencialmente de la

misma manera frente a infecciones repetidas, es decir, no genera memoria inmunológica (Abbas, A., 2003).

Los principales componentes de los MID (inmunidad innata) son (1) células fagocíticas como los neutrófilos y macrófagos, (2) células NK (asesinas naturales); (3) proteínas de la sangre que incluyen al sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y (4) proteínas llamadas citocinas que coordinan y regulan muchas actividades de las células de la inmunidad innata (Abbas, A., 2003).

La inmunidad innata provee las primeras líneas de defensa contra los microorganismos. Reconoce estructuras específicas que son comunes en diferentes grupos de microorganismos pero no distingue pequeñas diferencias entre las sustancias extrañas; posee una especificidad única por los productos microbianos que difiere de la especificidad del sistema inmunitario adaptativo (Abbas, A., 2003).

La inmunidad innata (MID) reconoce moléculas que son características de microorganismos patógenos y que no están presentes en las células de los mamíferos. Estas moléculas son llamadas PAMP's, por sus siglas en inglés que significan "patrones moleculares asociados a patógenos". En estas moléculas se incluyen el RNA bicatenario presente en algunos virus o las secuencias de ADN CpG no metiladas presentes en las bacterias, también se incluyen algunas características de las proteínas que se presentan únicamente en microbios, como la iniciación por N-formilmetionina, que es típica de las proteínas bacterianas, o bien el lipopolisacárido (LPS) presente en las bacterias Gram negativas o los ácidos teicoicos en las bacterias Gram positivas. Los receptores mediante los cuales se logra el reconocimiento de estas moléculas se llaman receptores de reconocimiento de patrones (Abbas, A., 2003).

Los receptores del sistema inmunitario innato se codifican en la línea germinal y como se pueden codificar muchos menos receptores en la línea germinal que los que pueden codificarse a través de reordenamiento génico, como es el caso de los receptores de las células de la inmunidad adaptativa, el sistema inmunitario innato presenta un repertorio

limitado de ligandos; se calcula que puede reconocer unos 10^3 patrones moleculares de microorganismos mientras que el sistema inmunitario adaptativo puede reconocer unos 10^7 o más antígenos diferentes (Abbas, A., 2003).

Los monocitos/macrófagos presentan estos receptores con los que se unen a los microorganismos, entre estos receptores se encuentran los siguientes:

Los receptores de manosa y los receptores “basureros” (scavenger). Actúan para unirse a los microorganismos e ingerirlos. El receptor de manosa es una lectina del macrófago ($M\phi$) que se une a la manosa de las glucoproteínas y los glucolípidos. Estos azúcares suelen formar parte de las paredes celulares de los microorganismos. Los receptores “basureros” se definieron originalmente como moléculas que se unen a lipoproteínas de baja densidad (LDL) acetiladas u oxidadas que ya no pueden interaccionar con el receptor LDL clásico y median su endocitosis. Estos receptores se unen a diferentes microbios así como a partículas de LDL modificadas. Las integrinas de los macrófagos, sobre todo Mac-1 (CD11b/CD18), también se unen a los microorganismos para facilitar su fagocitosis (Abbas, A., 2003).

Los receptores de opsoninas. Favorecen la fagocitosis de los microorganismos recubiertos de diferentes proteínas. El proceso de recubrir un microbio para convertirlo en objetivo de la fagocitosis se denomina opsonización y las sustancias que recubren los microorganismos se llaman opsoninas. Estas sustancias incluyen anticuerpos, proteínas del complemento y lectinas (Abbas, A., 2003).

Los receptores de tipo Toll (TLR) son homólogos a una proteína de *Drosophila* denominada Toll y activan a los fagocitos en respuesta a diferentes tipos y componentes de microorganismos. Son una familia de proteínas de membrana de la cual hasta la fecha se han encontrado 11 TLR de mamíferos y todos parecen necesarios para la respuesta frente una clase diferente de patógeno infeccioso (Abbas, A., 2003).

La vía de transducción de señales predominantemente utilizada por los TLR activa a NF- κ B. Y los genes que se expresan en respuesta a esta señal codifican proteínas importantes en muchos componentes diferentes de las respuestas inmunitarias innatas. Entre ellos figuran citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión endotelial y proteínas que participan en los mecanismos de destrucción microbiana. Algunos de los receptores tipo Toll y sus funciones son los siguientes (Abbas, A., 2003):

TLR	Ligando	Origen microbiano	Localización
TLR1	Triacil lipopéptidos	Bacterias	Superficie celular
TLR2	Lipoproteínas Peptidoglucano Zimosano LPS (formas atípicas) Anclaje GPI Lipoarabinomanana Dimanósido de fosfatidilinositol	Bacterias Bacterias Gram positivas Hongos Leptospira Tripanosomas Micobacterias Micobacterias	Superficie celular
TLR3	RNA bicatenario	Virus	Intracelular
TLR4	LPS HSP60	Bacterias gram negativas Chlamydia	Superficie celular
TLR5	Flagelina	Varias bacterias	Superficie celular
TLR8	RNA de cadena sencilla	Virus	Intracelular
TLR9	ADN CpG	Bacterias, protozoos	Superficie celular

Tabla 1. Receptores tipo Toll (TLR). Se indican moléculas reconocidas por cada uno de los TLR así como la procedencia de cada ligando. Abbas, A. 2003.

Sin embargo el repertorio de especificidades de los TLR se amplía por la capacidad de estos receptores para formar heterodímeros entre sí. Por ejemplo, se precisan los primeros TLR2 y TLR6 para las respuestas a los peptidoglucanos (Abbas, A., 2003).

En contraste con la inmunidad innata (MID), existen aquellas respuestas que son estimuladas por la exposición a agentes infecciosos y que aumentan su magnitud a mayor número de exposiciones con este agente. Es lo que se llama inmunidad adaptativa (Abbas, A., 2003).

3.1.2 La respuesta inmunitaria adaptativa

Se le da el nombre de respuesta inmunitaria adaptativa a aquella que se desarrolla como consecuencia de una infección o una inmunización y que provoca la activación de los linfocitos B y/o T con receptores antígeno-específicos (Abbas, A., 2003).

Entre las características de la inmunidad adaptativa se conoce que tiene una gran especificidad hacia distintas moléculas (reconoce 10^7 o más antígenos diferentes) y que tiene la capacidad desarrollar células de memoria y responder más intensamente frente a la exposición repetida a un mismo antígeno. Este tipo de respuesta inmunitaria está compuesta por células llamadas linfocitos y por sus productos (anticuerpos y citocinas) (Abbas, A., 2003).

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, la inmunidad humoral y la celular. La inmunidad humoral está mediada por moléculas llamadas anticuerpos que son producidos por los linfocitos B, que son moléculas que reconocen a los antígenos microbianos, neutralizan la capacidad infecciosa de los microorganismos y los eliminan por diversos mecanismos efectores como estimular la fagocitosis o activar la liberación de mediadores de inflamación por parte de leucocitos. Este tipo de respuesta inmunitaria es el principal mecanismo de defensa contra microorganismos extracelulares y sus toxinas (Abbas, A., 2003).

La respuesta adaptativa de tipo celular está mediada por células llamadas linfocitos T y su importancia radica en que existen patógenos como virus y algunas bacterias que sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos u otras células del hospedero y de esta forma los anticuerpos circulantes no pueden ejercer ningún efecto; es entonces cuando se necesita la

función de la inmunidad celular, la cual, favorece la destrucción de los microorganismos que residen dentro de los patógenos o de las células infectadas para eliminar los reservorios de la infección (Abbas, A., 2003).

Los linfocitos T se dividen en diferentes poblaciones; existen linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos y linfocitos T reguladores y también existen las células NK o asesinas naturales aunque estas células pertenecen a los mecanismos inespecíficos de defensa. Como respuesta a una estimulación antigénica los linfocitos T cooperadores sintetizan proteínas llamadas citocinas, cuya función consiste en estimular la proliferación y diferenciación de linfocitos T y otras células como los linfocitos B y los macrófagos, entre otras. Por otro lado, los linfocitos T citotóxicos tienen como función destruir células que expresen antígenos extraños como aquellas infectadas por virus y células transformadas. En cuanto a los linfocitos T reguladores no se conoce por completo la naturaleza ni la función pero se asocian a la inhibición de la respuesta inmunitaria (Abbas, A., 2003).

3.1.3 Las citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular (≈ 25 KDa) que son secretadas por varios tipos celulares, normalmente como respuesta a un estímulo activador e inducen respuestas mediante la unión a receptores específicos. Las citocinas dependiendo de su sitio de acción se pueden nombrar autócrinas es decir, que actúan sobre la misma célula que la liberó; parácrina lo que significa que ejerce su acción en células adyacentes o bien; de manera endócrina, afectando el comportamiento de células distantes (Janeway, C. et al. 2003).

Las citocinas se dividen en tres familias; las hematopoyetinas, en donde se incluye la hormona de crecimiento y otras interleucinas que participan tanto en inmunidad innata como adaptativa; la familia TNF (Factor de necrosis tumoral) que de igual modo tiene componentes que influyen tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa y las quimiocinas que poseen propiedades quimiotractantes, de modo que inducen la migración

de células con el receptor apropiado hacia la fuente de la quimiocina (Janeway, C. et al. 2003).

Dependiendo de las acciones biológicas de las citocinas, pueden clasificarse en pro y antiinflamatorias. Así que cuando la respuesta es inflamatoria se observa la secreción de citocinas tales como Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) (caquectina), Interleucina-1 β (IL-1 β), IL-12, Interferón- γ (IFN- γ) e IL-18, entre otras. Mientras que en respuestas de tipo antiinflamatorio se observa la secreción de citocinas como la IL-4, IL-10 e IL-13, TGF- β , entre otras (Abbas, A., 2003).

Se le conoce como inflamación a la reacción compleja que tiene lugar en los tejidos vascularizados y que consiste en la atracción de linfocitos y en la extravasación de varias proteínas plasmáticas en las zonas de infección (Abbas, A., 2003).

La función de la inflamación es destruir los microorganismos invasores al poner a las células efectoras activadas en contacto con ellos en un tejido infectado. La inflamación mediada por el sistema inmunológico en respuesta a los microorganismos se inicia por las citocinas, especialmente TNF, IL-1 y quimiocinas (Abbas, A., 2003).

La inflamación suele provocar poca lesión tisular añadida a la que se produce por el mismo microorganismo. La inflamación produce diversos cambios sistémicos en el hospedero que aumentan la capacidad del sistema inmunitario para erradicar la infección y, en las infecciones graves, puede contribuir a una lesión tisular sistémica o la muerte (Abbas, A., 2003).

3.1.3.1. Citocinas proinflamatorias

Factor de necrosis tumoral o caquectina (también llamado TNF- α por razones históricas y para distinguirlo del TNF- β). Es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda a las bacterias Gram negativas y otros microorganismos infecciosos y es responsable de

muchas de las complicaciones sistémicas en las infecciones graves; está formado por un homotrímero de 51 KDa, conformado por una proteína de 17 Kda (Abbas, A., 2003).

La principal fuente celular de TNF- α son los fagocitos mononucleares activados, aunque puede sintetizarse en otras células. El estímulo más potente para que se sintetice TNF- α por los macrófagos es el lipopolisacárido (LPS) presente en bacterias Gram negativas. El interferón gamma (IFN- γ) que se sintetiza por linfocitos T y NK, aumenta la síntesis de TNF- α en los macrófagos estimulados por LPS (Abbas, A., 2003).

La principal función biológica del TNF- α consiste en estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hacia las zonas de infección y activar estas células para erradicar a los microorganismos. En cantidades bajas produce inflamación local por activación de neutrófilos, a concentraciones moderadas induce a la síntesis de proteínas de fase aguda por parte del hígado, también produce fiebre y, en concentraciones elevadas y junto con otras citocinas como IFN- γ e IL-1, induce choque séptico que se caracteriza por colapso vascular, coagulación intravascular diseminada y trastornos metabólicos (Abbas, A., 2003).

Interleucina-1 β (IL-1 β). Su principal función es similar a la del TNF- α , es un mediador de la respuesta inflamatoria del hospedero frente a las infecciones y otros estímulos inflamatorios. Esta citocina actúa junto con TNF- α en la inmunidad innata y la inflamación (Abbas, A., 2003).

La principal fuente celular de IL-1 β , al igual que del TNF- α son los fagocitos mononucleares activados pero puede ser secretado por diversos tipos de células como neutrófilos, células epiteliales y células endoteliales; su secreción es inducida en respuesta a productos bacterianos y a otra citocinas como TNF- α (Abbas, A., 2003).

Los efectos biológicos de IL-1 β son similares a los de TNF- α y dependen de la concentración de citocina producida. En concentraciones bajas actúa como un mediador de la inflamación local, y cuando se secreta en grandes cantidades tiene efectos sistémicos

como capacidad de originar fiebre e inducir la síntesis de proteínas plasmáticas de fase aguda por el hígado (Abbas, A., 2003).

Interleucina-12 (IL-12). Es un mediador fundamental en la respuesta inmunitaria innata inicial a los microorganismos intracelulares y es un inductor clave de la inmunidad celular, es decir, la respuesta inmunitaria adaptativa frente a estos microorganismos. La IL-12 se identificó en un principio como un activador de la función citolítica de las células NK, pero su acción más importante consiste en estimular la síntesis de IFN- γ por los linfocitos T y NK (Abbas, A., 2003).

Las principales fuentes de IL-12 son los fagocitos mononucleares activados y las células dendríticas. La producción de esta citocina se induce por estímulos microbianos, entre ellos el LPS, además los linfocitos T cooperadores también inducen la síntesis de IL-12 por unión del ligando de CD40 situado en estos linfocitos cuando se une al CD40 de los macrófagos y células dendríticas. El IFN- γ producido por linfocitos T o NK también estimula la síntesis de IL-12 (Abbas, A., 2003).

La IL-12 es esencial para iniciar una secuencia de respuestas en la que participan macrófagos, células NK y linfocitos T y que da lugar a la erradicación de microorganismos intracelulares. La IL-12 secretada estimula a las células NK y T para que produzcan IFN- γ que después activa a los macrófagos para que destruyan los microorganismos fagocitados (Abbas, A., 2003).

Por otro lado, la IL-12 también estimula la diferenciación de los linfocitos T cooperadores CD4⁺ en linfocitos T_H1 productores de IFN- γ , además potencia las funciones citolíticas de los linfocitos NK y los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ activados (Abbas, A., 2003).

Interleucina-18 (IL-18). Tiene una estructura homóloga a la IL-1. Se produce en los macrófagos en respuesta a LPS y otros productos bacterianos. Estimula la síntesis de IFN- γ por los linfocitos NK y T y ejerce una acción sinérgica con IL-12 en esta respuesta (Abbas, A., 2003).

Interferón-gamma (IFN- γ). Es la principal citocina activadora de los macrófagos y realiza funciones críticas en la inmunidad innata y la inmunidad celular adaptativa. El IFN- γ también se denomina interferón inmunitario o de tipo II. Es una proteína homodimérica producida por los linfocitos NK, T_H1 CD4⁺ y T CD8⁺; es la citocina característica de la subpoblación T_H1 de linfocitos T cooperadores (Abbas, A., 2003).

Las funciones de IFN- γ son importantes en la inmunidad celular frente a los microorganismos intracelulares, estimula la expresión de moléculas del MHC y de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígeno (CPA), también favorece la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes en la subpoblación T_H1 e inhibe la proliferación de los linfocitos T_H2. Actúa sobre linfocitos B para favorecer el cambio a ciertas subclases de Inmunoglobulina G (IgG), sobre todo, IgG2a en los ratones, así como inhibir el cambio a isotipos dependientes de IL-4, como IgE e IgG1 en ratones (Abbas, A., 2003).

El IFN- γ es una glicoproteína homodimérica formada por dos subunidades de 21 a 24 KDa, ambas codificadas por el mismo gen y asociadas de forma no covalente (Celada, 1994). Inicialmente se atribuyó al IFN- γ un efecto principalmente antivírico. Sin embargo, actualmente se sabe que esta citocina tiene un papel crítico como modulador de la respuesta (Goes, *et al.*, 1995). Todas las células del organismo poseen receptores específicos para el IFN- γ , lo que condiciona que esta citocina tenga un cierto efecto pleiotrópico sobre distintos tipos celulares. En linfocitos B, promueve la diferenciación y el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (Snapper y Paul, 1987), así como la expresión de las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Wong y col., 1983). En los linfocitos T CD4⁺, estimula la proliferación de las células con subtipo T_H1 y bloquea la de las células T_H2, favoreciendo aquellos procesos asociados a la respuesta inmunológica específica mediada por células. En los neutrófilos y en los linfocitos NK, desencadena el proceso de activación, promoviendo la respuesta inmunológica inespecífica. A nivel de células endoteliales, el IFN- γ induce un aumento de la expresión de selectinas en la superficie celular con el fin de facilitar la extravasación de linfocitos T desde el torrente sanguíneo a los tejidos (Bach y col., 1997).

Pese a este efecto pleiotrópico, las células blanco por excelencia del IFN- γ son los monocitos/macrófagos, sobre los que actúa como el principal inductor del proceso de activación (Farrar y Schreiber, 1993). En estas células, induce la expresión de los genes del MHC de clase II, promoviendo la función presentadora de antígeno de los macrófagos. Además, induce la expresión de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), la generación de intermediarios reactivos del oxígeno, aumenta la expresión de moléculas de adhesión y de receptores Fc γ RI de alta afinidad, así como la síntesis y secreción de citocinas, tales como TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-12, y de componentes del sistema del complemento, por ejemplo C3 (Bohem y col., 1997; Celada y col., 1989). En particular, la inducción de la síntesis de IL-12 representa un mecanismo de retroalimentación positivo en el contexto de la inmunidad específica mediada por células, ya que esta interleucina actúa como un potente inductor de la generación y proliferación de linfocitos T CD4⁺ del subtipo T_H1 (Bellardelli, 1995).

En cuanto al receptor de IFN- γ (IFN- γ R), es un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas, α (IFNGR1) y β (IFNGR2), que se encuentran disociadas en el estado inactivo. Tras la unión con el ligando, las cadenas del receptor oligomerizan y dan lugar al tetrámero $\alpha_2\beta_2$. La cadena α del receptor es la responsable de la interacción con la molécula de IFN- γ , mientras que la cadena β está únicamente involucrada en la transmisión de la señal hacia el interior de la célula. En el estado inactivo la cadena α se encuentra asociada a la cinasa Janus (JAK)-1, y la cadena β a la cinasa JAK-2. Tras la unión con el ligando y la consiguiente oligomerización, estas cinasas interaccionan entre sí y se activan por fosforilación recíproca, a continuación, fosforilan determinados residuos de tirosina que se encuentran en la región intracitoplasmática de la cadena α del receptor. Dichos residuos de tirosina fosforilados son reconocidos por el dominio SH₂ de la proteína STAT1 α , entre otras proteínas con dominios SH₂. Mientras que STAT1 está asociado con la subunidad α , es fosforilado por las JAK activadas en un residuo de tirosina conservado situado en el extremo carboxi-terminal de la molécula (posición 701). Las moléculas STAT1 activadas por la fosforilación se disocian de la cadena α del receptor de IFN- γ para dimerizar entre sí de modo que cada dímero de STAT1 vuelve a ser fosforilado, esta vez en un residuo serina

situado en el dominio de transactivación convirtiendo al dímero en un factor de transcripción activo GAF (Gamma interferon Activated Factor). Este factor se transloca al núcleo donde induce la transcripción de numerosos genes mediante la unión a una secuencia de ADN específica denominada GAS (Gamma-interferon Activated Sequence) (Bach y col., 1997; Ihle y Kerr, 1995; Schindler y Darnell, 1995).

