



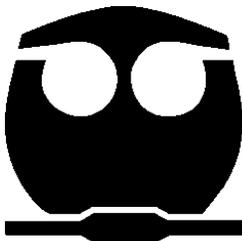
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis de la expresión de genes relacionados con marcadores del
cambio fenotípico en macrófagos intraperitoneales durante la
cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps*.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
LUIS OMAR XINASTLE CASTILLO

MÉXICO D.F. 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE:** Profesor: Gutiérrez Ramos Abel.
VOCAL: Profesor: Mendoza Rodríguez Carmen Adriana.
SECRETARIO: Profesor: Landa Piedra Abraham.
1er. SUPLENTE: Profesor: Maya Ampudia Vanessa Rebeca.
2º SUPLENTE: Profesor: Cordero Hernández José.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN219711 “Estudio de la transcripción de genes de linfocitos y macrófagos de cepas de ratones susceptibles y resistentes, vacunados o no durante la infección causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*”, y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-176925) “Estudio de la transcripción de los genes de ratones susceptibles y resistentes, así como del parásito durante la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*”.

ASESOR DEL TEMA: Landa Piedra Abraham. _____

SUSTENTANTE: Xinastle Castillo Luis Omar. _____

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes científicos.....	5
3.1. Historia de la teniasis y cisticercosis humana.....	5
3.2. Cisticercosis en México.....	6
3.3. Anatomía y fisiología de <i>Taenia solium</i>	9
3.4. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	12
3.5. Cisticercosis y neurocisticercosis humana.....	15
3.6. Diagnóstico de la cisticercosis humana.....	16
3.7. Modelo murino de metacestodiasis.....	19
3.8. Respuesta inmune ante la metacestodiasis murina.....	22
3.9. Sistema fagocítico mononuclear.....	26
3.10. Espectro de activación de macrófagos.....	27
3.11. Macrófagos murinos M1 o clásicamente activados.....	30
3.12. Macrófagos murinos M2 o alternativamente activados.....	31
3.13. Papel de los macrófagos en la metacestodiasis murina.....	38
3.14. Microarreglos de DNA.....	39
4. Planteamiento del problema.....	42
5. Hipótesis.....	43
6. Objetivos.....	43
7. Materiales y métodos.....	44
7.1. Materiales biológicos.....	44
7.2. Diseño experimental.....	44
7.3. Protocolo de infección y sacrificio de animales.....	45
7.4. Obtención de células de exudado peritoneal.....	45
7.5. Determinación de cargas parasitarias.....	46
7.6. Cuantificación de células y cultivos celulares.....	46
7.7. Extracción de RNA total.....	47
7.8. Amplificación del transcriptoma.....	48
7.9. Purificación del amplificado.....	49
7.10. Marcaje de las cadenas de DNAC.....	50
7.11. Hibridación en microarreglo.....	51
7.12. Lavado de la placa de microarreglo.....	52
7.13. Lectura de microarreglo.....	53
7.14. Extracción y análisis de datos.....	53

7.15. Normalización de datos.....	53
7.16. Listado de genes candidatos a marcadores.....	54
7.17. Análisis de datos.....	55
7.18. Cuantificación de citocinas.....	55
7.19. Transcripción reversa acoplada a polimerasa de reacción en cadena.....	55
8. Resultados.....	57
8.1. Determinación de carga parasitaria.....	57
8.2. Extracción y caracterización de RNA total.....	58
8.3. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivo.....	59
8.4. Amplificación de genes por RT-PCR.....	59
8.5. Normalización de genes en software Genesis.....	60
8.6. Perfil de expresión de genes de mantenimiento.....	60
8.7. Perfiles de expresión de genes relacionados con macrófagos M1.....	61
8.8. Perfiles de expresión de genes relacionados con macrófagos M2a.....	63
8.9. Perfiles de expresión de genes relacionados con macrófagos M2b.....	64
8.10. Perfiles de expresión de genes relacionados con macrófagos M2c.....	66
8.11. Perfiles de expresión de genes relacionados con macrófagos M2d.....	66
8.12. Formación de conglomerados y elección de grupos de interés.....	69
8.13. Potenciales marcadores para macrófagos M1.....	73
8.14. Potenciales marcadores para macrófagos M2.....	73
9. Discusiones.....	76
10. Conclusiones generales.....	85
11. Conclusiones.....	85
12. Referencias bibliográficas.....	87
13. Apéndice A.....	92
14. Apéndice B.....	102