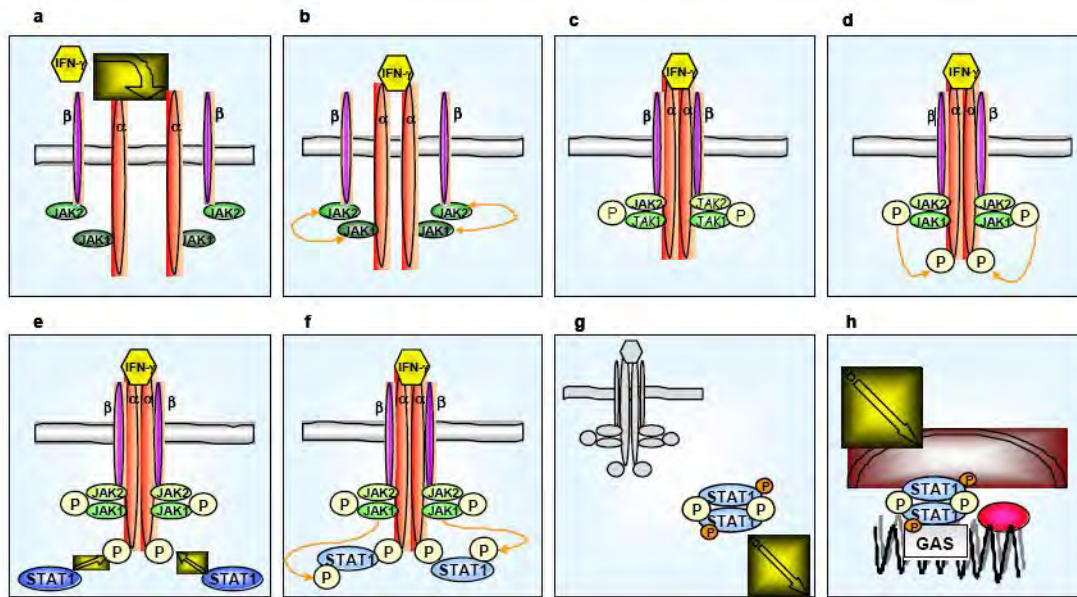


Fig. 1. Vía de señalización de IFN- γ . El receptor de IFN- γ posee dos cadenas α (IFNGR1) y dos cadenas β (IFNGR2) (a) que oligomerizan cuando IFN- γ se une al receptor propiciado la yuxtaposición de JAK1 y JAK2 que están asociadas a las cadenas a y b respectivamente (b). Este hecho propicia la activación por transfosforilación de ambas JAK (c) y la fosforilación en la cadena a del receptor por parte de las JAK activadas (d) creando un sitio de unión para STAT1 (e). Dos moléculas de STAT1 se unen a dichos sitios de y son fosforiladas en residuos tirosina por las JAK (f) favoreciendo la formación de un dímero de STAT1 que a su vez es fosforilado en residuos serina (g) y transloca al núcleo donde se une a secuencias tipo GAS en el ADN induciendo la expresión génica (h).

Entre los genes controlados por GAF, se encuentran aquellos que codifican para el receptor de alta afinidad de la fracción constante de las inmunoglobulinas G (Fc γ RI); el transactivador de los genes del MHC de clase II CIITA (Class II Transactivator), necesario para inducir de la expresión de las moléculas del MHC de clase II; factores de transcripción de la familia IRF1, necesarios para la regulación de la expresión de genes con secuencias ISRE (IFN-stimulated response elements) en sus promotores, como, por ejemplo, IFN α/β , MHC clase I o la iNOS. La activación de STAT1 α es transitoria y está controlada

negativamente por la vía del ubiquitinaproteosoma. De esta manera, la activación de STAT1 α alcanza un nivel máximo a los 15-30 minutos tras la estimulación con IFN- γ y disminuye hasta niveles basales en 1-2 horas, permitiendo la atenuación de la respuesta al IFN- γ (Boehm y col., 1997).

Por otro lado, tras la unión del IFN- γ a su receptor, el complejo formado por la subunidad α y el ligando se internaliza, formando parte de un compartimento ácido intracelular. Allí el complejo se disocia y el IFN- γ libre es finalmente degradado en los lisosomas. El receptor disociado entra a formar parte de un reservorio intracelular de subunidades α y puede ser reciclado a la superficie (Celada y Schreiber, 1986).

A pesar de que la vía de activación de JAK/STATs es el único mecanismo de señalización bien establecido para el IFN- γ , recientemente se han descrito diversas actividades mediadas por IFN- γ a través de vías alternativas a STAT1, que afectan tanto procesos de proliferación como de activación celular. Se ha observado que en fibroblastos embrionarios de ratón, el IFN- γ induce la activación de ciertos genes implicados en proliferación y que son independientes de la vía JAK/STATs, tales como EGR1, EGR-2, c-Jun, SOCS-2, SOCS-3, entre otros. (Gil y col., 2001; Ramana y col., 2000; 2001).

3.1.3.2. Citocinas antiinflamatorias

Interleucina-4 (IL-4). Es el principal estímulo para la síntesis de anticuerpos IgE y para el desarrollo de linfocitos T_{H2} a partir de los linfocitos T cooperadores CD4⁺ vírgenes. Se trata de la citocina característica de la subpoblación T_{H2} y actúa como inductora y efectora de estas células (Abbas, A., 2003).

Las principales células productoras de IL-4 son los linfocitos T CD4⁺ de la subpoblación T_{H2} así como los mastocitos y los basófilos activados (Abbas, A., 2003).

Las acciones biológicas de IL-4 incluyen las reacciones mediadas por mastocitos y eosinófilos y la supresión de las reacciones que dependen de los macrófagos. También estimula la aparición de los linfocitos T_{H2} a partir de los CD4⁺ vírgenes y actúa como un

factor de crecimiento autócrino para los linfocitos T_H2 diferenciados. Además, antagoniza los efectos activadores de macrófagos del $IFN-\gamma$ y, por consiguiente, inhibe las reacciones inmunitarias celulares (Abbas, A., 2003).

Interleucina-5 (IL-5). Es un activador de los eosinófilos y sirve de nexo entre la activación de los linfocitos T y la inflamación eosinófila. IL-5 es un homodímero que se produce en la subpoblación T_H2 de linfocitos T $CD4^+$ y los mastocitos activados. Las principales acciones de IL-5 consisten en activar a los eosinófilos maduros y estimular el crecimiento y la diferenciación de los eosinófilos. La IL-5 también estimula la proliferación de linfocitos B y la síntesis de anticuerpos IgA (Abbas, A., 2003).

Interleucina-10 (IL-10). Es un inhibidor de los macrófagos y de las células dendríticas activadas y, por tanto, participa en el control de las reacciones inmunitarias innatas y la inmunidad celular. Es una citocina que se produce principalmente en macrófagos activados y, debido a que inhibe las funciones del macrófago, se dice que se trata de retroalimentación negativa (Abbas, A., 2003).

Los efectos biológicos de la IL-10 se deben principalmente a su capacidad de inhibir muchas de las funciones de los $M\phi$ activados. La IL-10 actúa poniendo fin a la secreción de citocinas y a la expresión de coestimuladores que favorecen la activación de los linfocitos T y la inmunidad celular. Todo con el fin de devolver al sistema su estado de reposo cuando la infección se ha erradicado. La IL-10 inhibe la síntesis de IL-12 por los macrófagos y las células dendríticas activadas. También inhibe la expresión de coestimuladores y de moléculas del MHC-II en los macrófagos y en las células dendríticas (Abbas, A., 2003).

Interleucina-13 (IL-13). Es una citocina con una estructura similar a la IL-4 y es producida por los linfocitos T $CD4^+$ T_H2 y por las células epiteliales. El receptor para esta citocina se encuentra principalmente en células no linfocíticas, como los macrófagos, y puede activarse por IL-13 o IL-4. La principal acción de IL-13 en los macrófagos consiste en inhibir su activación y antagonizar a $IFN-\gamma$ (Abbas, A., 2003).

3.2. LOS MACRÓFAGOS

Existen células del sistema inmunitario presentes en circulación y en prácticamente todos los tejidos. Existe una gran variedad de células que conforman el sistema inmunológico. Entre ellas se encuentran a los linfocitos B y las células plasmáticas (sintetizan anticuerpos), a los linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ (inmunidad celular), a los neutrófilos, basófilos, eosinófilos (presentes en circulación), a las células dendríticas, a los macrófagos, entre otras.

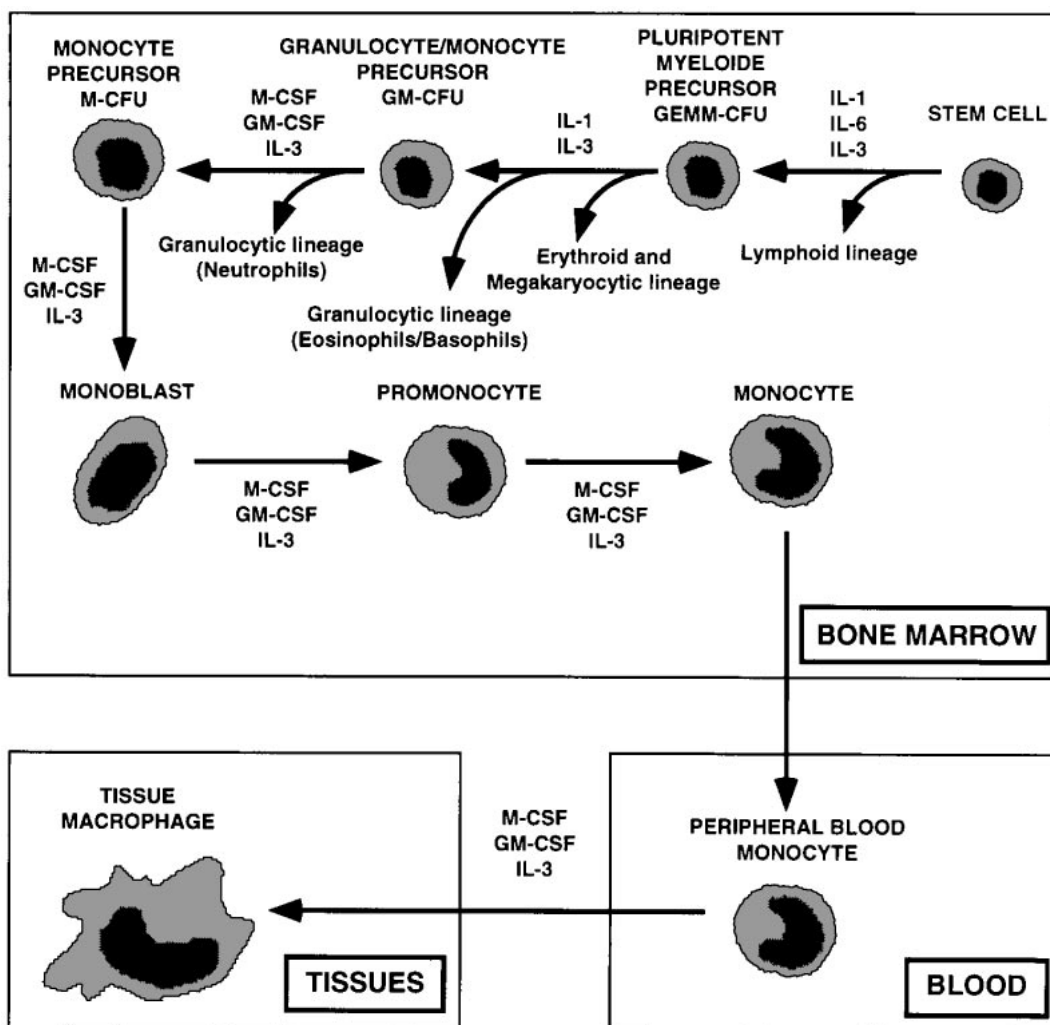


Fig. 2. Diferenciación de las células madre pluripotenciales a monocitos/macrófagos. Los factores de crecimiento que intervienen en cada etapa están indicados con flechas. Las flechas curvas indican los puntos donde se generan otros linajes. También se indica el nombre de cada nuevo linaje. VALLEDOR et al, 1998.

Hablando de forma particular, los macrófagos son células del sistema fagocítico mononuclear, y tienen entre sus principales funciones la fagocitosis. Tienen su origen en la médula ósea (Fig. 2), a partir de las células madre pluripotenciales (stem cells). En respuesta a factores de crecimiento y a citocinas como IL-1, IL-3 e IL-6, la célula madre pluripotencial experimenta una división celular desigual o heteromitosis dando lugar a una nueva célula madre y a una célula pluripotencial mieloide, GEMM-CFU (granulocyte/erythrocyte/megakaryocyte/macrophage-colony forming unit). En presencia de IL-1 e IL-3, este precursor genérico experimenta un proceso de diferenciación denominado compromiso (commitment) y pasa a convertirse en un progenitor común a las líneas monocítica y granulocítica, GM-CFU (granulocyte/macrophage colony forming unit), en este punto, la interleucina IL-3 y el factor de crecimiento GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor) inducen la proliferación de los GM-CFUs, sin embargo, el factor de crecimiento M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) no sólo induce la proliferación de estas células, sino también su diferenciación hacia precursores propiamente monocíticos denominados M-CFUs (macrophage-colony forming units). La diferenciación terminal de los M-CFUs, proceso conocido como maduración, y la consiguiente generación de monocitos, también requiere la presencia de M-CSF, siendo su predecesor inmediato el monocito. Los monocitos se diferencian a macrófagos cuando salen a los tejidos, gracias a moléculas de adhesión (adhesinas e integrinas), (Valledor, *et al*, 1998).

En cuanto a su morfología, los macrófagos son células de gran tamaño con múltiples pliegues y prolongaciones digitiformes, cortas y romas que intervienen en el proceso de endocitosis, dado que rodean las sustancias a ser fagocitadas. En los tejidos los monocitos culminan su maduración y se convierten en macrófagos. Este proceso conlleva el aumento de tamaño, un mayor desarrollo del sistema lisosomal y del contenido en enzimas hidrolíticos y un incremento del número y tamaño de las mitocondrias, así como de su metabolismo energético. La vida media de los macrófagos en los tejidos puede ser muy larga (meses-años), sin embargo, muchos de los macrófagos que llegan a los tejidos acabarán desapareciendo por procesos de muerte celular (Celada y Maki, 1992).

En los tejidos, un pequeño número de macrófagos se diferenciarán bajo la influencia de citocinas y, dependiendo del tipo de tejido, se convertirán en células de la microglía en el sistema nervioso central, en osteoclastos del hueso, en histiocitos del tejido conectivo, en células de Kupffer del hígado o en células de clase A del tejido sinovial. Todas estas células pertenecen a la línea macrofágica. Estos macrófagos tisulares son capaces de proliferar en dichos tejidos en condiciones basales (no activados) gracias a la presencia o a la producción autocrina de M-CSF, así como a la presencia de citocinas y de otros factores de crecimiento no específicos como el GM-CSF y la IL-3 (Fig. 2) (Celada y Maki, 1992).

Una vez en los tejidos requeridos, los macrófagos juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunológica, actúan como mediadoras de innumerables mecanismos diferentes dentro de la respuesta inmunológica, no sólo participan en la resistencia, sino que además, están adaptados para desempeñar funciones esenciales en la inmunidad específica adquirida, tanto humoral como mediada por células. De forma basal, los macrófagos se encuentran en disposición de realizar una serie de funciones sin necesidad de ningún tipo de estímulo, aunque muchas de éstas pueden realizarse con mayor eficiencia tras la activación de la célula. Sin embargo, para otras funciones se requiere que el macrófago haya sido previamente activado para poder llevarlas a cabo. Los macrófagos realizan algunas de sus funciones directamente, a través de interacciones célula-célula, o indirectamente, mediante la liberación de sustancias capaces de afectar a otras células. (Comalada, M., 2002; Nathan, C.F., 1987).

3.3. ACTIVACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

La activación de los macrófagos es un proceso complejo y estrictamente controlado que consiste en una serie de modificaciones bioquímicas, morfológicas y funcionales que culminan en el aumento del potencial de la célula para ejercer funciones complejas, tales como la presentación de antígenos, la lisis de células tumorales y la actividad bactericida. Los agentes más potentes en la activación de los macrófagos son el **IFN- γ** y el **lipopolisacárido (LPS)**, aunque también otros agentes como el GM-CSF, M-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4 y TNF pueden inducir algunos aspectos de la activación (Celada, 1994; Celada y Nathan, 1994; Hamilton y Adams, 1987).

El lipopolisacárido, también conocido como endotoxina, es uno de los componentes de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas, desde el punto de vista estructural, el LPS está formado por tres regiones distintas: una región central compuesta por polisacáridos repetitivos, una estructura de tipo antígeno-O, ambas hidrofílicas, y un dominio hidrofóbico formado por seis cadenas de ácidos grasos, también denominado lípido A, que representa el componente biológicamente activo del LPS. Debido a su estructura, el LPS actúa como una molécula anfipática y muy poco soluble en soluciones acuosas (Ulevitch y Tobias, 1995). El LPS funciona como un antígeno timo-independiente, es decir, es capaz de estimular a los linfocitos B en ausencia de linfocitos T cooperadores, además, el LPS activa a los linfocitos B sin la necesidad de interactuar con las inmunoglobulinas presentes en la superficie de este tipo celular (Celada, 1994).

En los macrófagos, el LPS induce la síntesis de citocinas como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α/β , TGF- β , metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) y otros lípidos bioactivos (factor activador de plaquetas, etc), péptidos quimiotácticos como MIP-1 α (macrophage inflammatory protein), y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. La mayor parte de estos productos inducidos por el LPS actúan de forma autocrina sobre los propios macrófagos y algunos de ellos, como por ejemplo, los metabolitos del ácido araquidónico o el IFN- α/β , controlan la expresión de genes tardíos en el contexto de la respuesta al LPS. Pero no todos estos productos ejercen un efecto positivo

sobre la respuesta de los macrófagos. Por ejemplo, la IL-10 y la PGE₂ forman parte de un mecanismo autoinhibidor que controla la producción de otras citocinas como el TNF- α (Sweet y Hume, 1996). También se ha descrito un efecto negativo del LPS sobre algunas de las actividades inducidas por el IFN- γ , tales como la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II o la expresión de los receptores scavenger (Celada y col., 1989; Koerner y col., 1987; Roselaar y Daugherty, 1997; Steeg y col., 1982; Xaus y col., 2000).

Mientras que una respuesta inflamatoria local generada por el LPS es benéfica para la lucha contra las infecciones de bacterias Gram negativas, la respuesta inmunológica generalizada y exagerada debido a la presencia de LPS en la circulación puede conducir a un choque endotóxico, capaz de causar la muerte del individuo (Wright y Kolesnick., 1995).

El reconocimiento del LPS por los macrófagos se da a través de un receptor de tipo Toll (TLR), el TLR4, que es un receptor de alta afinidad al LPS. Para que se produzca el reconocimiento del LPS, y la posterior señalización intracelular por parte del receptor TLR4, es necesario que el LPS se encuentre unido a una proteína sérica denominada LBP (LPS-binding protein) (Viriyakosol y Kirkland, 1995). LBP funciona como una opsonina de partículas que contienen LPS, incluyendo a bacterias Gram negativas enteras, facilitando la unión de estas partículas con el CD14 presente en las células mieloides. El CD14 es una glicoproteína que puede encontrarse anclada a una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI) en la membrana de monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, o bien, soluble en la circulación (Ulevitch y Tobias, 1995). El CD14 se asocia físicamente con un complejo proteínico que incluye al TLR4 y una proteína accesoria, MD-2. A pesar de que MD-2 haya perdido el dominio transmembranal, se mantiene asociada con la célula a través de la interacción con el dominio extracelular del TLR4. Parece ser que el complejo TLR4/MD-2 es el responsable del reconocimiento directo de diferentes estructuras del LPS, que varían en función de la especie, proporcionando una alta especificidad al receptor (Akashi y col., 2000; Shimazu y col., 1999).

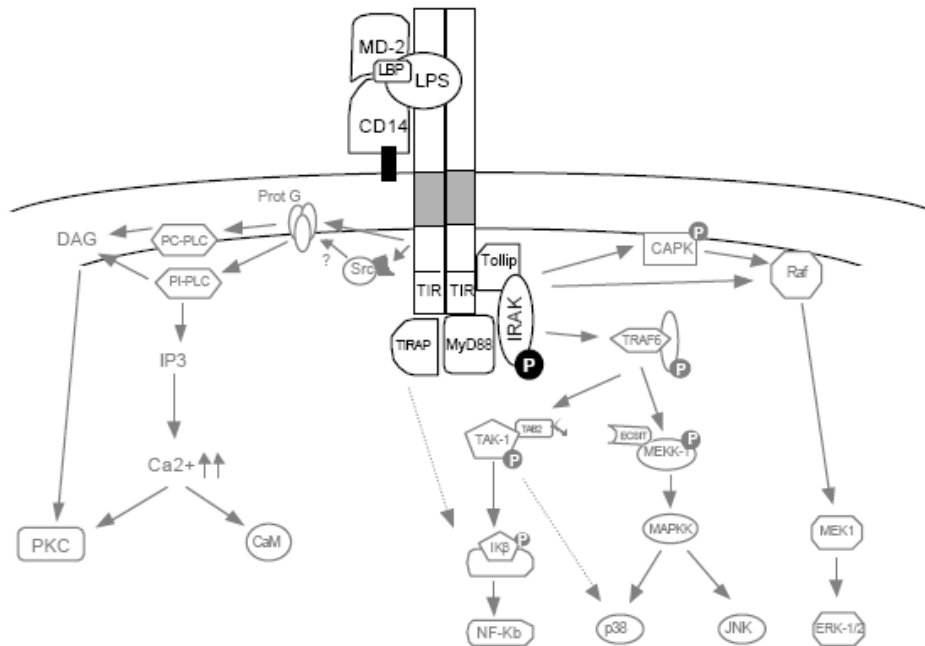


Fig. 3. Vías de señalización por el receptor del Lipopolisacárido. CAPK, ceramidaactivated protein kinase; ERK, extracellular-regulated kinase; IP3, inositol trifosfato; JNK, c-jun N-terminal quinasa; MEK, MAPK/ERK kinase; P, punto de fosforilación; PC-PLC, fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina; PI-PLC, fosfolipasa específica de fosfatidilinositol; PKC, proteína quinasa C; Src, proteína quinasa de la familia Src; TIR, Toll/IL-R homology element; TAK, TNF-activated kinase; TRAF, TNFreceptor-activated factor.