RESUMEN

Propósito: Los macrófagos son parte de la defensa celular innata y uno de los enlaces entre ésta y la respuesta inmune adaptativa. Son las células que realizan el proceso de reconocimiento y ataque contra los agentes patógenos; por lo que entender y analizar su expresión genética nos puede ayudar a comprender como los macrófagos contribuyen a resolver infecciones o por el contrario, contribuir indirectamente al establecimiento y reproducción de un patógeno.

Se utilizó el modelo de metacestodiasis murina causada por *Taenia crassiceps* como una herramienta para el entendimiento de los mecanismos inmunológicos involucrados en el proceso de resistencia o susceptibilidad ante la parasitosis, se realizó un análisis genético de macrófagos intraperitoneales con el fin de poder identificar los genes que producen cambios que afectan la inmunología del hospedero y que conducen a un estado permisivo ante la infección.

Materiales y métodos: Se obtuvieron macrófagos peritoneales a partir de grupos de ratones BALB/cAnN que fueron infectados intraperitonealmente con cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF. A partir de estas muestras se extrajo RNA mensajero que se usó como templado para los procesos de análisis en microarreglos. El análisis de la expresión genética en los microarreglos se llevó a cabo con el software (Genesis v.1.7.6 desarrollado por Alexander Sturn y Rene Snajder Graz University of Technology, Institute for Genomics and Bioinformatics <http://genome.tugraz.at>).

Resultados: En términos de poblaciones, durante las primeras semanas de infección se observó la aparición de una mayoría de macrófagos diferenciados al fenotipo M1 coexistiendo con una minoría diferenciada hacia el fenotipo M2. Junto con la progresión de la parasitosis sucede un cambio hacia el establecimiento de una población de macrófagos M2 (M2a, M2b y M2c) que concuerda con el aumento de la carga parasitaria, tal y como se ha descrito en la literatura;

adicionalmente se establecieron patrones de expresiones genéticas y marcadores para los fenotipos de macrófagos M1 y M2.

Conclusiones: Las expresiones genéticas relacionadas a marcadores nos señalan la forma en que las poblaciones de macrófagos se ven influenciadas por su microambiente a lo largo del proceso de parasitosis, también nos demuestran que las células son capaces de diferenciarse en toda una gama de fenotipos capaces de coexistir. Estos cambios de fenotipo pueden ser el producto del curso natural de la respuesta inmune, consecuencia de la inmunorregulación que *T. crassiceps* produce en el hospedero o incluso ambos fenómenos.

Las diferencias observadas en los patrones de expresión genéticos encontrados sugieren futuras estrategias de estudio que deben realizarse para establecer si estos cambios son claves en el proceso de resistencia o susceptibilidad a la infección, así como para poder sugerir posibles estrategias de combate contra la cisticercosis.

INTRODUCCIÓN:

La cisticercosis o metacestodiasis humana es una enfermedad ocasionada por el platelminto *Taenia solium*, considerada endémica en casi todos los continentes con excepción de Australia y de aquellos pueblos que por convicciones religiosas se abstienen de consumir cerdos. En la actualidad la incidencia de la misma está ligada a factores como: deficiencias en los hábitos de higiene, persistencia de condiciones de pobreza, migración y al uso de técnicas tradicionales en la crianza de cerdos a la que aún se recurre en zonas rurales (4, 6).

En México el número de casos de cisticercosis en su forma más severa (neurocisticercosis), la mantiene como una de las principales causas de consulta neurológica por epilepsia y como una de las causas más comunes de craneotomías en instituciones especializadas (5).

Además es de resaltar que el diagnóstico de la neurocisticercosis resulta complicado debido a la variedad de síntomas que puede ocasionar y que fácilmente se pueden confundir por los observados en otras enfermedades. La forma definitiva de diagnóstico en la actualidad resulta del uso de técnicas como: resonancia magnética nuclear y tomografía axial computarizada las que resultan técnicas costosas y poco accesibles para personas de bajos recursos (4, 8, 9).