Aunque el LPS es el ligando específico del TLR4, se ha descrito que este receptor puede reconocer y mediar la respuesta inflamatoria frente a otras moléculas, como son el componente anti-tumoral taxol, la proteína HSP60 (Heat-shock protein 60) liberada en condiciones de necrosis celular, el EDA (extra domain A) producido por la degradación de la fibronectina en lesiones tisulares, y la proteína F del virus respiratorio sincicial (RSV) (Underhill y Ozinsky, 2002). Así como no se descarta la existencia de otras moléculas no vinculadas al receptor capaces de reconocer, con baja afinidad, al LPS e incluso, transmitir algún tipo de señal a altas concentraciones de LPS (Kielian y Blecha, 1995); por ejemplo, se ha descrito que el complejo CD11b-CD18 puede reconocer a dos ligandos del TLR4, el LPS y el Taxol (Bhat y col., 1999; Wright y Jong, 1986).

Cuando los macrófagos, ya sea por la unión a IFN- γ o a productos bacterianos como el LPS, cambian sus características, se maximizan sus acciones antibacterianas, aumenta su capacidad de presentar antígenos y de secreción de algunas citocinas, entre otros cambios. Estos cambios en la función y fenotipo se conocen como la activación de los macrófagos.

3.3.1. Activación clásica de los macrófagos

Los macrófagos activados son células efectoras de la inmunidad celular que actúan para eliminar los microorganismos fagocitados. Esta activación consta de la aparición de cambios cuantitativos que implican la síntesis de proteínas que dan a los macrófagos la facultad de llevar a cabo funciones que los macrófagos sin activar, o sus precursores, los monocitos, no pueden realizar (Abbas, A., 2003).

Los linfocitos T CD4⁺ T_H1 y CD8⁺ activan a los macrófagos mediante señales mediadas por contacto producidas por las interacciones CD40L-CD40 y por la citocina IFN- γ . Cuando los linfocitos efectoras T_H1 y CD8⁺ son estimulados por un antígeno, secretan citocinas, en particular IFN- γ y expresan CD40L. CD40L se une a CD40 sobre los macrófagos que están presentando antígenos a los linfocitos T y activan una señal de transducción intracelular que es similar a las vías activadas por los receptores de TNF. El requisito de que exista una interacción entre CD40-CD40L para la activación de los macrófagos asegura que estos macrófagos que están presentando antígenos a los linfocitos T sean los que se activen con mayor eficacia (Abbas, A., 2003).

Una vez activado, el macrófago desempeña diversas funciones, es decir, en respuesta a CD40 y a IFN- γ , se ve aumentada en estas células la producción de varias proteínas. La unión de CD40 activa los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, mientras que IFN- γ activa los factores de transcripción STAT-1 e IRF-1. Entonces en respuesta a estas señales los macrófagos sintetizan mayores cantidades de proteínas responsables de las funciones efectoras de la inmunidad celular. Entre estas funciones se encuentran la destrucción de microorganismos que han fagocitado por la acción de intermediarios reactivos del oxígeno, óxido nítrico y enzimas lisosómicas que son bactericidas. Los macrófagos activados

estimulan la inflamación aguda mediante la secreción de citocinas como TNF, IL-1 y quimiocinas, y mediadores lipídicos de vida corta. La acción colectiva de estas moléculas consiste en producir una inflamación local rica en neutrófilos, los cuales fagocitan y destruye los a microorganismos infecciosos. También se liberan otras citocinas que tienen funciones en la inmunidad celular como la IL-12 e IL-18. (Mosser, D, 2003); así como un aumento en la expresión de moléculas del MHC y coestimuladores (Abbas, A., 2003).

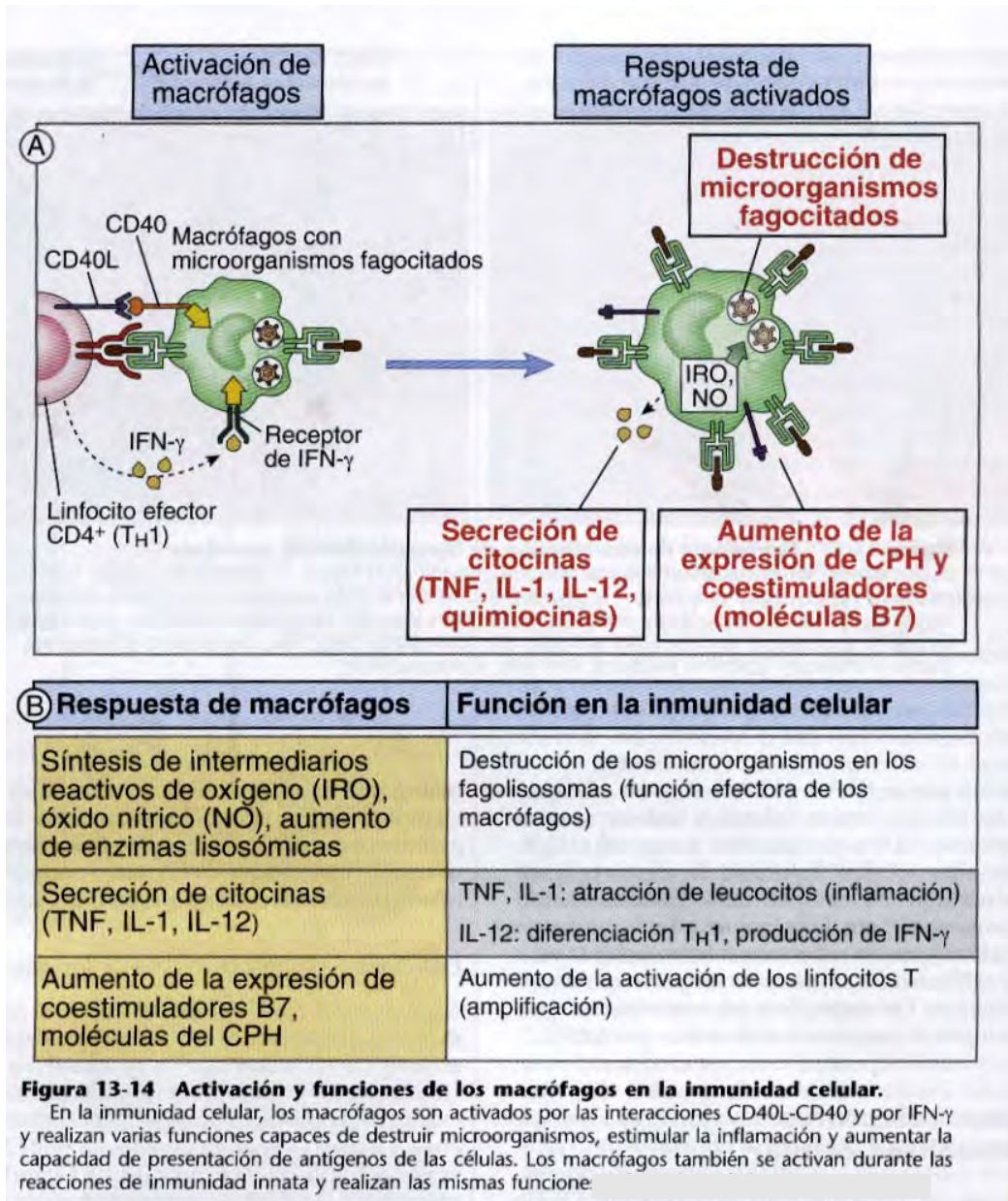


Figura 13-14 Activación y funciones de los macrófagos en la inmunidad celular.

En la inmunidad celular, los macrófagos son activados por las interacciones CD40L-CD40 y por IFN- γ y realizan varias funciones capaces de destruir microorganismos, estimular la inflamación y aumentar la capacidad de presentación de antígenos de las células. Los macrófagos también se activan durante las reacciones de inmunidad innata y realizan las mismas funciones.

Fig. 4. Activación y funciones de los macrófagos en la inmunidad celular (Abbas, A., 2003).

3.3.2. Activación alternativa de los macrófagos

El concepto de la activación “clásica” de los macrófagos data de la década 1960, a partir de los estudios de Mackaness y sus colaboradores (Mackaness, G. *et al.* 1964) quienes mostraron que la infección de ratones con el bacilo *Mycobacterium bovis* o *Listeria monocytogenes* aumentó la actividad antimicrobiana de los macrófagos en una manera estímulo-dependiente, pero no de manera antígeno-específica (Gordon, S, 1999). Estudios posteriores a esas fechas han demostrado que un tipo de activación de los macrófagos depende de los productos de los linfocitos T cooperadores de la clase T_H1 y de las células NK, entre estos productos se habla principalmente del IFN- γ (Dalton, D. *et al.* 1993) y la IL-12 e IL-18 producidas por células presentadoras de antígeno.

De hecho la activación de los macrófagos depende del ambiente de citocinas, de modo que los macrófagos se pueden diferenciar en diferentes poblaciones para desarrollar diferentes funciones inmunológicas (Noël, W., *et al.* 2004)

Un poco menos conocido es el caso de la **activación alternativa de los macrófagos** por IL-4 e IL-13, citocinas que son producidas generalmente en respuestas tipo T_H2. Se ha observado que IL-4 e IL-13 inducen algunos cambios fenotípicos diferentes a aquellos producidos por IFN- γ (activación clásica) e IL-10 (desactivación). IL-4 e IL-13 regulan positivamente en los macrófagos la expresión del receptor de manosa y de moléculas del MHC tipo II; con lo que se estimula la endocitosis y la presentación de antígeno; y esto induce la secreción de quimiocinas selectivas como CCL2 y CCL17; y enzimas intracelulares como la arginasa (Gordon, S. 2003).

El concepto de activación alternativa de los macrófagos no ha sido profundamente estudiado en relación con la heterogeneidad y la diferenciación de estas células. Ha sido mucho menos estudiado que la activación de los macrófagos por el IFN- γ (Ehrt, s. *et al.* 2001) o la activación directa de genes por estímulo con LPS o microorganismos (Boldrick, J. *et al.* 2002; Nau, G. *et al.* 2002). Se ha considerado la posible relevancia de los

macrófagos alternativamente activados (aaM ϕ) en condiciones como el asma y la arterosclerosis.

Como en otros casos, el intento de simplificar el concepto de activación alternativa de los macrófagos resultó en ampliar el término, incluyendo una gran variedad de estímulos inmunomoduladores y respuestas por parte de los macrófagos (Goerdts, S. y Orfanos, C. *et al.* 1999; Tzachanis, D. *et al.* 2002).

De forma paralela a las respuestas T_{H1} y T_{H2}, tenemos a los macrófagos clásicamente activados y a los de activación alternativa. Estos últimos median la tolerancia y los procesos de inflamación. Las respuestas inflamatorias son necesarias para eliminar agentes infecciosos o tóxicos, pero es necesario que, una vez inducida esta respuesta, sea controlada (Goerdts, S. Politz, O. *et al.* 1999).

Se sabe que de forma clásica, los macrófagos secretan IL-12 induciendo la diferenciación de células T vírgenes hacia un fenotipo T_{H1} y viceversa, las células T_{H1} dirigen la diferenciación de los macrófagos hacia un perfil proinflamatorio por medio del IFN- γ . En contraste, los agentes antiinflamatorios tales como la IL-4 y los glucocorticoides, así como la IL-10 y el factor transformante del crecimiento- β , han demostrado que inhiben la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos. Este descubrimiento se interpretó como la desactivación de los macrófagos. Aunque más recientemente se ha observado que la IL-4 y los glucocorticoides inducen el incremento en los macrófagos de la expresión del receptor de manosa así como de otros receptores. (Goerdts, S. Politz, O. *et al.* 1999). Desde que esto se comprobó contra la simple idea de la desactivación de los macrófagos, Gordon y sus colaboradores (Stein, M., *et al.* 1992) introdujeron el concepto de activación inmunológica alternativa de los macrófagos.

Los macrófagos alternativamente activados (aaM ϕ) son diferentes en la expresión de genes en comparación con los clásicamente activados (caM ϕ) hasta en un 25% (Ehrt, S. *et al.* 2001). Entre estas diferencias se encuentra que los aaM ϕ sobreexpresan el receptor de manosa, no producen NO (no se expresa la sintasa inducible de NO, iNOS) ni radicales de

oxígeno, por el contrario, se activa la arginasa (Rutschman, R. *et al.* 2001) por lo que tiene comprometida su capacidad de matar patógenos intracelulares. Y aunque se ha observado que sobreexpresan algunas moléculas de tipo MHC-II, los aaMφ no son células presentadoras de antígeno eficientes y, de hecho son células que en algunos casos inhiben la proliferación de los linfocitos T, es decir, tienen actividad supresora sobre las células T (Schebesch, C. *et al.* 1997).

Estos macrófagos producen niveles elevados de fibronectina y de matriz asociada a proteína βIG-H3 (Gratchev, A. *et al.* 2001). Promueven la fibrogénesis por parte de los fibroblastos (Song, E. *et al.* 2000); la inducción de arginasa en estas células permite la biosíntesis de poliamina y prolina, promoviendo el crecimiento celular, la formación de colágeno y la reparación tisular (Hesse, M. *et al.* 2001), y es que la arginasa producida por los macrófagos alternativamente activados metaboliza la arginina hacia urea y ornitina, un precursor de poliaminas y prolina. También se han observado dos factores de transcripción, FIZZ1 y Ym1, que se presentan en estos aaMφ (Raes, G. *et al.* 2002).

Así que la activación clásica de los macrófagos presenta una expresión de genes diferente a la activación alternativa, lo que conlleva que estos dos tipos de macrófagos sintetizen diferentes sustancias, expresen diferentes moléculas y por lo tanto desempeñen diferentes funciones (Tabla 2).

	Macrófagos clásicamente activados	Macrófagos alternativamente activados
Señales de activación	IFN- γ TNF	IL-4, IL-13 Glucocorticoides
Productos secretados	↑TNF, ↑IL-12 ↑IL-1, IL-18, IL-6	↑IL-1RA, ↑IL-10
Marcadores biológicos	↑MCH-II ↑CD86 ↓Receptor de manosa	↑Receptor de manosa ↑Receptores Scavenger ↑CD23
Moléculas reactivas	NO, O ₂ ⁻	Ninguna conocida
Producción de quimiocinas	IP-10, MIP-1 α , MCP-1	AMAC-1

Tabla 2. Diferencias entre macrófagos clásica y alternativamente activados. Los aaMφ y los caMφ responden a diferentes señales de activación, secretan diferentes productos y quimiocinas y presentan diferentes marcadores biológicos.

3.3.3. aaMφ en infecciones con protozoarios

Los protozoarios son eucariontes unicelulares en su mayoría organismos de vida libre, sin embargo, existen algunos con gran importancia clínica. Estos parásitos presentan una estructura interna relativamente compleja, y pueden presentar elementos de locomoción. Además estos parásitos presentan diferentes estadios durante su ciclo de vida.

Durante infecciones con protozoarios tales como *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Plasmodium* o *Trypanosoma*, la respuesta proinflamatoria, dependiente de IFN- γ , es necesaria para controlar la parasitemia, principalmente en la fase aguda de la infección (Kropf, P. *et al.* 2004; Peluffo, G. *et al.* 2004; Walther, M. *et al.* 2006). Sin embargo, dependiendo de alguno factores como la etapa de infección, el hospedero puede producir citocinas de perfil T_H2, como IL-4 e IL-13, suprimir la producción de NO, y en lugar de este se activa una vía metabólica alterna para la arginina, catalizada por arginasa-1.

Es decir, los protozoarios logran modular la respuesta inmunitaria, de un perfil T_H1 a uno T_H2, logrando su establecimiento en el hospedero. Esta modulación de la respuesta inmunitaria da lugar a los llamados macrófagos alternativamente activados (Gordon, S. 2003).

Trypanosoma

El Tripanosoma africano, entre cuyas especies se encuentran *T. brucei* y *T. congolense*, es un protozooario extracelular que causa la enfermedad del sueño en los humanos y el padecimiento llamado Nagana en el ganado. Se ha aceptado actualmente que el desarrollo de un ambiente de citocinas de tipo T_H1 es esencial para controlar la etapa temprana de la infección (Hertz, C. J. *et al.* 1998). Mientras que el papel de la respuesta inmunitaria T_H2 en la tripanosomiasis sigue siendo controversial.

Con el uso de modelos murinos de la infección con *Trypanosoma* se ha observado que el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora se ve correlacionada con un cambio de la

respuesta T_H1 en las primeras etapas de la infección hacia una respuesta de tipo T_H2 (IL-4, IL-10, IL-13) en las etapas posteriores o crónicas (Namangala, B. *et al.* 2001; Noël, W. *et al.* 2002). Este cambio en el ambiente de citocinas es paralelo a un cambio en el estado de activación de los macrófagos, los cuales pasan de un estado caM ϕ a un estado de aaM ϕ en las fases tardías de la infección.

Durante las etapas tempranas de la infección, los caM ϕ inducidos por IFN- γ limitan el desarrollo del parásito mediante la secreción de moléculas tóxicas para éste, como NO y TNF (Vincendeau, P. *et al.* 2003; Magez, S. *et al.* 1999); así que el surgimiento de los aaM ϕ en las etapas tardías podrían limitar la patología causada por las moléculas proinflamatorias de las etapas tempranas de la tripanosomiasis.

La Tripanosomiasis americana (*T. cruzi*), conocida como enfermedad de Chagas, es causada por un protozooario intracelular que infecta macrófagos y células B. Así que el hecho de que los linfocitos T citotóxicos respondan contra las células infectadas es importante como protección durante la enfermedad de Chagas. Además la respuesta T_H1 que involucra citocinas como IL-12, IL-18, IFN- γ , y la producción de NO por los macrófagos, favorecen el control de la enfermedad en etapas tempranas (Rodrigues, M. M. *et al.* 2000). Sin embargo, si la respuesta T_H1 no es controlada, es capaz de causar daño. Con respecto al punto anterior IL-4, IL-6 e IL-10 se han visto implicadas en la resistencia a *T. cruzi* ya que balancean el ambiente proinflamatorio que se presenta en la enfermedad temprana (Abrahamsohn, I. A. *et al.* 2000; Gao, W y Pereira, M. A. 2002).

Se ha observado que la inmunización de ratones con el antígeno cruzipaina, produce un alto nivel de secreción de citocinas T_H2 (IL-4, IL-5, IL-10), y niveles bajos de IFN- γ e IL-12 (Giordanengo, L. *et al.* 2002). Además los macrófagos estimulados con este antígeno presentan un aumento en la actividad de arginasa y secretan IL-10 y TGF- β (Stempin, C. *et al.* 2002). De modo que *T. cruzi*, por medio de cruzipaina, induce la activación alternativa de los macrófagos.

Leishmania

También en la infección causada por *Leishmania*, que es un protozooario intracelular responsable de varios padecimientos, se han reportado macrófagos alternativamente activados. Los macrófagos activados por citocinas T_H1 como $IFN-\gamma$ y TNF pueden controlar la infección mediante la activación de iNOS. Sin embargo, estos parásitos han desarrollado estrategias para resistir la fusión del fagolisosoma y así sobrevivir dentro de las células. *Leishmania* puede inhibir la producción de IL-12 e inducir IL-10 y TGF- β , con lo que se logra un cambio en la respuesta inmunitaria de un perfil T_H1 a un perfil T_H2 , lo que produce susceptibilidad a la enfermedad (Scharton-Kersten, T- *et al.* 1995).

Existe evidencia indirecta de que aaM ϕ surgen de un ambiente T_H2 , facilitando la diseminación del parásito en el organismo (Iniasta, V. *et al.*, 2001). La incubación de los macrófagos con IL-4 anterior a la infección con *Leishmania major* o *Leishmania infantum*, dirige el metabolismo de L-arginina, a través de arginasa, hacia la síntesis de poliamina, lo que promueve el crecimiento intracelular del parásito.

3.3.4. aaM ϕ en infecciones con helmintos

Los parásitos de tipo helminto son un grupo muy diverso de organismos que presentan morfologías muy diversas, estructuras accesorias y comportamientos sexuales y alimenticios característicos, así como diversos estadios en sus ciclos de vida.

Este tipo de parásitos se ha visto involucrado con la presencia de aaM ϕ , más aún, los estudios que mejor apoyan el concepto de estos macrófagos han sido realizados en modelos de infecciones por helmintos. Los helmintos han desarrollado mecanismos complejos por los cuales logran evadir y modular la respuesta inmunitaria. Las infecciones con estos parásitos inducen una fuerte polarización de la respuesta inmunitaria tipo T_H2 asociada frecuentemente con una deficiente respuesta proliferativa de las células T. Se ha sugerido que los macrófagos pueden ser un blanco de la inmunomodulación ya que se ven alterados

cuando un hospedero experimenta una infección crónica o una exposición crónica a los antígenos de parásitos helmintos (Reyes, J. L., Terrazas, L. I. 2007).

La respuesta inmunitaria hacia una infección con helmintos es característica debido al perfil de citocinas que induce, tales como altos niveles de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; y también altos niveles de anticuerpos específicos tales como IgG1 e IgE; también de igual manera se ve aumentada la población de algunas células tales como eosinófilos y mastocitos (Maizels, R. M. *et al.* 2003). Se han observado entonces dos poblaciones celulares reguladoras que se presentan en infecciones con helmintos, las células T reguladoras (Wilson, MS y Maizels, R. *et al.* 2006) y los macrófagos alternativamente activados (Loke, P. *et al.* 2002; Rodríguez-Sosa, M. *et al.* 2002).

Brugia malayi

La presencia de aaM ϕ se ha observado en diversos modelos experimentales con estos parásitos, como es el caso de la infección con el nemátodo *Brugia malayi*, en donde los macrófagos suprimen la proliferación de las células T ante la primera estimulación con un antígeno específico. Esta actividad supresora no involucra factores solubles como el NO, la PGE₂ o IL-10, entre otras, es más bien un evento contacto dependiente (Loke, P. *et al.* 2000).

Taenia crassiceps

Otro ejemplo de la polarización de la activación de los macrófagos en infecciones con helmintos es el caso del modelo murino de infección con el céstodo *Taenia crassiceps*, que es el modelo para la cisticercosis humana por *Taenia solium*. Además existen estudios que indican que en humanos inmunocomprometidos se puede llegar a desarrollar cisticercosis por *T. crassiceps* (Francois, A. Favennec L, Cambon-Michot, *et al.* 1998; Heldwein, K. *et al.* 2006).

Los ratones infectados con *Taenia crassiceps* desarrollan una respuesta inmunitaria de tipo T_H1 (IL-12, IFN- γ , NO, IgG2a) en las primeras fases de la infección (en tiempos menores a 4 semanas); esta respuesta es reemplazada por un perfil T_H2 cuando la infección se encuentra en una etapa crónica (mayor a 4 semanas) (Rodríguez-Sosa, M. *et al.* 2002).

Estos macrófagos encontrados en fases crónicas de infección con *T. crassiceps* han presentado actividad de arginasa, revelan un incremento en la expresión de moléculas del MHC-II, CD40, CD86, CD23 y CCR5 (Rodríguez-Sosa, M. *et al.* 2002). Además estos macrófagos se han visto asociados a una pobre capacidad de inducir proliferación de células T contra un antígeno específico.

Una característica muy benéfica de este modelo murino de infección es que se logra a través de la inyección intraperitoneal de metacéstodos de *T. crassiceps*, los cuales presentan un tipo de reproducción asexual, la gemación (Chau CY y Freeman RS, 1976), lo que permite el fácil mantenimiento de la cepa en el laboratorio ya que después de varias semanas se obtienen miles de estos metacéstodos de la cavidad peritoneal de los ratones infectados. Además se han establecido muchas similitudes antigénicas entre los metacéstodos de *T. solium* y *T. crassiceps* (Ishida MM. *et al.* 2003).

Otros helmintos

Se han estudiado otros modelos de infección por helmintos en los cuales también se ha observado la presencia de aaM ϕ , por mencionar algunos se tiene el caso de otro nemátodo, *Litomosoides sigmodontis*, en donde se ve regulada positivamente la expresión de Fizz1 y Ym1 (Nair, MG. *et al.* 2003; Nair, MG. *et al.* 2005); también está el caso del tremátodo *Schistosoma mansoni*, que a principios de los 90's fue estudiado por el equipo de investigación de Stadecker quienes encontraron que macrófagos aislados de granulomas de ratones infectados de entre 7 y 8 semanas de infección con *S. mansoni* eran capaces de inhibir la respuesta de las células T a estímulos específicos y policlonales (Stadecker, MJ. *et al.* 1990).

4. HIPÓTESIS:

La fosforilación de la molécula STAT1 α en respuesta a IFN- γ se encuentra alterada en macrófagos alternativamente activados obtenidos de animales infectados con *Taenia crassiceps*.

4.1 HIPÓTESIS NULA:

La fosforilación de la molécula STAT1 α en respuesta a IFN- γ se encuentra normal en macrófagos alternativamente activados obtenidos de animales infectados con *Taenia crassiceps*.

5.1 OBJETIVO GENERAL:

Identificar el estado de fosforilación de la molécula STAT-1 α en macrófagos alternativamente activados obtenidos de animales infectados con *Taenia crassiceps*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

Corroborar que en el modelo de infección crónica con *Taenia crassiceps* se generan macrófagos con características que sustentan su activación alternativa.

Comparar la expresión de diversas moléculas de membrana entre los macrófagos alternativa y clásicamente activados.

Evaluar la respuesta a IFN- γ de macrófagos alternativamente activados a través de la fosforilación de la molécula STAT-1 α .

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con un modelo murino de infección con *Taenia crassiceps*. Los ratones que se manejaron fueron hembras BALB/c de entre 6 - 8 semanas de edad provistas por Harlan-México y mantenidas en el bioterio de la FES Iztacala después de la infección y hasta el momento del sacrificio.

Se manejaron tres grupos de ratones de 5 ratones cada uno. Un grupo control al que se le administró 1.5 mL de solución de tioglicolato IP por ratón cuatro días antes del sacrificio, un grupo con infección aguda con *Taenia crassiceps* (1-2 semanas de infección) y un tercer grupo con infección crónica con el parásito (6- 8 semanas).

6.1 LA INFECCIÓN

La infección se realizó por inyección IP de 25 metacéstodos por ratón de *Taenia crassiceps* de 1-2 mm de diámetro suspendidos en aproximadamente 0.5 mL de SSF. Estos cisticercos se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/c de entre 8 y 15 semanas de infección.

Tanto la infección como la administración de tioglicolato se realizaron de forma que coincidiera la fecha de los tres grupos para el día de sacrificio, el cual se realizó en cámara de CO₂.

6.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS PERITONEALES (PEC's peritoneal exudate cells)

A los ratones de los tres grupos, se les extrajeron las células de la cavidad peritoneal en condiciones de esterilidad por lavado del peritoneo inyectando 5 mL de SSF IP y dando masaje para desprender mayor cantidad de células. Se recolectó la SSF que contenía las PEC's y en el caso de los tratamientos de ratones infectados, que contenía también los metacéstodos de *Taenia crassiceps*. En estos casos se dejaron sedimentar los metacéstodos para separarlos de las células y el sobrenadante se colocó en tubos para centrifuga de 50 ml.

Los tubos que contenían la SSF con las PEC's se centrifugaron a 600 g (2500 rpm) durante 10 minutos (en estas condiciones se realizaron todos los procesos de centrifugación de células). Si se observaba la presencia de eritrocitos, se resuspendía la pastilla en solución de Boyle (0.17 M Tris y 0.16 M cloruro de amonio) y se volvía a centrifugar. Se decantaron los sobrenadantes y se resuspendieron las pastillas en SSF.

6.3 CITOMETRÍA DE FLUJO (Fluorescence Analyzer Cell Sorter, FACS)

Las PEC's obtenidas tal como se indicó anteriormente, se volvieron a lavar con SSF y se centrifugaron después. Se resuspendieron y se contaron por exclusión con azul de Tripán. Una vez contadas se colocaron 500,000 células en tubos para citometría.

Se incubaron las células con anticuerpos marcados con fluorocromos utilizando como medio amortiguador de FACS (200 μ l). Se mantuvieron por media hora a 4° C. Después de este tiempo se agregó más buffer de FACS y se centrifugaron; se desechó el sobrenadante para eliminar los restos de anticuerpos libres. Se realizó otro lavado. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en paraformaldehído. Se analizaron 100,000 células en el citómetro. Por esta técnica se midieron las siguientes moléculas: CD23, GR1, PDL1, PDL2, CD14, TLR2, TLR4, CCR5 e IFN- γ R en los 3 grupos de ratones.

Los anticuerpos usados fueron CD23 (FITC) y CCR5 (PE) de Pharmingen, GR1 (PE/Cy5) e IFN- γ R (PE) de Biolegend y PDL1 (PE), PDL2 (FITC), CD14 (PE), TLR2 (FITC) y TLR4 (PE) de eBioscience.

6.4 ELISA Y RT-PCR

Obtenidas las PEC's se contaron las células viables por exclusión con azul de Tripán, se ajustaron a 6 millones/mL en DMEM completo y se sembraron en placas de 6 pozos, poniendo 1 millón de células por pozo. Se sembraron 4 pozos por cada grupo de ratones. Se incubaron las células por lo menos dos horas a 37° (O₂ 95% + CO₂ 5%). Después de ese

tiempo se eliminaron las células no adherentes (las células adherentes son aproximadamente un 90-95% macrófagos) lavando dos veces con SSF o DMEM. Para cada grupo de ratones (tioglicolato, de infección aguda y de infección crónica) se prepararon los siguientes estímulos, y a cada uno de los 4 pozos de cada grupo de ratones se le agregó un estímulo diferente:

- DMEM solo
- IFN- γ [20 ng/mL]
- LPS [2.5 μ g/mL]
- IFN- γ [20 ng/mL] + [LPS 2.5 μ g/mL]

Las células se mantuvieron en contacto con los estímulos incubándose a 37° C (O₂ 95% + CO₂ 5%) por 24 horas después de las cuales se recolectaron los sobrenadantes para la medición de citocinas por la técnica de ELISA y las células adheridas se lisaron con 500 μ L de Trizol por pozo, los cuales se recolectaron y se guardaron a -20° C hasta la obtención del RNA.

6.5 DETERMINACIÓN DE CITOCINAS. Método de ELISA sandwich

Se analizaron sobrenadantes de cultivo de macrófagos de los tres grupos de ratones por la técnica de ELISA sandwich; se utilizaron placas MaxiSorp; las placas se sensibilizaron, se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS y posteriormente se depositaron 100 μ L de muestra por pozo, y los estándares para la realización de la curva. Después de remover las muestras se colocó el anticuerpo secundario biotinilado; para la detección se utilizó sustrato ABTS (11 mL) con H₂O₂ (100 μ L). Se agregaron 100 μ l por pozo hasta el desarrollo de color. La intensidad de color se midió con el Thermo Labsystems MultiskanAscent a 405 nm: después de bloquear, incubar con el anticuerpo de captura, poner las muestras y la curva y de poner el anticuerpo de detección, las placas se lavaron con Tween-20 al 0.05%. Mediante esta técnica se analizó la producción de IL-12. los anticuerpos usados fueron de Peprotech.

6.6 RT-PCR

Obtenido el lisado de células en medio mL de Trizol, se procedió a la obtención del RNA, para lo cual se realizó una extracción con cloroformo y precipitación con alcoholes fríos. Se centrifugó para obtener las pastillas; se decantó sin perder la pastilla y se dejó secar al aire. Se resuspendieron las pastillas en agua mQ (20-40 µL).

Posterior a este paso se procedió a la conversión del RNA a cDNA, para lo cual se utilizó el kit SuperScript First-Strand (synthesis system for RT-PCR) de Invitrogen, se realizó la amplificación de los genes, utilizando por reacción 50 ng de cDNA.

Se corroboró el tamaño del amplificado mediante electroforesis de las muestras (a las que se les agregó una mezcla de bromofenol y xileno-cianol con glicerol y Syber-green) en gel de agarosa al 1.5%, a 90mV, 150mA por 45 minutos. Después de este tiempo se observó el gel en un scanner con luz UV para corroborar el tamaño del amplificado; por esta técnica se analizaron los genes MMR y GAPDH.

Primers:

MMR	F	CTC gTg gAT CTC CgT gAC AC
	R	gCA ATT ggA gCC gTC TgT gC
GAPDH	F	CTC ATg ACC ACA gTC CAT gC
	R	CAC ATT ggg ggT Agg AAC AC

6.7 WESTERN BLOT

6.7.1 Obtención de proteínas

Se obtuvieron PEC's como se mencionó anteriormente, se contaron por exclusión con Azul de Tripán, se ajustaron y se sembraron en placas de 6 pozos, 6 millones de PEC's por pozo, 4 pozos por cada grupo de ratones. Se obtuvieron células adherentes como se indico anteriormente.

Se prepararon estímulos para cada grupo:

✚ DMEM solo

✚ IFN- γ [20 ng/mL]

✚ LPS [2.5 μ g/mL]

✚ IFN-g [20 ng/mL] + [LPS 2.5 μ g/mL]

Se mantuvieron las células con estos estímulos por 20 minutos. Posteriormente se lavó cada pozo con SSF y se adicionaron 300 μ L de amortiguador de lisis de M ϕ (20mM Tris-HCl pH=8, 1% Triton X-100, 137mM NaCl y 10% glicerol) por pozo además de inhibidor de proteasas (20 μ L por cada pozo). Se realizó un raspado con el embolo estéril de una jeringa en cada pozo para terminar de lisar las células y se homogenizó con la pipeta para lavar el fondo del pozo; se recolectó el lisado. Se congelaron a -70° C hasta la realización de la electroforesis.

6.7.2 Electroforesis de las proteínas

Para el análisis de las proteínas, se mezclaron cantidades iguales de muestra de proteínas y amortiguador de muestra 2x (Tris Base 0.125 M, SDS 4%, Glicerol 20% y mercaptoetanol 10%) y se mantuvieron en baño María en agua hirviendo por 5 minutos. La electroforesis se realizó en gel de proliacrilamida al 10 % en cámara llena con amortiguador de corrida (Glicina 1.44%, Tris Base 0.3025% y SDS 0.1%). Se colocaron 5 μ L de marcador de peso molecular por cada gel, y se cargaron 25 μ L de cada muestra por pozo, se realizó la electroforesis a 90 V, 150 mA, por 2 horas.

6.7.3 Transferencia y bloqueo

La transferencia de las proteínas se realizó mediante sistema de cámara seca. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, esta se bloqueó en leche desnatada al 5% en PBS en agitación ligera durante toda la noche a 4° C. Después de este tiempo se lavaron las membranas suavemente con PBS.

6.7.4 Inmunodetección

Se colocó el anticuerpo primario diluido en leche al 1% en PBS según especificaciones (entre 1:500 – 1:1000). Se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4° C. después de esto se lavó la membrana con PBS-Tween 20 al 0.05%. Se colocó el anticuerpo secundario marcado con HRP diluido en leche al 1% en PBS según especificaciones (entre 1:1000 – 1:2000). Se incubó con este anticuerpo por 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas y se revelaron.

Para revelar se utilizó un kit de luminiscencia ECL Western Blotting Detection Reagents de Amersham. Por esta técnica se evaluaron las proteínas β -Actina, STAT1 y STAT1-P.

Los anticuerpos utilizados fueron Anti β -Actina, HRP conjugado de cabra anti IgG de ratón y HRP conjugado de burro anti IgG de, de Biolegend y Anti STAT1 y Anti STAT1 (pY701) de BD.

7. RESULTADOS

En este trabajo se evaluó la fosforilación de la molécula STAT-1 α en macrófagos alternativamente activados en respuesta al estímulo con IFN- γ . Para sustentar esta tesis también se analizaron parámetros que corroboran la activación alternativa de estas células.

7.1 Amplificación del gen del Receptor de Manosa (MMR). Reacción en cadena de la polimerasa, Transcriptasa Reversa (RT-PCR)

Anteriormente solo se manejaban los conceptos “macrófagos activados” y “no activados”, pero recientemente ha surgido el concepto de activación alternativa de los macrófagos (Gordon, S. 2003).

Para facilitar la identificación del tipo de activación que presenten estas células, se han estudiado moléculas que funcionan como marcadores de activación alternativa, una de ellas es el receptor de manosa (MMR), por medio del cual se reconocen glicanos ricos en manosa presentes en patógenos y está involucrado en su fagocitosis (Abbas, A. 2003).

Dado lo anterior se realizó por RT-PCR el análisis de la expresión este gen, utilizando como control el gen GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). El análisis se realizó en los tres grupos de ratones (sanos, con 2 semanas de infección y con 8 semanas de infección con *T. crassiceps*), y de cada grupo se manejaron 4 muestras diferentes debido a los diferentes estímulos (a las concentraciones indicadas en la metodología) a los que los macrófagos fueron expuestos:

- Sin estímulo
- Lipopolisacárido (LPS)
- Interferón- γ (IFN- γ)
- LPS + IFN- γ

Los resultados de los amplificadores específicos para MMR fueron los siguientes:

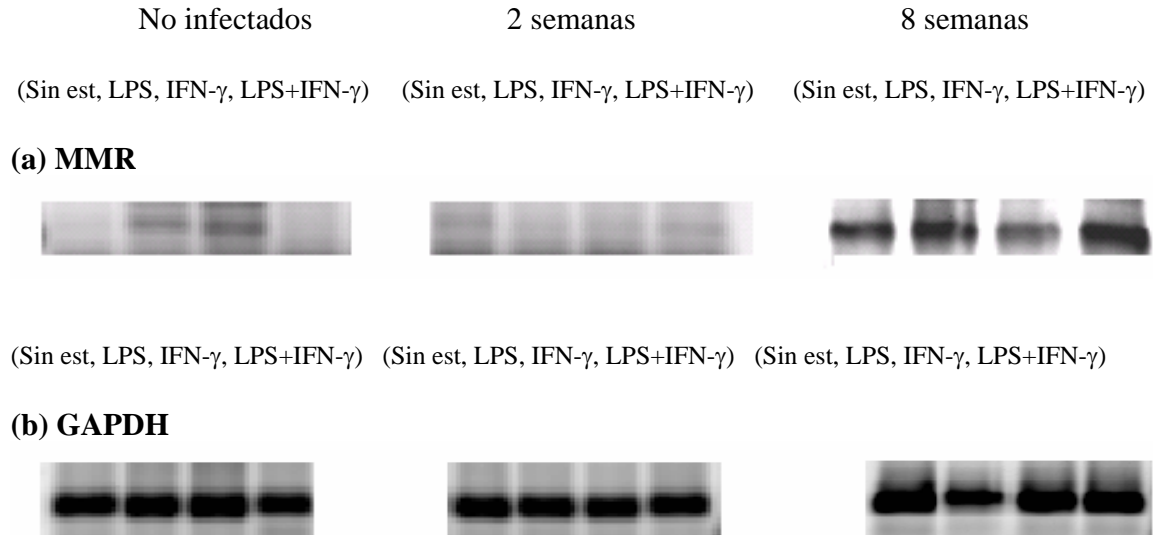


Fig. 5. Amplificados de MMR (a) y GAPDH (b) obtenidos por RT-PCR a partir de RNA de macrófagos. La primera línea de cada grupo de ratones pertenece a una muestra de células sin estímulo, el segundo al estímulo de LPS, el tercero a IFN- γ y el último a muestra de células estimuladas con IFN- γ + LPS (las concentraciones se indican en la metodología).

Se encontró el MMR sobreexpresado en los M ϕ de ratones de 6-8 semanas de infección, a diferencia de los otros dos grupos. También se pudo observar que esta sobreexpresión es independiente a estímulos posteriores, sin embargo el LPS logra aumentar esta sobreexpresión.

7.2 Expresión de moléculas coestimuladoras utilizadas como marcadores de activación alternativa y receptores involucrados en la respuesta proinflamatoria. Citometría de Flujo.

Además del receptor de manosa (MMR), existen otras moléculas que se han identificado como marcadores de activación alternativa, entre estas se encuentran ciertas moléculas coestimuladoras.