A lo anterior se puede sumar el costo de la intervención quirúrgica, debido a que el tratamiento con antiparasitarios como la niclosamida y praziquantel no siempre son recomendados. Lo que se traduciría en gastos de tratamiento elevados, que en la mayoría de los casos el servicio de salud pública termina absorbiendo.

Taenia solium depende en su ciclo de vida del cerdo como su hospedero intermediario y en donde el parásito es capaz de pasar de su fase de huevo a su fase de metacestodo o cisticerco; y por otra parte depende del humano como su

hospedero definitivo en donde el metacestodo puede pasar a su fase adulta comúnmente denominada como “solitaria” o tenia (7).

Cuando la fase adulta se desarrolla en los humanos ocasiona la enfermedad conocida como teniasis; sin embargo el humano en ocasiones actúa como un hospedero intermediario en forma accidental, alojándose la fase de metacestodo y en cuyo caso se ocasiona la enfermedad conocida como cisticercosis humana (7).

La cisticercosis en humanos ocurre cuando se ingieren huevos de *T. solium*, ocasionándose el desarrollo de la fase de metacestodo capaz de abandonar el sistema digestivo y de alojarse en diferentes zonas anatómicas del hospedero como: pulmones, hígado, músculos, ojos y sistema nervioso central (7).

En laboratorio el estudio de la cisticercosis se realiza en un modelo heterólogo, que resulta accesible, de fácil manejo y de menor costo. Así pues, el modelo murino de metacestodiasis por *Taenia crassiceps* puede ser utilizado como un medio para la obtención de células del sistema inmune y con las que podrá ser posible realizar el análisis que permita identificar patrones genéticos expresados en el proceso infeccioso (10).

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

I. HISTORIA DE LA TENIASIS Y CISTICERCOSIS HUMANA

Taenia solium es un endoparásito obligado que pertenece al filo de los platelmintos (del griego *platys*, “plano” y *hélminthos*, “gusano”) y a la clase cestoda (del latín *cestum*, “cinta” y del griego *eidés* “con forma de”).

El estudio inicial de éste parásito se remonta a la antigua Grecia en donde Hipócrates, Aristóteles y Teofrasto lo denominan “gusano plano” por su parecido a listones o cintas.

En los inicios de la era cristiana el árabe Serapión, en base a observaciones, fue llevado a creer que cada proglótido era un gusano individual debido a la gran capacidad de movimiento que cada uno presentaba, aun cuando se encontraban desprendidos del estróbilo (1).

Los musulmanes denominaron a los proglótidos como “curcubitineos” debido a su parecido con las semillas de la calabaza (llamada curcubita por las tribus Americanas), pero también por el hecho de que estas mismas semillas solían ser uno de los remedios habituales en contra de la teniasis (1).

A comienzos del siglo XIV Arnau de Vilanova comienza a realizar las primeras descripciones de la especie, entre ellas la errónea creencia de que la infección sólo presentaba un gusano adulto por individuo parasitado (2).

Ya en 1718 el francés Nicholas Andry se convierte en la primera persona en proponer que el gusano adulto está estructurado por cabeza, cuerpo y cola; además de ilustrar morfológicamente el escólex de un gusano aplanado que fue aislado de heces fecales de un humano (2).

A mediados y finales del siglo XIX se realizaron grandes esfuerzos por parte de científicos como: Friedrich Küchenmeister, Friedrich Leuckart y Karl Theodor Ernst von Siebold entre otros, para poder determinar el ciclo parasitario de la enfermedad. A partir de lo descubierto fue posible establecer medidas higiénicas que llevaron a casi erradicar la enfermedad en países Europeos y en los Estados Unidos de Norteamérica (3).

En 1901 el Dr. Ignacio Gómez Izquierdo publicó el primer informe de un caso de cisticercosis en México, en él se describía a un paciente de Cuba que murió en un asilo psiquiátrico y que durante la necropsia mostró múltiples cisticercos distribuidos en su anatomía (1).

En la actualidad la cisticercosis sigue considerándose endémica en casi todos los continentes, a excepción de Australia y de aquellas zonas en donde el consumo de carne porcina no es habitual por convicciones religiosas.