Con el fin de corroborar el tipo de activación de los macrófagos obtenidos de peritoneo de ratones de entre 6-8 semanas de infección, se determinó la expresión de algunas de estas moléculas coestimuladoras descritas anteriormente, también se analizó la expresión de receptores involucrados con la respuesta proinflamatoria, entre ellos el IFN- γ R.

Esta medición se realizó mediante Citometría de flujo y el posterior análisis por Histogramas. Las células que se analizaron en los tres grupos de ratones fueron F480⁺ (marcador de macrófagos), a partir de una región de células grandes y granulosas.

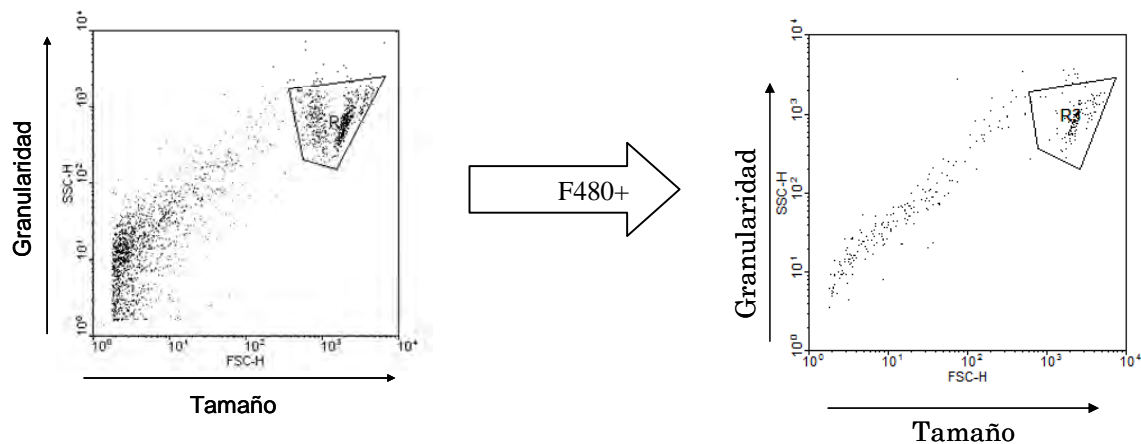


Fig. 6. Región analizada por Citometría de flujo. (a) Región de PECs que contiene a células grandes y granulosas. (b) Región a partir de las células grandes y granulosas que son fenotipo F480⁺ y sobre las cuales se realizó el análisis.

Entre las moléculas coestimuladoras que se analizaron están CD23, CCR5 (Fig. 7), PD-L1 y PD-L2 (Fig. 8). También se analizó GR-1 (Fig. 7) que es un marcador de células de origen mieloide y los receptores TLR2, TLR4 (Fig. 9), CD14 y el IFN- γ R (Fig. 10).

Se observó que las moléculas CD23 y PD-L2 se encontraron sobreexpresadas, mientras que CCR5 y PD-L1 si bien no mostraron sobreexpresión, sí se expresaron en grado similar que en los macrófagos de 1-2 semanas post infección.

Al analizar la expresión de las moléculas tipo Toll se encontró que TLR2 mostró una sobreexpresión en los macrófagos de 6-8 semanas de infección en comparación con los de

1-2 semanas. Sin embargo, los grupos infectados mostraron una mayor expresión de este receptor que los macrófagos obtenidos de ratones inyectados con tioglicolato. En cuanto a la expresión de TLR4, se encontró sobreexpresado en los macrófagos de animales infectados comparados con los del grupo de tioglicolato, de manera interesante, a mayor tiempo de infección hubo mayor incremento en la expresión de TLR4.

De la misma forma la molécula CD14 mostró mayor expresión en los macrófagos de 1-2 semanas, aunque su expresión en el grupo 6-8 semanas post-infección fue notablemente mayor que en el grupo sin infectar. Así CD14 y TLR4 que participan como receptores de LPS se encontraron altamente expresadas en macrófagos alternativamente activados.

Por otro lado, los macrófagos de ratones de 6-8 semanas de infección expresaron el IFN- γ R de forma similar a los macrófagos de infección aguda, e inclusive se encontró este receptor más densamente expresado en los macrófagos de infección crónica; mientras que en los macrófagos del grupo de tioglicolato no pareció haber inducción de la expresión de este receptor.

Citometría de flujo

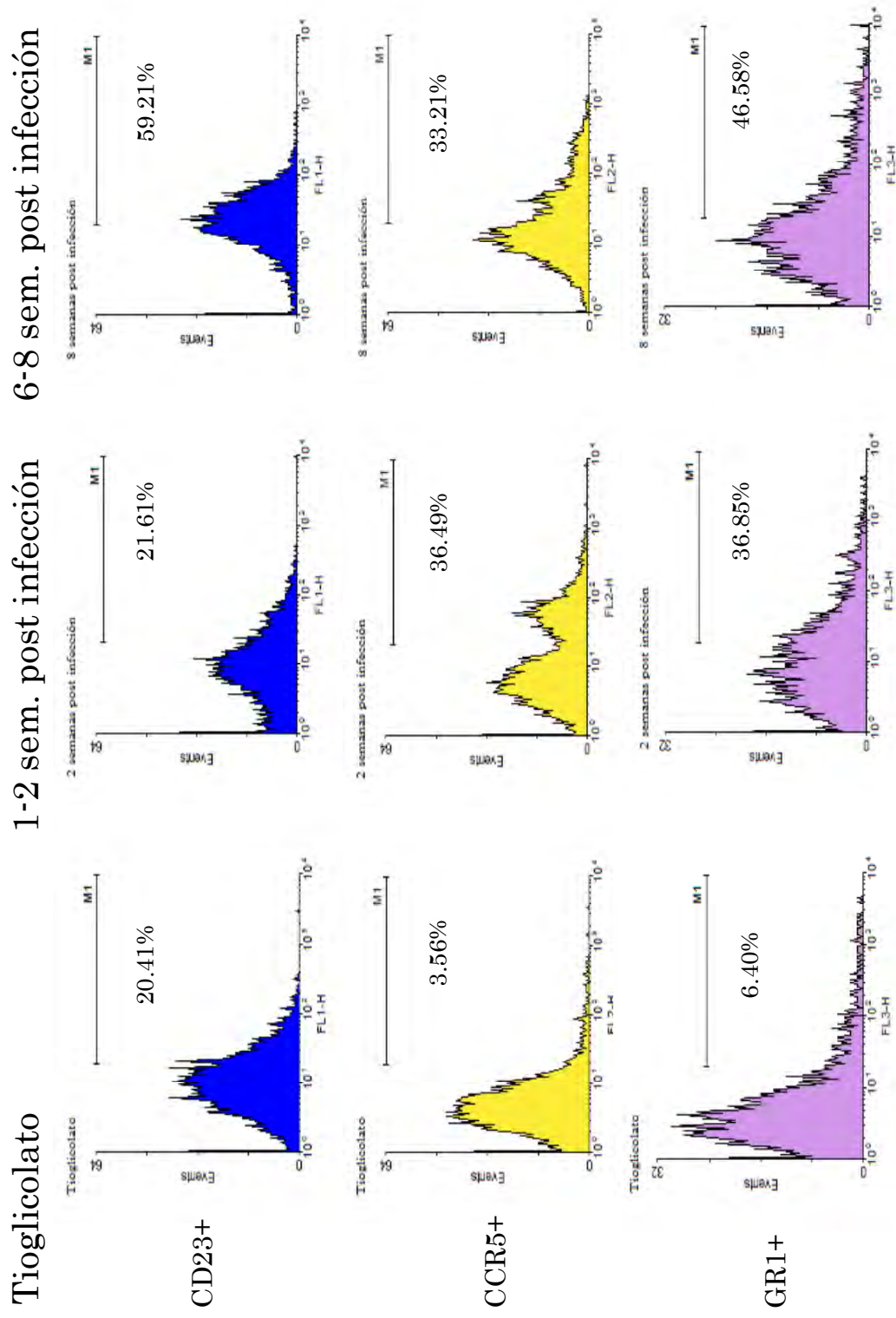


Fig. 7. Histogramas obtenidos al analizar la presencia de CD23, CCR5 y GR1 en células F480+.

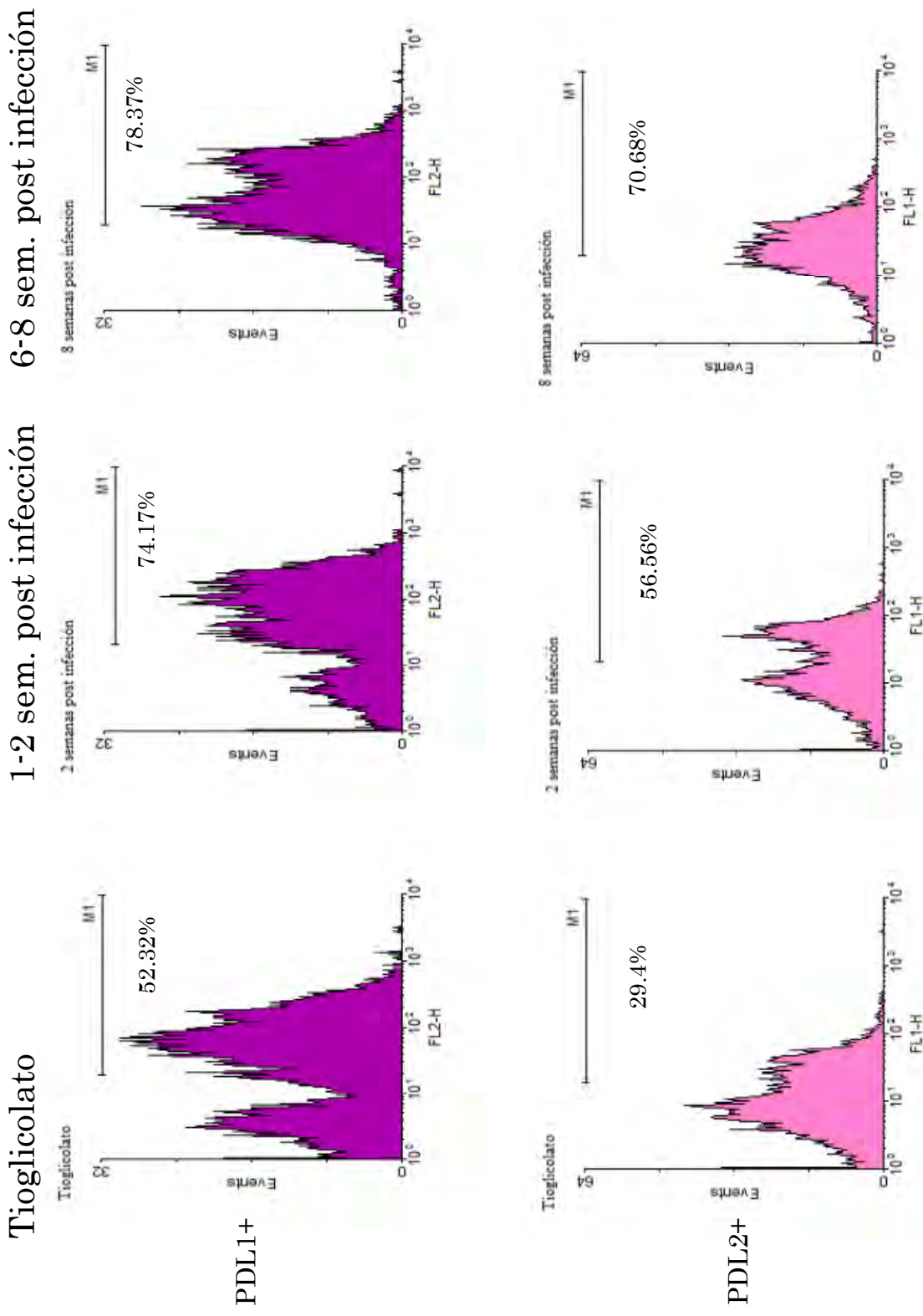


Fig. 8. Histogramas obtenidos al analizar la presencia de PDL1 y PDL2 en células F480+.

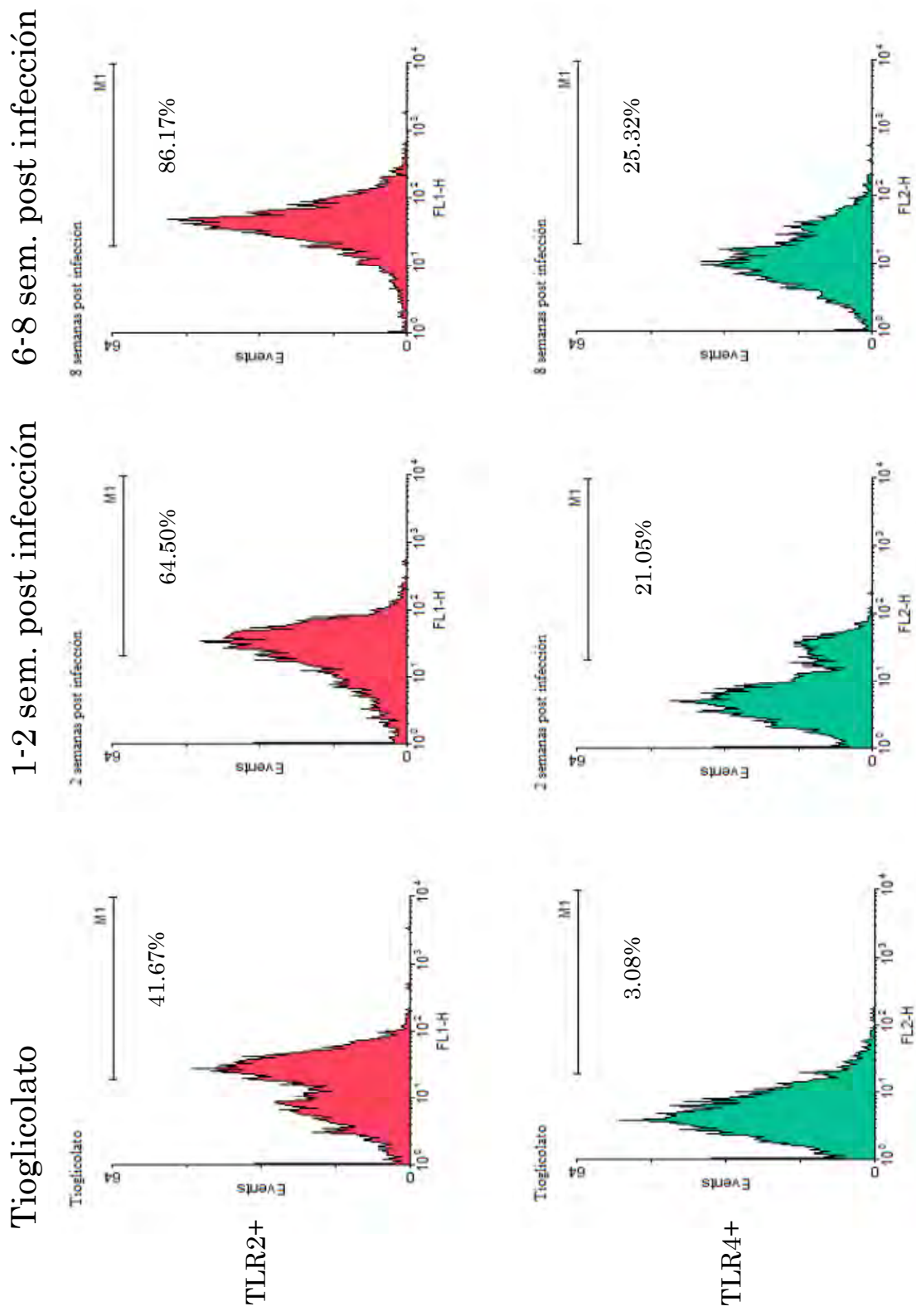


Fig. 9. Histogramas obtenidos al analizar la presencia de TLR2 y TLR4 en células F480+.

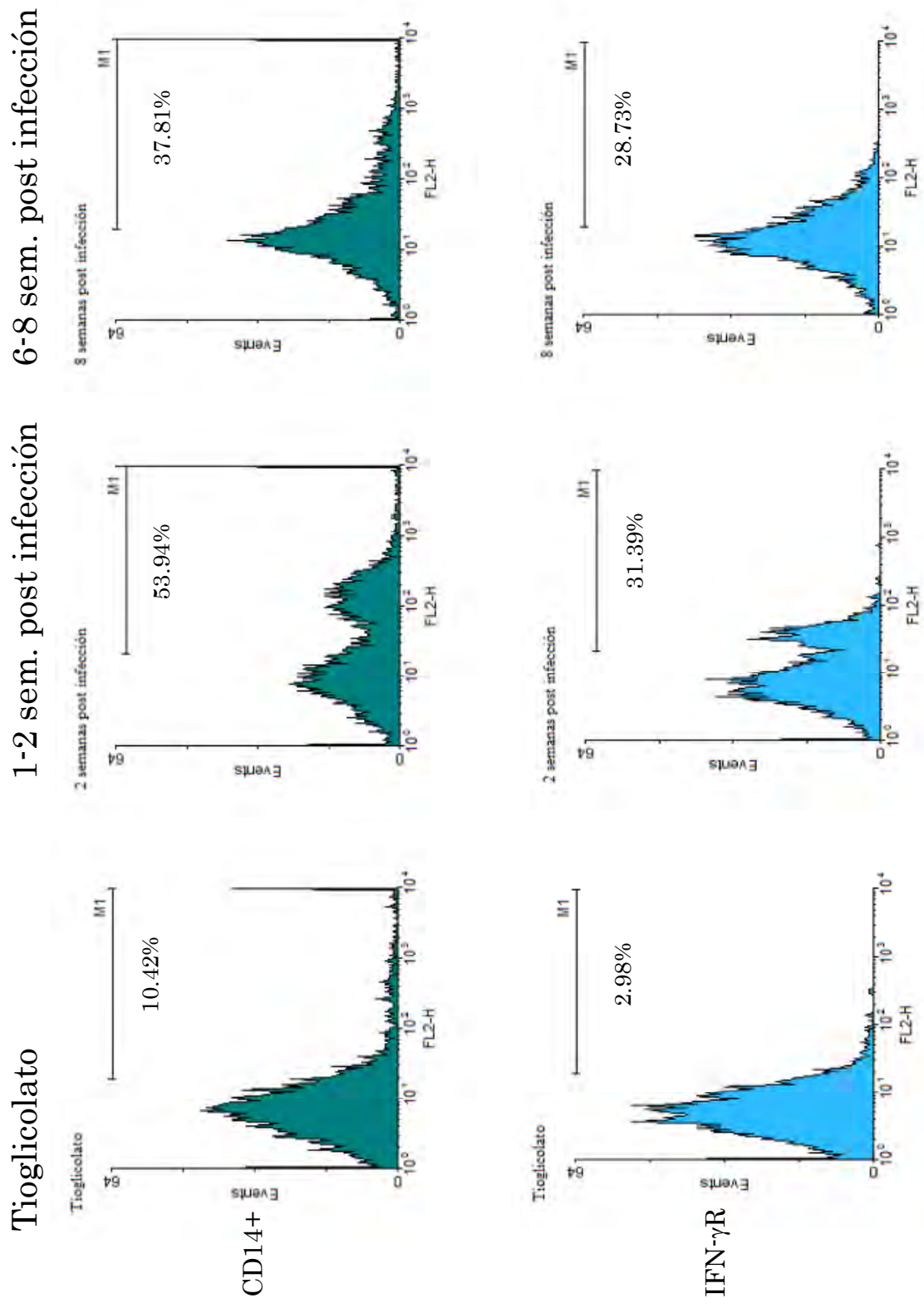


Fig. 10. Histogramas obtenidos al analizar la presencia de CD14 y IFN- γ R en células F480+.

Citometría de flujo. Porcentaje de células positivas y MFI (Intensidad de fluorescencia media)

Marcador	T. infec. (semanas)	% de células positivas	MFI
CD23	0	20.41	36.11
	2	21.61	39.66
	8	59.21	36.53
CCR5	0	3.56	57.52
	2	36.49	65.75
	8	33.21	73.08
GR1	0	6.40	68.17
	2	36.85	56.77
	8	46.58	83.82
PDL1	0	52.32	79.67
	2	74.17	109.46
	8	78.37	90.39
PDL2	0	29.4	40.175
	2	56.56	57.16
	8	70.68	44.295
TLR2	0	41.67	35.31
	2	64.50	43.07
	8	86.17	50.37
TLR4	0	3.08	34.45
	2	21.05	36.66
	8	25.32	46.96
CD14	0	10.42	105.77
	2	53.94	140.35
	8	37.81	86.74
IFN- γ R	0	2.98	36.85
	2	31.39	40.20
	8	28.73	56.33

Tabla. 3. Porcentaje de células positivas e intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada tiempo post-infección y cada tinción.