En países de Europa y en Estados Unidos de Norteamérica se había considerado a la cisticercosis como erradicada gracias al desarrollo de la estructura sanitaria; sin embargo, en los últimos años se ha notado un incremento en la incidencia de casos, ocasionando que se le considere como una enfermedad emergente y que se ve asociada a fenómenos de migración de personas originarias de países en desarrollo y en donde la infraestructura sanitaria es deficiente (4).

II. CISTICERCOSIS EN MÉXICO

En México se han realizado, durante las últimas décadas (entre 1974 y 1991), una serie encuestas epidemiológicas a nivel nacional con muestras que intentan reflejar la realidad de la enfermedad en nuestro país.

De estas se pudo determinar una seroprevalencia nacional de alrededor del 1.2% y que varía según la zona geográfica que sea estudiada (5); además de que cerca

del 15% de las viviendas estudiadas presentaron por lo menos una persona con seropositividad a anticuerpos en contra de antígenos del metacestodo y cerca del 2% de las viviendas tenían a dos o más personas seropositivas, señalándonos que la población en general tiene una gran probabilidad de estar en contacto con el parásito (6).

Si a estos bajos porcentajes de recurrencia le sumamos la disminución en la incidencia de la teniasis que se ha registrado desde 1990 hasta el 2005 (6); la conclusión pareciera ser que los problemas derivados de ésta parasitosis no son tan graves.

La realidad es que estos números no reflejan la seriedad y gravedad que la cisticercosis representa para el sistema de salud Mexicano, y en donde la cisticercosis parece mantener la misma recurrencia a lo largo del mismo periodo (Figura 1) manteniéndose como la principal causa de consulta neurológica por epilepsia y como la causa del 20-25% de craneotomías realizadas en instituciones especializadas (5).

Otro factor importante a considerar, y que agrega importancia a la enfermedad, es que la cisticercosis en sistema nervioso central (SNC) causa graves consecuencias neurológicas en los individuos que la padecen, lo cual afecta en gran medida su calidad de vida.

Para el sector salud la enfermedad se asocia con altos gastos debido a factores como: que el diagnóstico de los pacientes requiere de herramientas y técnicas que resultan costosas, los tratamientos por largos periodos de tiempo, las múltiples consultas que se requieren para llevar el seguimiento de la enfermedad y la intervención quirúrgica que en ocasiones es requerida.

Todo lo anteriormente listado pone en perspectiva lo importante que es el entendimiento y estudio de la parasitosis como el medio que nos permita establecer estrategias de prevención y tratamiento mucho más eficaces.

Es de hacer notar en éste punto que toda la problemática que rodea la enfermedad podría ser minimizada y posiblemente erradicada con una serie de medidas que, en principio, parecen ser sencillas de acatar pero que conllevan una profunda serie de cambios en infraestructura, regulación, costumbres y hábitos que los mexicanos no hemos podido adoptar; ya sea por limitantes como la simple difusión de información con respecto a la enfermedad o tan severos como la persistencia de condiciones de pobreza e insalubridad que persisten tanto en zonas rurales como en zonas urbanas.

De entre las medidas antes mencionadas se encuentran:

- La regulación sanitaria en el mercado de carne porcina, eliminando “mataderos” clandestinos y los mercados en los que operan, pues la venta de carne de animales criados bajo condiciones no certificadas origina un riesgo de introducir la parasitosis en la población.
- La implementación y mejoramiento de infraestructura sanitaria en zonas empobrecidas (servicio de agua potable, drenaje y pavimentado ente otros) pues disminuyen la posibilidad de que el ciclo de vida del parásito se cumpla.
- El seguimiento de hábitos de higiene básicos en la población en general: adecuado lavado de manos antes de preparar alimentos y después de ir al baño, evitar el fecalismo al aire libre y cocción adecuada de alimentos; lo que permitiría disminuir en gran medida los riesgos de contraer tanto la teniasis como la cisticercosis.
- Por último, y no menos importante, se encuentra el informar a la población ya que aún existe mucha confusión acerca de lo que la enfermedad es, lo que la causa y las vías de infección que presenta.

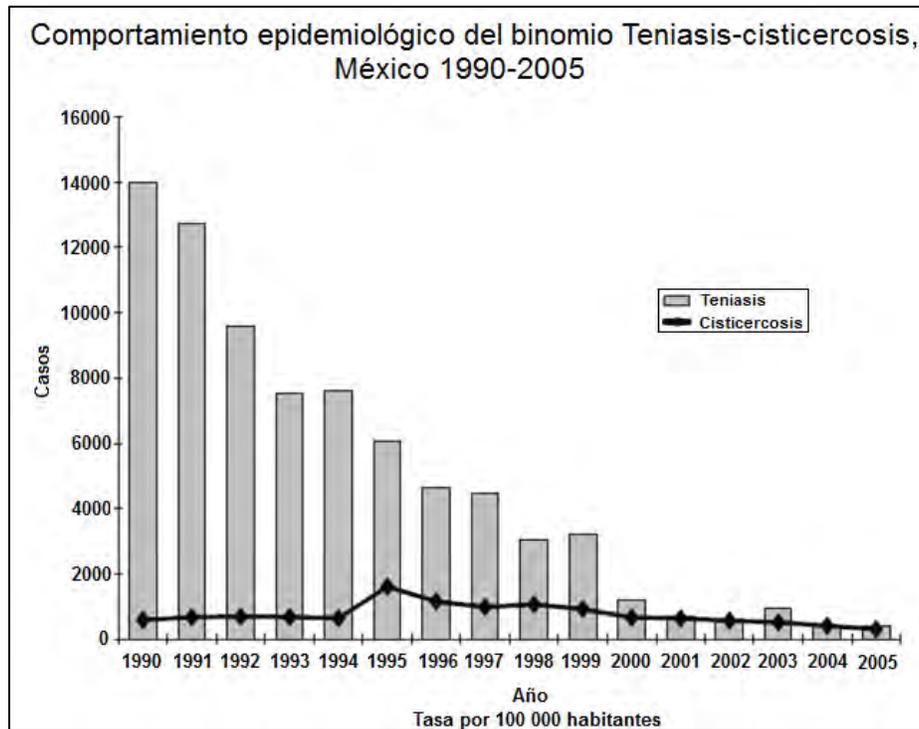


Figura 1. Recurrencia de la teniasis y cisticercosis por *Taenia solium* en México, de acuerdo al informe epidemiológico del sistema nacional de epidemiología del 2007.

III. ANATOMIA Y FISIOLOGIA DE *Taenia solium*

El parásito multicelular platelminto denominado como *Taenia solium* adulta es un parásito cestodo, segmentado, con la capacidad de desarrollarse hasta una longitud de 9 metros y cuyo cuerpo se divide morfológicamente en las siguientes porciones:

Escólex: considerada como la cabeza del platelminto es una estructura semiesférica de aproximadamente 1 mm de diámetro y en donde se encuentran órganos de sujeción especializados cuya tarea es la de permitir el establecimiento del parásito en la luz intestinal.

Estos órganos de sujeción son: cuatro ventosas cuya acción de succión funciona como mecanismo de adhesión inicial y una doble corona de ganchos (con diámetro de 130-180 μ m) circundando el róstelo con la capacidad de penetrar en

el epitelio gástrico proporcionando una mayor sujeción pero generando un daño mínimo en el sitio de fijación.

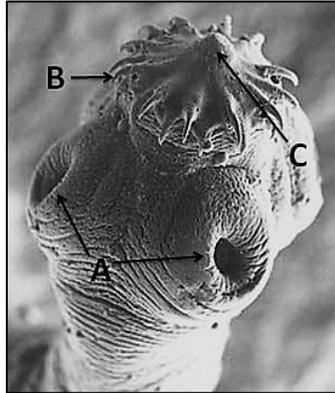


Figura 2. Micrografía del escólex de *Taenia solium*, se observan 2 de sus 4 ventosas (A) y la corona doble de ganchos (B) circundando el róstelo (C).

Cuello: es la zona en donde el escólex da origen al estróbilo; sin embargo esta zona tiene la particularidad de no presentar segmentación u órganos sexuales (ambas características de los proglótidos del estróbilo). El cuello sirve como zona germinal en donde los proglótidos son producidos.