7.3 La infección con *T. crassiceps* inhibe la producción de IL-12 en los M ϕ estimulados con LPS e IFN- γ . ELISA.

Las infecciones con helmintos logran polarizar la respuesta inmunitaria de un perfil inicial T_H1 hacia uno T_H2. Junto con esta polarización, se han identificado cambios en el fenotipo de los macrófagos, dando lugar a la ya mencionada activación alternativa (Reyes, J. L., Terrazas, L. I. 2007; Maizels, R. M. *et al.* 2003).

Una de las características de este tipo de activación, es la disminución de citocinas proinflamatorias como la IL-12, esta citocina es producida en respuesta a estímulos proinflamatorios como IFN- γ . Y dado que este trabajo tiene como objetivo principal evaluar una proteína de la cascada de señalización del IFN- γ , se decidió realizar el análisis de IL-12 para observar la producción de dicha citocina en los aaM ϕ .

Esta determinación se realizó mediante la técnica de ELISA, en donde se encontró que los macrófagos proinflamatorios (grupo de tioglicolato) cuando son estimulados con LPS, IFN- γ e IFN- γ + LPS, producen altos niveles de IL-12, mientras que en los grupos infectados se observó una clara disminución en la producción de esta citocina.

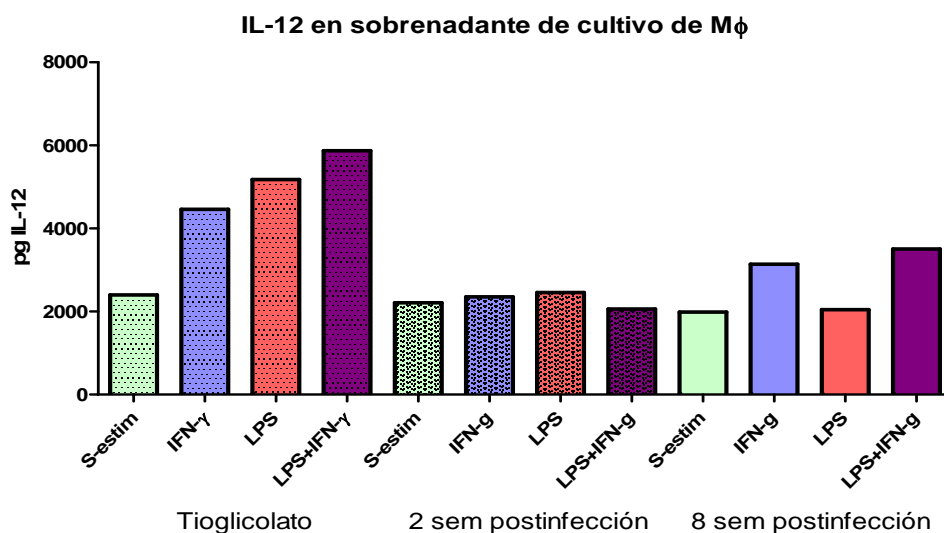


Fig. 11. Determinación de IL-12 mediante la técnica de ELISA. De determinó IL-12 en sobrenadante de cultivo de M ϕ después de 24 horas del estímulo con DMEM, IFN- γ , LPS y LPS-IFN- γ .

7.4 Análisis de la fosforilación de la proteína STAT-1 α . Western Blot (Inmunoelectrotransferencia IET)

Patrón de proteínas de M ϕ de fases aguda y crónica de infección con *T. crassiceps*.

Se ha mencionado que existen diferencias en la expresión de moléculas entre macrófagos clásica y alternativamente activados. Estas diferencias se pudieron evidenciar observando el patrón de proteínas que presenta cada uno de estos M ϕ activados, aún sin precisar de qué proteínas se trata.

Para evidenciar estas diferencias se realizó la electroforesis de proteínas obtenidas de macrófagos tanto de fases tempranas como tardías de infección, estimulados como se indicó en la metodología. El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomasie.

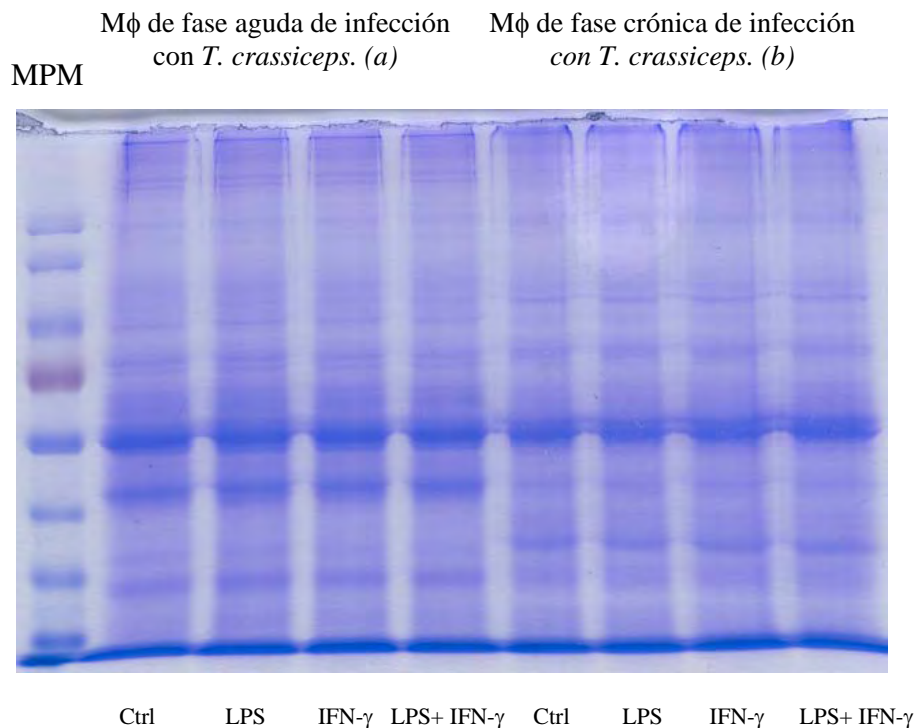


Fig. 12. Patrón de proteínas de macrófagos estimulados. (a) Macrófagos de fases tempranas de infección con *T. crassiceps* (caM ϕ). (b) Macrófagos de fases tardías de infección con *T. crassiceps* (aaM ϕ).

Análisis de la proteína pSTAT-1 α en macrófagos alternativamente activados.

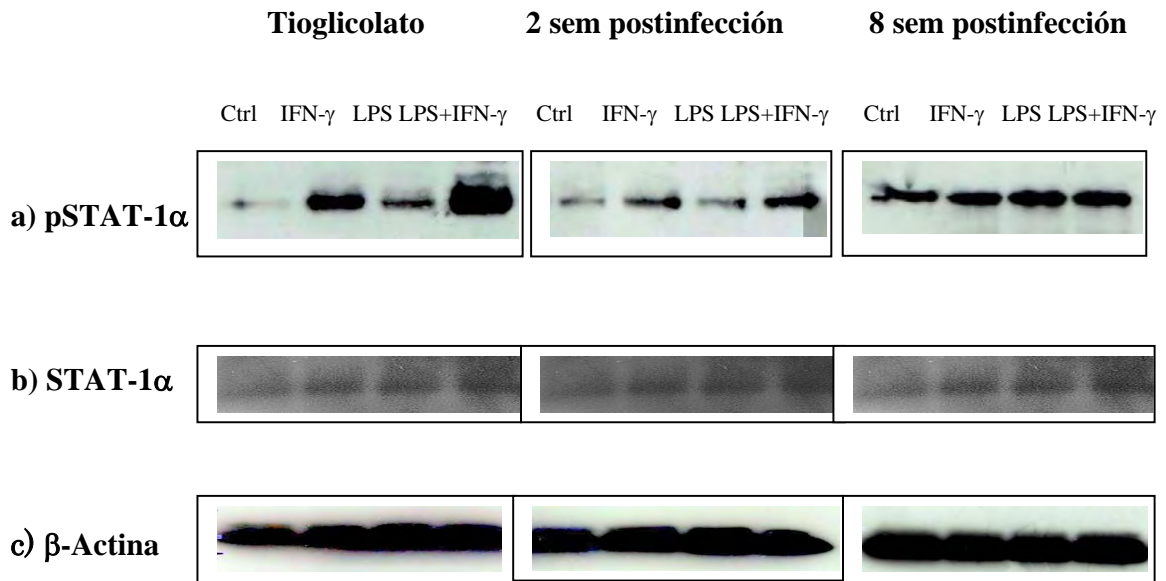
El IFN- γ ejerce su función en los M ϕ a través de unirse a su receptor específico (IFN- γ R) y desencadenar una cascada de señalización vía proteínas JAK/STAT lo que culmina en la transcripción de genes involucrados en la inflamación y respuesta inmunitaria. Existen varias Janus cinasas (JAK) así como 7 diferentes STAT, pero las involucradas en la señalización del IFN- γ son las JAK 1 y 2 y la STAT1. Sin embargo, los aaM ϕ no responden de forma habitual al IFN- γ (Fig. 11). Se podría pensar que se debe a una deficiencia en la expresión del IFN- γ R, pero en este trabajo como en otros previos se ha demostrado que no existen diferencias significativas que indiquen anomalías en el receptor (Fig. 10).

Dado lo anterior quisimos estudiar a la proteína pSTAT-1 α , y observar si existen diferencias entre la fosforilación de esta molécula entre los M ϕ de fases tempranas de infección (caM ϕ) con *T. crassiceps* y los de infecciones crónicas (aaM ϕ) con este mismo parásito. Además de identificar a la proteína pSTAT-1 α , se identificaron las proteínas STAT-1 α total y β -Actina, la cual se utilizó como control en el análisis por densitometría (Fig. 14 y 15).

En ambos experimentos (Fig. 13) se observa que en los grupos de tioglicolato y de 2 semanas post-infección, la fosforilación de la molécula STAT-1 α es dependiente al estímulo con IFN- γ y, que en el caso del doble estímulo (IFN- γ + LPS) la fosforilación parece verse aumentada. Mientras que el LPS por si solo no logra inducir la fosforilación de la molécula. En estos dos grupos también se observa que en el caso del tratamiento que no incluye estímulo, la fosforilación es prácticamente nula.

Por otra parte, en el primer experimento se observó un alto nivel basal de fosforilación de STAT-1 α , pero no se ve modificado de forma alguna por ninguno de los estímulos. Es decir, parece ser que no se presenta fosforilación de STAT-1 α dependiente de IFN- γ ni de LPS. En el segundo experimento no se observa fosforilación ni basal ni en respuesta a ninguno de los estímulos (Fig. 13).

Experimento 1



Experimento 2

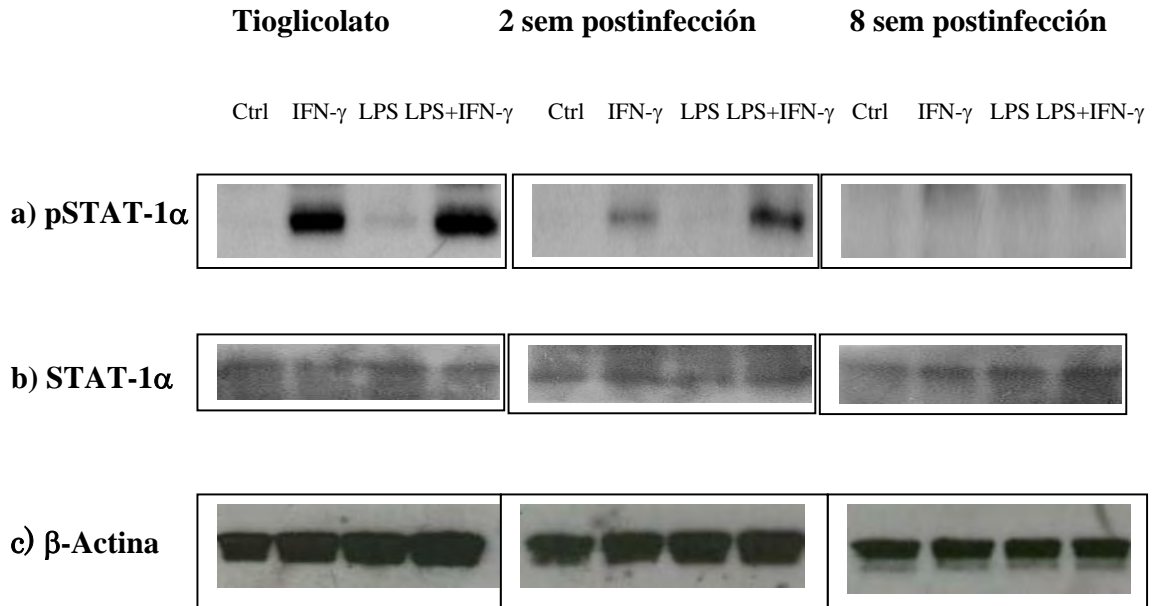


Fig. 13. Imágenes de proteínas identificadas por Western Blot. Se muestra las proteínas STAT-1P (a), STAT-1 total (b) y la proteína control β -Actina (c). Cada grupo de tiempo de infección se incubó con diferentes estímulos (IFN- γ , LPS y LPS + IFN- γ) y se mantuvo una muestra solo con medio (control).

Densitometrías del experimento 1

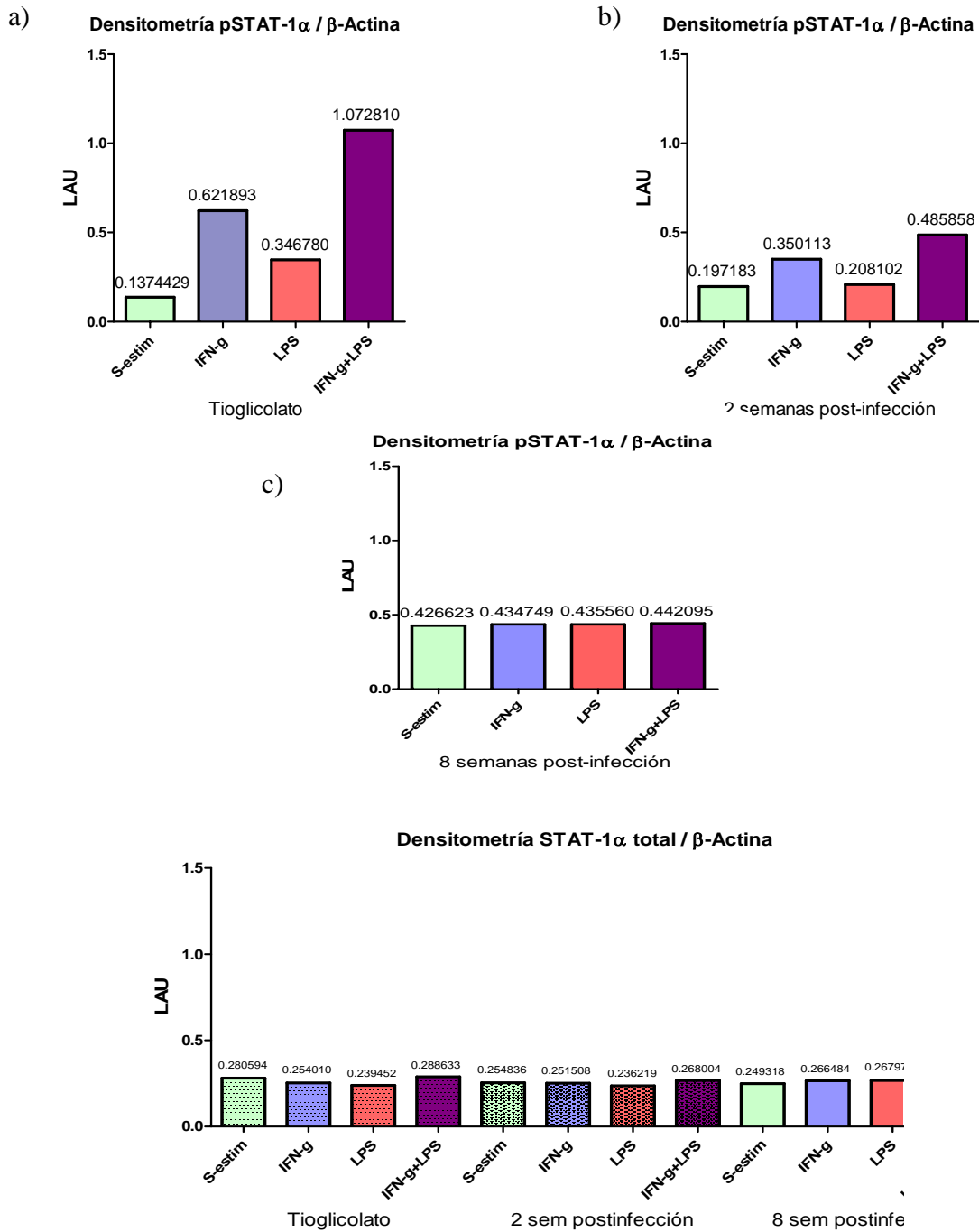


Fig. 14. Densitometrías del experimento 1. a) Tioglicolato, b) 2 semanas postinfección y c) 8 semanas postinfección.

Densitometrías del experimento 2

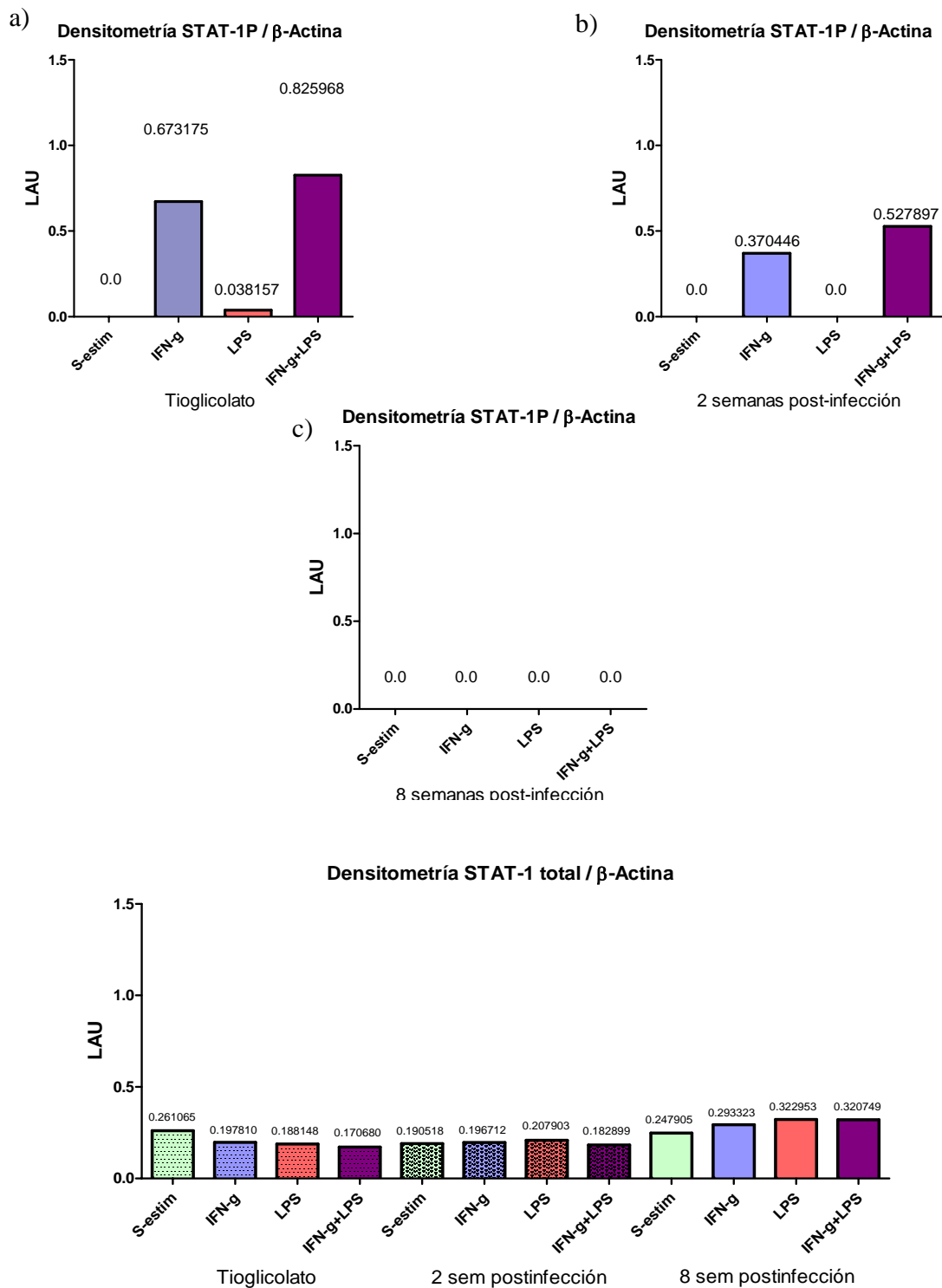


Fig. 15. Densitometrías del experimento 2. a) Tioglicolato, b) 2 semanas postinfección y c) 8 semanas postinfección.