Estróbilo: es una serie lineal de estructuras reproductivas en donde se encuentran ambos sexos y que se encuentra rodeadas de una matriz de tejido denominado proglótido (de 800 a 1000 proglótidos).

Así pues los proglótidos pueden ser clasificados como:

- Proglótidos inmaduros: son aquellos que se encuentran cercanos al cuello y cuyos órganos sexuales no se encuentran diferenciados.
- Proglótidos maduros: son aquellos que han sido desplazados a la zona media de la cadena estrobilar y cuyos órganos sexuales se han diferenciado y madurado. A diferencia de los inmaduros, estos proglótidos son más anchos que largos.
- Proglótidos grávidos: son aquellos que se localizan en la porción final de la cadena estrobilar y que contienen huevos como resultado del proceso de

autofecundación (de 50,000-60,000 huevos cada proglótido). Hacia esta fase los proglótidos cambian de dimensiones volviéndose más alargados que anchos.

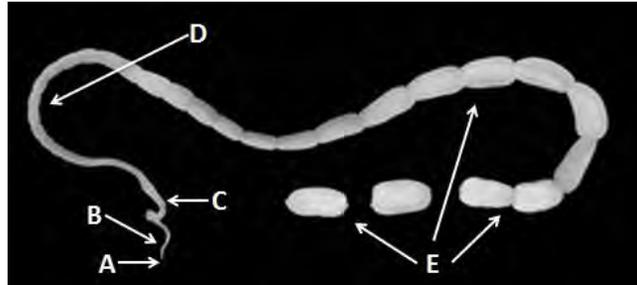


Figura 3. Fotografía de *Taenia solium* adulta, se observa el escólex (A), el cuello (B), los proglótidos inmaduros (C), proglótidos maduros (D) y proglótidos grávidos (E) con alrededor de 50,000 huevos.

Tegumento: al carecer de aparato digestivo, *T. solium* depende para su alimentación de absorber los nutrientes que requiere a través de su cobertura externa; esta cobertura posee la particularidad de estar recubierta por microtricas.

Las microtricas son estructuras rodeadas de una membrana plasmática semejante a las microvellosidades presentes en la mucosa intestinal de humanos, y al igual que estas; tienen la función de maximizar el área que sirva para el proceso de absorción de nutrientes.

Los principales mecanismos de transporte de nutrientes que el tegumento presenta son: el transporte activo (a través del funcionamiento de bombas de iones), difusión facilitada (forma de transporte pasivo en donde el paso de moléculas está regulado por proteínas), difusión simple (forma de transporte pasivo en donde el paso de moléculas sucede por efecto del gradiente de concentración) y para el caso del cisticerco de *T. crassiceps* ha sido detectada la capacidad de absorber nutrientes por pinocitosis.

Sistema reproductivo: *T. solium* es un parásito monoico, es decir; que posee tanto órganos sexuales masculinos como femeninos lo que lo hace capaz de

reproducirse en forma independiente de la presencia de un segundo individuo de su especie.

Los órganos sexuales se desarrollan y maduran conforme los proglótidos avanzan hacia el final de la cadena estrobilar. Comúnmente los órganos sexuales masculinos son los primeros en madurar produciendo espermatozoides que es almacenado en espera de que los ovarios lleguen a su madurez y produzcan una serie de ovocitos capaces de ser fecundados.

Cuando los ovocitos maduros han sido fecundados, comienzan a desarrollarse hasta la formación de huevos; éste proceso se lleva a cabo dentro del útero y sus ramas laterales (de 7 a 13 ramas en el caso de *T. solium*).

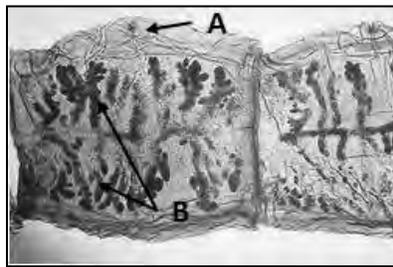


Figura 4. Fotografía de proglótidos grávidos de *Taenia solium* teñidos con tinta China, se observan el atrio genital (A) y las ramas uterinas llenas de huevos (B).

Estos proglótidos grávidos con sus ramas uterinas repletas de huevos se desprenden del cuerpo de la Taenia adulta y expulsadas junto con las heces.