8. DISCUSIÓN

Es ampliamente conocido que las infecciones por helmintos son capaces de modular la respuesta inmunitaria de su hospedero, principalmente por la inducción de respuestas polarizadas hacia Th2, con altos niveles de IgE, IL-4, IL-5 e IL-13 (Maizels, R. M. *et al.* 2003). En años recientes, también se ha empezado a hacer notar que la respuesta de los macrófagos provenientes de animales infectados por helmintos es diferente a estímulos inflamatorios. De hecho, se ha propuesto que estos macrófagos son alternativamente activados por las altas concentraciones de IL-4 e IL-13 que generan dichas infecciones. Así, los macrófagos alternativamente activados son considerados ahora como una característica más de las infecciones por helmintos (Reyes, J. L., Terrazas, L. I. 2007; Rodríguez-Sosa, M. *et al.* 2002). Sin embargo, la pregunta de porque estos macrófagos responden de manera deficiente a estímulos inflamatorios estaba aún sin resolver.

En la infección por *T. crassiceps*, se había reportado anteriormente que los macrófagos provenientes de animales con infecciones avanzadas eran incapaces de mantener la producción de NO, TNF- α e IL-12 al estímulo con LPS + IFN- γ . En este trabajo se planteó un diseño para establecer si los receptores para dichos estímulos estaban correctamente expresados en los macrófagos y además se analizó por Western Blot, una proteína de la cascada de señalización que induce el IFN- γ , la proteína p-STAT1, con el fin de identificar si la presencia de los receptores o bien la fosforilación de la molécula STAT1 es un paso diferencial que indique porque los macrófagos alternativamente activados no responden de manera habitual a estos estímulos pro-inflamatorios, es decir, que respondan con la producción de citocinas proinflamatorias.

8.1 Los macrófagos de infecciones crónicas con *T. crassiceps* sobreexpresan el MMR que es un indicador de activación alternativa además de otras moléculas de superficie.

Para el análisis de la proteína p-STAT1 α en macrófagos alternativamente activados se utilizó el modelo de infección IP crónica en ratones, y para confirmar que los macrófagos

obtenidos por este modelo efectivamente presentan activación alternativa, se realizaron diversas mediciones de moléculas descritas anteriormente como marcadores de dicha activación.

El primero de estos marcadores de activación alternativa que se analizó fue el receptor de Manosa (MMR). Mediante la técnica de RT-PCR se midió la expresión del gen que codifica para este receptor y se encontró que los macrófagos de entre 6-8 semanas de infección con *T. crassiceps* lo sobreexpresaron, mientras que en los animales inyectados con tioglicolato y en los de 1-2 semanas de infección la expresión del gen de este receptor fue apenas perceptible. En los macrófagos del grupo de infección crónica se pudo observar que aún sin ser sometidos a ningún estímulo, es decir en condiciones basales, sobreexpresan el MMR, pero esta sobreexpresión se ve aumentada cuando están en contacto con LPS.

El receptor de manosa (MMR) es una lectina del macrófago que reconoce a la manosa de las glucoproteínas y los glucolípidos que se encuentran en las paredes celulares de los microorganismos (Abbas, A., 2003). Sin embargo, la exposición del macrófago a IL-4 o IL-13 (ambiente T_H2), induce la sobreexpresión de este receptor (Gordon, S. 2003) (Goerdts, S. Politz, O. *et al.* 1999).

Se sabe que un ambiente T_H2 induce la activación alternativa de los macrófagos, de modo que el MMR se encuentra sobreexpresado en los macrófagos alternativamente activados. (Gordon, S. 2003) (Goerdts, S. Politz, O. *et al.* 1999). Lo anterior apoya la idea de que el modelo de infección crónica con el helminto *T. crassiceps* sí induce la activación alternativa de estas células.

Además del gen de MMR, se decidió analizar mediante citometría de flujo algunas moléculas de membrana que previamente se han descrito como marcadores de activación alternativa.

Se encontró que los macrófagos obtenidos de ratones de entre 6 - 8 semanas de infección sobreexpresaron algunas de estas moléculas. Específicamente, sobreexpresaron CD23 en comparación con los de 1-2 semanas y más aún contra los macrófagos de ratones inyectados con tioglicolato (proinflamatorios) (Fig. 7 y Tabla 3). CD23 es un receptor de IgE de baja afinidad que junto con CCR5, se han descrito anteriormente como marcadores de activación alternativa, es decir, que se encuentran sobreexpresados en los aaMφ. (Rodríguez, et al 2002). La IgE es una inmunoglobulina implicada en la respuesta inmunitaria contra parásitos y en procesos alérgicos, además de estar asociada con las respuestas tipo T_{H2}, ya que la función efectora más importante de los linfocitos T_{H2} se observa en las reacciones inmunitarias mediadas por esta inmunoglobulina (Abbas, A., 2003). En la medición de CCR5 (receptor 5 de quimiocina) también se observó un incremento, pero éste no fue en el número de células que lo expresaron, sino en la intensidad de expresión de esta molécula por cada célula (Fig. 7 y Tabla 3). Ahora bien, el papel que juega la sobreexpresión de CCR5 en los macrófagos es aún desconocido, pero puede relacionarse a la ausencia de ligandos (RANTES/MIP-1α) para este receptor (Mack, M. et al. 2001).

También se analizó la molécula GR-1, un marcador de células de linaje mieloide. Este marcador se encontró sobreexpresado en los macrófagos de ratones de 6-8 semanas de infección, en comparación con los de 1-2 semanas, mientras que los del grupo de tioglicolato mostraron una expresión relativamente baja de este marcador (Fig.7 y Tabla 3).

La expresión de GR-1 se ha visto relacionada con actividad supresora en células mieloides. Se ha observado que conforme progresa la infección IP con *T. crassiceps*, disminuye gradualmente el porcentaje de células T y B en la cavidad peritoneal y se incrementa el porcentaje de células CD11b^{low}-GR-1^{high} (granulocitos) (Brys, L. et al. 2005).

Entonces el hecho de que los macrófagos de infecciones tardías con *T. crassiceps* sobreexpresen el marcador GR-1 indica su actividad supresora.

Otra molécula que se ha sugerido como marcador de activación alternativa es PD-L2. PD-L1 y PD-L2 son ligandos de PD-1, una molécula coestimuladora que juega un papel inhibitorio en la regulación de la activación de las células T en tejidos periféricos. PD-L1 se ha descrito como una molécula constitutiva mientras que PD-L2 es de carácter inducible y que puede sobreexpresarse en activación alternativa de los macrófagos vía IL-4 (Loke, P y Allison, J, 2003; Terrazas, LI et al. 2005).

Los macrófagos obtenidos de ratones infectados con *Taenia crassiceps* y con tiempo post infección entre 6-8 semanas sobreexpresaron PD-L2 en comparación con los otros dos grupos (grupo de tioglicolato y grupo de 1-2 semanas post infección). Mientras que PD-L1 se encontró más expresado en los grupos infectados que en el de tioglicolato, sin embargo en el grupo de tioglicolato la expresión fue notable (Fig. 8 y Tabla 3).

Esto puede deberse a que el tioglicolato induce en los macrófagos un perfil proinflamatorio, y que PD-L1 se ha encontrado expresado en este tipo de macrófagos. Es el mismo caso para el grupo de 1-2 semanas, el cual también es de perfil proinflamatorio. La expresión de PD-L1 en el grupo de 6-8 semanas puede deberse al carácter constitutivo de la molécula. Por otro lado, la expresión de PD-L1 se relaciona directamente con la presencia de TLR4, el cual también se midió en este trabajo y se encontró expresado en similar nivel en el grupo de 6-8 semanas que en el de 1-2 semanas (Loke, P y Allison, J, 2003).

La sobreexpresión de PD-L2 en los macrófagos de animales con infecciones crónicas por *T. crassiceps*, corrobora la activación alternativa de estas células y sugiere su participación en un papel inmunoregulatorio negativo (Loke, P y Allison, J, 2003).

También se sabe que los aaM ϕ no responden convencionalmente a estímulos proinflamatorios, y dos de los principales receptores para este tipo de estímulos son TLR2 y TLR4, el primero, involucrado en el reconocimiento de péptidoglicano y otras moléculas presentes en bacterias gram positivas y el segundo, en el reconocimiento de LPS (y en la expresión de PD-L2), en el cual también está involucrado un co-receptor, el CD14 (Ulevitch y Tobias, 1995; Loke, P y Allison, J, 2003). Dado lo anterior, se analizó la

expresión de estos dos receptores y el co-receptor CD14 en los aaM ϕ , y se compararon con los otros dos grupos de células.

Se encontró que TLR2 se sobreexpresó claramente en los macrófagos de ratones de 6-8 semanas de infección en comparación con los otros dos grupos, aunque a las dos semanas la expresión era ya mucho mayor que en aquellos a los que solo se les inyectó tioglicolato. El TLR4 se observó ligeramente aumentado en los macrófagos de ratones de infección crónica, en comparación con los de 1-2 semanas de infección, pero este segundo grupo mostró un gran incremento comparado con el grupo de tioglicolato (Fig. 9 y Tabla 3).

En cuanto a CD14, se encontró este co-receptor más expresado en los macrófagos provenientes de infecciones agudas, sin embargo, los macrófagos de infecciones crónicas lo expresan mucho más que aquellos a los que solo se les administró tioglicolato, por lo que no se puede descartar que sí esté ejerciendo su función en el reconocimiento del LPS. (Fig. 10 y Tabla 3). Entonces, la infección aguda con *T. crassiceps* induce la sobreexpresión de CD14, sin embargo, esta expresión no se ve disminuida importantemente en la fase crónica de la infección (más de 6 semanas). Por lo tanto, el receptor de LPS y su co-receptor se encuentran expresados en los macrófagos alternativamente activados, lo que sugiere que no es la ausencia de dichos receptores a lo que se debe la falta de respuesta a esta molécula y también que estos macrófagos no son células desactivadas, ya que además expresan adecuadamente gran cantidad de receptores involucrados en la respuesta proinflamatoria y que dado el grado de expresión de los mismos, son capaces de reconocer sustancias de origen bacteriano como el péptidoglicano y LPS, es decir, que tienen la facultad de reconocer estímulos inflamatorios.

8.2 La infección con *T. crassiceps* induce la disminución de la producción de IL-12 en los macrófagos.

IL-12 es uno de los productos que se inducen en los macrófagos proinflamatorios tras el estímulo con IFN- γ , pero que se ve disminuido en los macrófagos con activación alternativa. Al evaluar su producción en los diferentes grupos de macrófagos, encontramos

que aquellos obtenidos de ratones inoculados con tioglicolato mostraron una fuerte producción de esta citocina cuando fueron estimulados por IFN- γ e incluso LPS, y más aún cuando fueron estimulados con ambas moléculas. En contraste, los grupos de ratones infectados mostraron que a pesar de haber sido tratados con los mismos estímulos y a las mismas concentraciones, su producción de IL-12 es cercana a los niveles basales de los macrófagos del grupo de tioglicolato, es decir que no se observó una producción eficiente de IL-12 en respuesta a los estímulos.

En los macrófagos de 1-2 semanas de infección a pesar de que por lo general siguen mostrando un perfil proinflamatorio, se ha encontrado que pueden empezar a perder sus características proinflamatorias, ahora bien, dado que la infección se realizó con 25 metacéstodos de *T. crassiceps*, y que otros trabajos previos indican haber inoculado 10 metacéstodos, puede ser que el aumento en la carga parasitaria sea la causa de una polarización más temprana de los macrófagos en este caso.

8.3 El IFN- γ R se expresa adecuadamente en los macrófagos alternativamente activados.

En concordancia con los hallazgos anteriores, se sabe que los aaM ϕ no responden de manera habitual a los estímulos proinflamatorios, como es el caso LPS e IFN- γ . En el desarrollo del presente trabajo en primera instancia se pensó en una alteración en la expresión del IFN- γ R, y que debido a eso no se estuviera llevando posiblemente la respuesta esperada a la citocina. Sin embargo, se ha reportado anteriormente que el receptor de IFN- γ se expresa adecuadamente en los aaM ϕ (Rodríguez-Sosa, M. et al 2006). De tal forma que para darle más sustento a esta tesis, quisimos medir la expresión de este receptor en los tres grupos de macrófagos, dado que corroborar la correcta expresión del IFN- γ R era importante para enfatizar la importancia de analizar las proteínas de la cadena de señalización del IFN- γ .

El IFN- γ R por su parte no presenta diferencias en el porcentaje de células que lo expresan entre los grupos infectados, pero sí con respecto al grupo de tioglicolato. Esto parece

indicar que la infección con *T. crassiceps*, independientemente de que sea aguda o crónica, induce la sobreexpresión del receptor de Interferón- γ .

Lo anterior sugiere que los aaM ϕ , pueden ser capaces de reconocer al IFN- γ , y que sin embargo no responden de manera habitual a este estímulo. Lo que indica que el paso diferencial entre los caM ϕ y los aaM ϕ en cuanto a la respuesta hacia esta citocina es posiblemente en alguna de las proteínas de la vía de señalización. Dado todo lo anterior es que este trabajo tuvo como fin analizar la fosforilación de la proteína STAT1 α (p-STAT1 α) en los tres grupos de macrófagos para identificar alguna diferencia en la fosforilación que sea dependiente del tipo de activación el macrófago.

8.4 Los macrófagos alternativamente activados presentan diferente patrón de proteínas que los de activación clásica.

Se realizó la electroforesis del extracto total de proteínas de macrófagos tanto de 1-2 como 6-8 semanas post infección, y de cada grupo se obtuvieron muestras con diferentes estímulos. El gel obtenido de la electroforesis y teñido posteriormente con Azul de Coomassie (Fig. 12), muestra que existen diferencias en el patrón de proteínas entre los dos grupos de macrófagos (clásica y alternativamente activados, respectivamente).

Se observó que algunas proteínas se encuentran más expresadas en la activación clásica y viceversa. De modo que aún sin precisar de qué proteína se trate, es evidente que a pesar de tratarse de las mismas células, los estados de activación son diferentes, ya que un distinto patrón de proteínas indica características y funciones diferentes. Y esta expresión diferencial es independiente a estímulos posteriores.

8.5 Los macrófagos alternativamente activados no presentan una adecuada fosforilación de la molécula STAT-1 α en respuesta al estímulo con IFN- γ .

Se realizó el análisis por Western Blot (IET) del extracto de proteínas de los diferentes grupos de macrófagos y de los diferentes estímulos, así como las de densitometrías. Al

observar las imágenes del WB (IET), encontramos que no parece haber disminución ni alteración en cuanto a la concentración de la molécula STAT1 α en ninguno de los grupos de macrófagos (Fig. 13). Al realizar las densitometrías, corroboramos que no existieron diferencias importantes en las concentraciones de esta proteína en ninguno de los casos (Fig. 14 y 15).

La molécula STAT1 α es un factor de transcripción que se dimeriza mediante fosforilación mediada por las cinasas llamadas JAK1/2 ancladas a las cadenas del receptor de IFN- γ . Esta dimerización da lugar al GAF (Factor activado por IFN- γ) el cual se une a secuencias de tipo GAS en el material genético y da como consecuencia la transcripción de genes activados por IFN- γ . De modo que para que esta cadena de señalización se lleve a cabo, la fosforilación de STAT1 α es un paso fundamental.

Y sobre esta proteína encontramos que en los dos experimentos realizados, los macrófagos del grupo de tioglicolato (proinflamatorios) montan una fuerte fosforilación de la molécula STAT1 α en respuesta a IFN- γ , y que el LPS por si solo no es un activador de la fosforilación de la misma, mientras que, cuando los macrófagos son estimulados por ambos al mismo tiempo, el LPS parece sinergizar con el IFN- γ y aumentar ligeramente la fosforilación de STAT1 α . En el grupo de 1-2 semanas de infección encontramos que los macrófagos presentaron el mismo patrón de respuesta a los estímulos, sin embargo, la fosforilación de STAT1- α es menor en ambos experimentos.

La fosforilación de STAT1 α en respuesta al IFN- γ es el mecanismo normal que presenta el macrófago para desencadenar una respuesta proinflamatoria, y es lo que se observó en los macrófagos provenientes de animales sin infección, mientras que en los macrófagos de ratones de 1-2 semanas de infección se observó que la fosforilación empieza a disminuir, pero este evento no se observó en los aaM ϕ obtenidos con el modelo de cisticercosis de 6-8 semanas, ya que en el primer experimento se encontró un nivel basal muy evidente de fosforilación en las muestras no estimuladas, sin embargo este nivel no se ve modificado en respuesta a ninguno de los estímulos. Es decir, la fosforilación que se presentó no es debida

a alguna respuesta hacia el IFN- γ , ya que no se vió modificada cuando los macrófagos se estimularon con IFN- γ . Lo anterior es más evidente en el análisis por densitometría.

En el segundo experimento, observamos que no se presentó fosforilación en respuesta a ninguno de los estímulos. De modo que fue más evidente la deficiencia en la fosforilación de STAT1 α en respuesta al IFN- γ por parte de los aaM ϕ obtenidos de infecciones crónicas.

Al parecer, esta deficiencia en la fosforilación de STAT1 α que se presenta en los aaM ϕ , es un paso crucial para que la respuesta proinflamatoria mediada por el IFN- γ se encuentre disminuida. Pues como se había observado previamente y confirmamos aquí, estos macrófagos no tienen la capacidad de responder adecuadamente a este estímulo.

Los mecanismos involucrados que impiden que se lleve a cabo la adecuada fosforilación de STAT1 α en los aaM ϕ en respuesta al IFN- γ aún son desconocidos. Sin embargo, sabemos que los helmintos logran modular la respuesta inmunitaria favoreciendo su establecimiento, y aunque los mecanismos por los cuales lo logran no se han identificado, sí es conocido que una infección crónica con este tipo de parásitos logra polarizar la respuesta hacia un perfil T_H2 con la consecuente disminución de la producción de citocinas proinflamatorias inducidas por IFN- γ . De modo que de alguna forma la interacción con el helminto tiene como consecuencia la disminución en la fosforilación de STAT-1 α .

Los mecanismos como se mencionó anteriormente son desconocidos, sin embargo podemos intentar dar algunas explicaciones probables.

Las proteínas encargadas de activar a STAT-1 son las Janus cinasas (Jak) 1 y 2. De tal modo que sería interesante analizar el estado de estas cinasas, ya que la deficiencia en alguna de ellas daría como resultado la falta de fosforilación de STAT-1. Esta posibilidad se sustenta en que se ha observado que la infección con *L. major* y *L. mexicana* reduce los niveles totales de Jak1 y Jak2 en los macrófagos con lo que disminuye su respuesta hacia el IFN- γ . (Bhardwaj, N. et al. 2005). Algo relacionado se ha observado también en otras infecciones, como es el caso de *L. donovani*, en donde encontró que esta infección induce la defosforilación de Jak1 y 2 mediante la activación de la tirosinfosfatasa SHP1 de los

macrófagos (Blanchette et al., 1999). Sin embargo, es necesario aclarar que en esas infecciones el parásito está dentro del macrófago, lo cual no sucede en nuestro modelo experimental.

De modo que sería interesante observar si la infección con *T. crassiceps* induce algún mecanismo mediante el cual ya sea Jak 1 ó 2 no se encuentren capacitadas para activar a STAT-1. Así que identificar una deficiencia en alguna de las cinasas, nos permitirá entender un poco más sobre la modulación ejercida por los helmintos.

Existen moléculas implicadas en la supresión de señalización de citocinas y que por su mecanismo de acción pudieran estar involucradas en la disminución de la fosforilación de STAT-1. Entre estas moléculas se encuentran las proteínas de la familia SOCS (Suppressors of cytokine signaling), las cuales inhiben la vía Jak/STAT mediante un clásico mecanismo de retroalimentación negativa presentando especificidad por las citocinas y no por las Jak o los STAT (Greenhalgh y Milton, 2001). La expresión de SOCS1 y SOCS3 en los macrófagos es inducida por varias citocinas y factores de crecimiento, así como por productos bacterianos como LPS, y mientras SOCS1 se ha propuesto como inhibidor de la actividad de las Janus cinasas mediante su unión a su sitio de activación (Yasukawa, H. et al. 1999), el mecanismo de acción de SOCS3 es mediante la unión al receptor de citocinas activado. En este contexto, se ha demostrado que la infección con *L. donovani* induce la expresión de SOCS3 lo que reduce significativamente la fosforilación de STAT1. Lo más interesante es que la expresión de SOCS3 en la infección con *L. donovani* fue independiente a la acción de las citocinas, es decir, que el parásito por sus propios mecanismos logró inducir la expresión de esta molécula supresora (Bertholet, S., et al. 2003). De hecho, datos recientes indican que moléculas solubles o no derivadas de helmintos son capaces in Vitro de modular la respuesta no sólo de macrófagos sino también de células dendríticas. También se ha visto que durante el desarrollo de una infección las células se ven expuestas a diferentes antígenos los cuales influyen significativamente en sus funciones (Gómez-García, L. y Terrazas, L. I. 2007).

También se encuentran las Tirosina fosfatasas, cuyo mecanismo de regulación de esta vía consiste en la defosforilación de los componentes activados. Además de SHP-1, que se ha visto involucrada en la defosforilación de Jak1 y 2 por *L. donovani* existen otras fosfatasas que no se han identificado como inhibidores de la fosforilación ni de Jak ni STAT durante una infección pero que por su mecanismo de acción podrían estar implicadas, tal es el caso de SHP-2 que además de tener la capacidad de defosforilar Jak, puede defosforilar a STAT tanto a nivel nuclear (Wu, et al. 2002) como citoplasmático (Chen, et al 2003).

Los mecanismos propuestos se resumen en la siguiente figura:

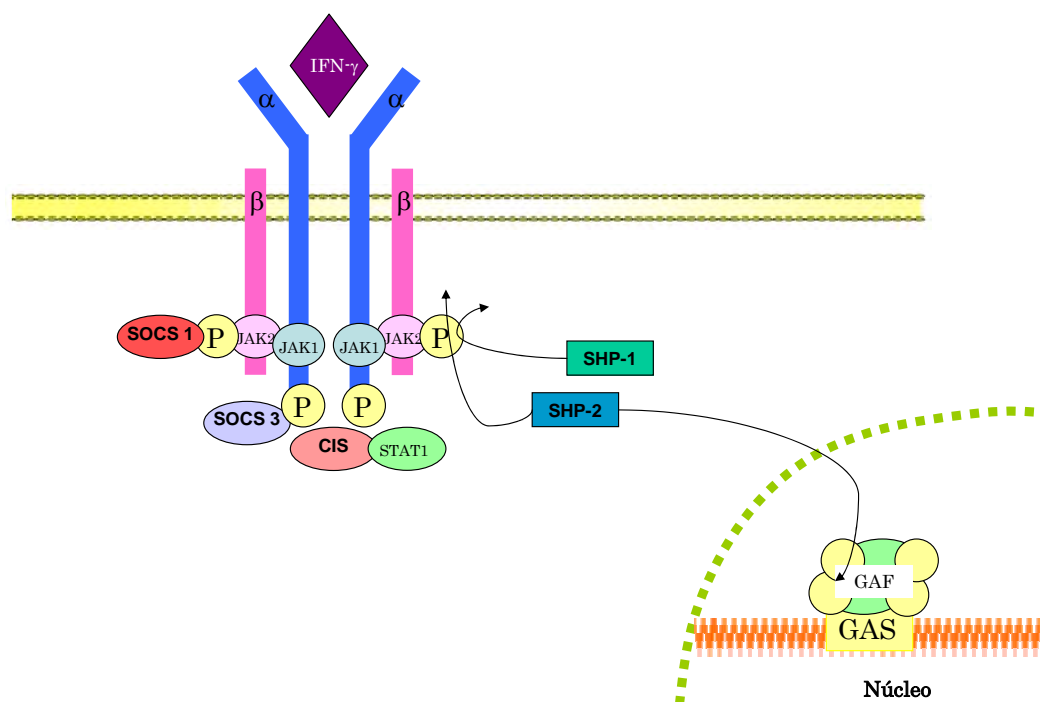


Fig. 16. Posibles mecanismos que impiden la adecuada fosforilación de STAT1. La molécula SOCS1 inhibe las funciones de las Janus cinasas mediante su unión a las mismas, por su parte SOCS3 lo logra mediante su unión al receptor de citocinas activado. SHP-1 es una fosfatasa que se ha visto involucrada en la defosforilación de de Jak1 y 2 por *L. donovani* mientras que SHP-2 es otra fosfatasa que podría estar involucrada en la defosforilación de STAT1.

Estudios más profundos en este modelo de cisticercosis y la inducción de aaM ϕ s serán necesarios para dilucidar cual o cuales mecanismos están involucrados en la disminución de la fosforilación de STAT1.

9. CONCLUSIONES

1. Los macrófagos provenientes de infecciones crónicas con *T. crassiceps* sobreexpresan marcadores de activación alternativa tales como MMR, CD23, GR1 y PD-L2.
2. Los aaM ϕ expresan adecuadamente receptores a estímulos proinflamatorios tales como TLR2, TLR4 e IFN- γ R.
- 3.- La fosforilación de STAT1 en los aaM ϕ en respuesta al estímulo con IFN- γ es deficiente, encontrándose prácticamente nulificada después de 6 semanas post-infección con *T. crassiceps*. Por lo que la falta de respuesta de los aaM ϕ obtenidos de infecciones crónicas por *T. crassiceps* se debe a una falla en la fosforilación de la molécula STAT1- α .

10. APENDICE: FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS

ELISA. *“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”* Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Es una técnica para la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente.

Western Blot. Método para la detección de proteínas en una muestra de un tejido homogeneizado o extracto. Implementa gel electroforesis para separar proteínas desnaturalizadas. Las proteínas son transferidas desde el gel hacia la membrana (originalmente de nitrocelulosa), donde son examinadas utilizando anticuerpos específicos para la proteína los cuales vienen marcados con una enzima.

RT-PCR. “Transcriptasa reversa-Reacción en cadena de la polimerasa”. Técnica cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular (obtenido de una muestra de ARN mediante reacción de transcriptasa inversa) partiendo de un mínimo. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

Citometría de flujo. Técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz. Las células deben encontrarse individualmente en suspensión. Al atravesar el rayo de luz, las células interaccionan con éste causando dispersión. Basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se evalúa el tamaño de las células que pasan y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad. Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos se pueden evaluar que células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos usados.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A., Lichtman, A. 2003. Inmunología celular y molecular. 5° Ed. Saunders. Madrid, España.
2. Abrahamsohn, I.A. *et al.* 2000. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68, 1975–1979.
3. Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M y Miyake, K. 2000. Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 164: 3471-3475.
4. Bach, E.A., Aguet, M. y Schreiber, R.D. 1997. The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 563-591.
5. Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., siminovitch, K., Olivier, M. 1999. Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur. J. Immunol.* 29, 3737-3744.
6. Bellardelli, F. 1995. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 103: 161-179.
7. Bertholet, S., Dickensheets, H., Sheikh, F., Gam, A., Donnelly, R y Kenney, R. 2003. *Leishmania donovani*-Induced Expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *IAI*, 71: 4: 2095-2101.
8. Bhardwaj, N., Rosas, L., Lafuse, W., Satoskar, A. 2005. Leishmania inhibits STAT1-mediated IFN-g signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1b by *Leishmania mexicana*. *Inter. Journal for Parasitology*, 35: 75-82.
9. Bhat, N., Perera, P.Y., Carboni, J.M., Blanco, J., Golenbock, D.T., Mayadas, T.N. y Vogel, S.N. 1999. Use of a photoactivable taxol analogue to identify unique cellular targets in murine macrophages: identification of murine CD18 as a major taxol-binding protein and a role for Mac-1 in taxol-induced gene expression. *J. Immunol.* 162: 7335-7342.

10. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. y Howard, J.C. 1997. Cellular responses to interferon-g. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 749-795.
11. Boldrick, J. C. *et al.* 2002. Stereotyped and specific gene-expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 972-977.
12. Brys, L., Beschin, A., Raes, G., Hassanzadeh, G., Noël, W., Brandt, J., Brombacher, F. y De Baetselier, P. 2005. Reactive Oxygen Species and 12/15-Lipoxygenase Contribute to the antiproliferative capacity of Alternatively Activated Myeloid Cells elicited during Helminth infection. *The Journal of Immunology* 174: 6095-6104.
13. Celada, A. y Nathan, C.F. 1994. Macrophage activation revisited. *Immunol. Today.* 15:100-102.
14. Celada, A. B. En "Inmunología Básica", Labor S. A., Barcelona.
15. Celada, A., y Maki, R.A. 1992. Transforming growth factor-b enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. *J. Immunol.*, 148:1102-1105.
16. Celada, A., Klemsz, M.J., y Maki, R.A. 1989. Interferon-g activates multiple pathways to regulate the expression of the genes for major histocompatibility class II I-Ab, tumor necrosis factor and complement component C3 in mouse macrophages. *Eur. J. Immunol.* 19: 1103-1109.
17. Celada, A., y Schreiber, S.R. 1986. Role of protein kinase C and intracellular calcium mobilization in the induction of macrophage tumoricidal activity by interferon-gamma. *J. Immunol.* 137: 2373-2379.
18. Chau, C. Y. and Freeman, R. S. 1976. Intraperitoneal passage of *Taenia crassiceps* in rats. *J. Parasitol.* 62: 837-839.
19. Chen, Y., Wen, R., Yang, S., Schuman, J., Zhang, E., Yi, T., Feng, G. S. y Wang, D. 2003. Identification of SHP-2 as a STAT5A phosphatase. *J Biol Chem*, 278, 16520-16527.
20. Comalada, M. 2002. Decisiones en los macrófagos: proliferar, activarse o morir. Tesis doctoral, universidad de Barcelona.
21. Dalton, D. K. *et al.* 2003. Multiple defects of immune-cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. *Science* 259, 1739-1742.

22. Ehrt, S. *et al.* 2001. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon- γ and Mycobacterium tuberculosis. Signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J. Exp. Med.* 194, 1123-1140.
23. Farrar, M.A., y Sarchreiber, R.D. 1993. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 571-611.
24. Francois, A., Favennec, L., Cambon-Michot, C., et al. 1998. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? *Am. J. Surg. Pathol.* 22: 488-492.
25. Gao, W. and Pereira, M.A. 2002 Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 32, 167-170
26. Gil, M.P., Bohn, E., O'Guin, A.K., Ramana, C.V., Levine, B., Stark, G.R., Virgin, H.W., y Schreiber, R.D. 2001. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 6680-6685.
27. Giordanengo, L. *et al.* 2002 Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur. J. Immunol.* 32, 1003-1011.
28. Goerdts, S. and Orfanos, C. E. 1999. Other functions other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 10, 137-142.
29. Goerdts, S. Politz, O., *et al.* 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67; 222-226.
30. Goes, N., Sims, T., Urmson, J., Vincent, D., Ramassar, V., y Halloran, P.F. 1995. Disturbed MHC regulation in the IFN- γ knockout mice. *J. Immunol.* 155:4559-4566.
31. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23-35
32. Gordon, S. 1999. *Fundamental Immunology*. 4a Ed. Ch. 15. Ed. Paul, W. 533-545 Lippincott Raven, Philadelphia.
33. Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C. E., Schledzewski, K., Goerdts, S. 2001. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand. J. Immunol.* 53, 386-392.
34. Greenhalgh, C. J. y Milton, D. J., 2001. Negative regulation of cytokine signaling. *J. Leukoc Biol.* 70, 348-356.

35. Hamilton, T.A., y Adams, D.O. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol. Today*. 8: 151-158.
36. Heldwein, K., Biedermann, H. G., Hamperl, W. D., et al. 2006. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodkin's lymphoma. *Am. J. Trop. Med. Hygiene*. 75: 108-111.
37. Hertz, C.J. *et al.* 1998. Resistance to the African trypanosomes is IFN- γ dependent. *J. Immunol*. 161, 6775–6783
38. Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., Pearce, E. J., Wynn, T. A. 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol*. 167, 6533–6544.
39. Ihle, J.N., y Kerr, I.M. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*. 11: 69-74.
40. Iniesta, V. *et al.* 2001. The inhibition of arginase by *N*(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J. Exp. Med*. 193, 777–784
41. Ishida, M. M., *et al.* 2003. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta. Trop.* 89: 73-84.
42. Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. 2003. *Inmunobiología*, 2º Ed. Masson, España.
43. Kielian, T.L., y Blecha, F. 1995. CD14 and other recognition molecules for lipopolisaccharide: a review. *Immunopharmacol*. 29: 187-205.
44. Koerner, T.J., Hamilton, T.A., y Adams, D.O. 1987. Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide: Evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA. *J. Immunol*. 139: 239-243.
45. Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazi S, Galanos C, Smith DF, Muller I. 2004. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun*, 72:1920-1928.
46. Loke, P y Allison, J. 2003. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *PNAS* 100: 9: 5336–5341.

47. Loke, P. *et al.* 2002. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol.* 3:7.
48. Loke, P. *et al.* 2000. Antigen-presenting cells recruited by *Brugia malayi* induce TH2 differentiation of naive CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 30, 1127-1135.
49. Mack, M., Cihak, C. Simonis, B. Luckow, A. E. Proudfoot, J. Plachy, H. Bruhl, M. Frink, H. J. Anders, V. Vielhauer, J. Pfirstinger, M. Stangas-singer, y D. Schlondorff. 2001. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J. Immunol.* 166: 4697-4704.
50. Mackaness, G. B. 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. An early delineation of macrophage activation by intracellular infection. *J. Exp. Med.* 120, 105
51. Magez, S. *et al.* 1999. Tumor necrosis factor α is a key mediator in the regulation of experimental *Trypanosoma brucei* infections. *Infect. Immun.* 67, 3128–3132
52. Maizels, R. M. and Yazdanbakhsh, M. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 733-744.
53. Mosser, D.M. 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukocyte Biol.* 73, 209–212
54. Nair, M. G., Gallagher, I. J., Taylor, M. D., et al. 2005. Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infect. Immun.* 73: 385-394.
55. Nair, M. G., Cochrane, D. W. and Allen, J. E. 2003. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vivo. *Immunol. Lett.* 85: 173-180.
56. Namangala, B. *et al.* 2001. Relative contribution of interferon- γ and interleukin-10 to resistance to murine african trypanosomosis. *J. Infect. Dis.* 183, 1794–1800
57. Nathan, C.F. 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326.
58. Nau, G. J. *et al.* 2002. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 1503-1508.
59. Noël, W. *et al.* (2002) Infection stage-dependent modulation of macrophage activation in *Trypanosoma congolense*-resistant and susceptible mice. *Infect. Immun.* 70, 6180–6187

60. Noël, W. *et al.* 2004. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol.* 20: 126-133.
61. Peluffo G, Piacenza L, Irigoien F, Alvarez MN, Radi R. 2004 L-Arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol*, 20:363-369.
62. Raes, G., De Baetselier, P., Noel, W., Beschin, A., Brombacher, F., Hassanzadeh, G. G. 2002. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 71, 597–602.
63. Ramana, C.V., Gil, M.P., Han, Y., Ransohoff, R.M., Schreiber, R.D., y Stark, G.R. 2001. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN- γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 6674-6679.
64. Ramana, C.V., Grammatikakis, N., Chernov, M., Nguyen, H., Goh, K.C., Williams, B.R.G., y Stark, G.R. 2000. Regulation of c-myc expression by IFN- γ through Stat-1-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 19: 263-272.
65. Reyes, J. L., and Terrazas, L. I. 2007. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infection. *Parasite immunology* 29, 609-619.
66. Rodríguez-Sosa, M., Rivera-Montoya, I., Espinoza, A., Romero-Grijalva, M., López-Flores, R., González, J., Terrazas, L. I., 2006. Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cellular Immunology* 242: 61–71.
67. Rodríguez-Sosa, M. *et al.* 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and the T_H2-biasing ability. *Infect. Immun.* 70: 3656-3664.
68. Rodrigues, M.M. *et al.* 2000. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol. Lett.* 73, 43–50.
69. Rosas, L. *et al.* 2003. Development of protective immunity against cutaneous leishmaniasis in dependence on STAT1 mediated IFN signaling pathway. *Eur. J. Immunol.* 33: 1799-1805.

70. Rosas, L., et al. 2006. STAT1 and the T-bet play distinct roles in determining outcome of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *J. Immunol*, 177: 22-25.
71. Roselaar, S.E., y Daugherty, A. 1997. Lipopolysaccharide decreases scavenger receptor mRNA in vivo. *J. Interferon, Cytok. Res .* 17: 573-579.
72. Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J. N., Wynn, T. A., Murray, P. J. (2001) Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J. Immunol.* 166, 2173–2177.
73. Schariton-Kersten, T. *et al.* (1995) IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* 154, 5320–5330
74. Schebesch, C., Kodolja, V., Muller, C., Hakij, N., Bisson, S., Orfanos, C. E., Goerd, S. 1997. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4₊ T cells in vitro. *Immunology* 92, 478–486.
75. Schindler, C., y Darnell, J.A. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 621-651.
76. Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., y Kimoto, M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolisaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189: 1777-1782.
77. Snapper, C.M., y Paul, W.E. 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science.* 236: 944-947.
78. Song, E., Ouyang, N., Horbelt, M., Antus, B., Wang, M., Exton, M. S. (2000) Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.* 204, 19–28.
79. Stadecker, M. J., Kamisato, J. K. and Chikunguwo, S. M. 1990. Induction of T helper cell unresponsiveness to antigen by macrophages from schistosomal egg granulomas. A basis for immunomodulation in schistosomiasis? *J. Immunol.* 145: 2697-2700.

80. Steeg, P.S., Johnson, H.M., y Oppenheim, J.J. 1982. Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokine: Inhibitory effects of endotoxin. *J. Immunol.* 129: 2402-2406.
81. Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287–292.
82. Stempin, C. *et al.* (2002) Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J. Leukocyte Biol.* 72, 727–734
83. Stumpo, R., Kauer, M., Martin, S., Kolb, H. 1999. Alternative activation of macrophages by IL-10. *Pathobiology*; 1999; 67, 245-248.
84. Sweet, M.J., y Hume, D.A. 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 60: 8-26.
85. Terrazas, L.I., Cruz, M., Rodríguez-Sosa, M., Bojalil, R., García-Tamayo, F., Sarralde, C. 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res.* 85: 135 ± 141.
86. Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C., Reyes, J. L., y Rodríguez-Sosa, M., 2005. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *International Journal for Parasitology*, 35; 13: 1349-1358.
87. Tzachanis, D., Berezovskaya, A., Nadler, L. M., and Boussiotis, V. A. 2002. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell response. *Blood* 99, 1465-1473.
88. Ulevitch, R.J., y Tobias, P.S. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13:437-457.
89. Underhill, D.M., y Ozinsky, A. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 103-110.
90. Valledor, A. F., Borrás, E. F, Culler-Young, M., y Celada, A. 1998. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 63: 405-417.

91. Vincendeau, P. *et al.* (2003). Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol.* 19, 9-12
92. Viriyakosol, S., y Kirkland, T. 1995. Knowledge of cellular receptors for bacterial endotoxin. *Clin. Infect. Dis.* 21: S190-195.
93. Walther M, Woodruff J, Edele F, Jeffries D, Tongren JE, King E, Andrews L, Bejon P, Gilbert SC, De Souza JB *et al.* 2006. Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. *J Immunol*, 177:5736-5745.
94. Wilson, M. S. y Maizels, R. M. 2006. Regulatory T cells induced by parasites and the modulation of allergic responses. *Chem. Immunol. Allergy*, 90: 176-195.
95. Wong, G.H.W., Clark-Lewis, I., McKimm-Breschkin, J.L., Harris, A.W., y Schrader, J.W. 1983. Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage and myeloid cell lines. *J Immunol.* 131: 788-795.
96. Wright, S.D., y Kolesnick, R.N. 1995. Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide? *Immunol. Today.* 16: 297-301.
97. Wright, S.D., y Jong, M.T. 1986. Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 164: 1876-1888.
98. Wu, T. R., Hong, Y. K., Wang, X. D., Ling, M. Y., Dragoi, A. M., Chung, A. S., Campbell, A. G., Han, Z. Y., Feng, G. S. y Chin, Y. E., 2002. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in STAT1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem*, 277, 47572-47580.
99. Xaus, J., Comalada, M., Barrachina, M., Herrero, C., Gonalons, E., Soler, C., Lloberas, J. y Celada, A. 2000. The expression of MHCII class II genes in macrophages is cell cycle dependent. *J. Immunol.* 165: 6364-6371.
100. Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. y Yoshimura, A. 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.* 18: 1309-1320.