IV. CICLO DE VIDA DE *Taenia solium*.

El ciclo de *T. solium* inicia cuando los proglótidos grávidos de un adulto se desprenden del cuerpo estrobilar, son arrastrados junto con las heces fecales y en el proceso fragmentadas ocasionándose la liberación de los huevos.

Los huevos son esféricos, con un diámetro aproximado de 50 μm , recubiertos de una estructura denominada embrióforo que se compone de bloques de una

proteína similar a la queratina y cuya función es la de otorgar propiedades impermeables y de resistencia al medio ambiente; en el interior de éste embrióforo se encuentra un embrión hexacanto (del griego *hexi*, “seis” y *akantha*, “espina”).

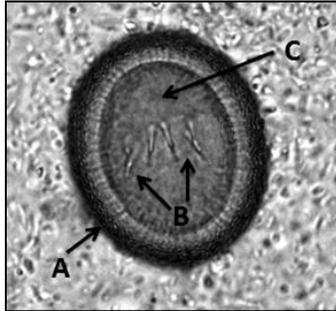


Figura 5. Huevo de *Taenia solium*, se observa el embrióforo (A), los tres pares de ganchos (B) y el embrión (C).

En una segunda etapa, del ciclo de vida de *T. solium*, los huevos liberados al medio ambiente son ingeridos por el hospedero intermediario (el cerdo) dónde el embrióforo es degradado por acción enzimática dejando libre la oncósfera (embrión hexacanto recubierto de una capa vitelina). La oncósfera activada en el intestino (por efecto de sales biliares y actividad enzimática) utiliza sus tres pares de ganchos como herramientas que le permiten atravesar la pared intestinal y alcanzar el torrente sanguíneo del cual se valdrá para llegar a otras zonas anatómicas y en donde se desarrollará a su fase de metacestodo o cisticerco.

El metacestodo se caracteriza por ser una estructura oval, con un tamaño entre los 5-20 mm, de apariencia blanquecina, translucido, relleno de líquido y con un escólex invaginado.

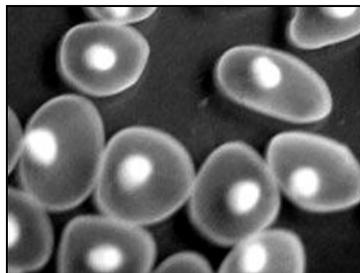


Figura 6. Metacestodos o cisticercos de *Taenia solium*, la estructura central blanquecina contiene el escólex invaginado.

El paso del parásito desde el hospedero intermediario al definitivo sucede cuando un humano ingiere carne de cerdo con el metacestodo viable como consecuencia de un pobre proceso de cocción. Ya en el sistema digestivo humano el metacestodo es activado para pasar a su fase adulta, el proceso inicia con la evaginación de su escólex, su fijación al intestino delgado y finalmente la generación del cuello y cuerpo estrobilar, proceso que puede tomarle cerca de 2 meses.

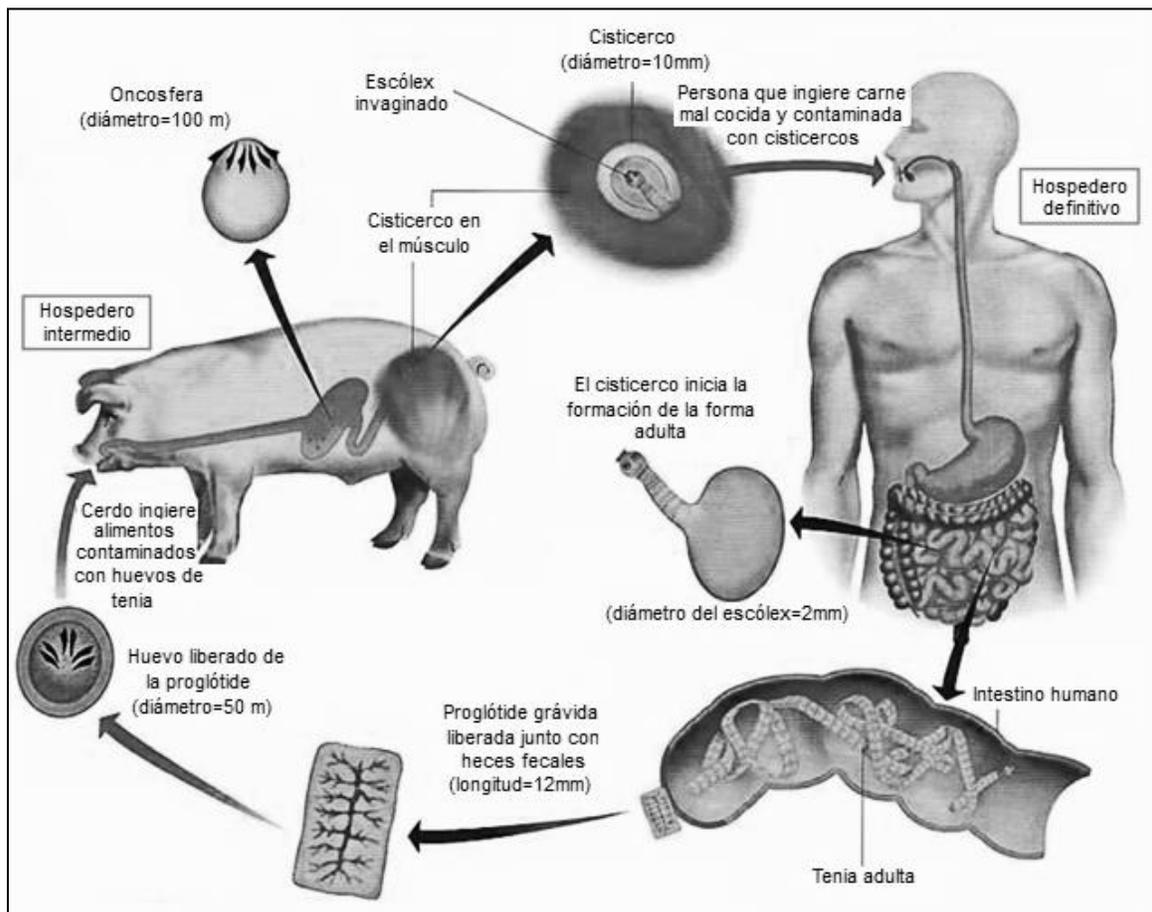


Figura 7. Ciclo de vida de *Taenia solium*, el humano actúa como hospedador definitivo adquiriendo teniasis y el cerdo actuando como hospedero intermediario adquiriendo cisticercosis.

El ciclo reinicia cuando la fase adulta en el intestino genera proglótidos grávidos que llevan a cabo la producción y liberación de huevos. Bajo estas condiciones del ciclo de vida, el humano es afectado con la enfermedad denominada teniasis, la cual es usualmente considerada como inocua.

Durante el paso del parásito de un hospedero a otro existe la posibilidad de que el ser humano actúe como un hospedador intermediario accidental generándose en él la enfermedad denominada como cisticercosis.

V. CISTICERCOSIS Y NEUROCISTICERCOSIS HUMANA

Como se ha mencionado, la cisticercosis es una enfermedad que puede afectar al humano, enfermedad en la que el cisticerco se puede desarrollar en cualquier zona anatómica; siendo las más comunes el tejido subcutáneo, músculos, hígado, pulmones, ojos y SNC.

De todas las formas mencionadas la que se destaca por su severidad y letalidad es la que se desarrolla en el SNC, denominada como neurocisticercosis (NC). Cabe mencionar que en estos casos se ha observado que la forma viable del parásito rara vez ocasiona problemas debido a la presencia de mecanismos que regulan la respuesta inmune local del hospedero, toda la sintomatología y daño en la zona se produce cuando el parásito muere y deja de existir esta regulación; desencadenándose una respuesta inflamatoria y que es la que ocasiona el daño al tejido y sus correspondientes síntomas.

La sintomatología ocasionada por la cisticercosis es muy variada, cuando el cisticerco está alojado en tejido subcutáneo, en músculo-esquelético, hígado y pulmones la enfermedad apenas es detectable y la mayoría de las veces no causa mayores problemas.

Los sitios en donde se ocasionan daños serios son: el ojo, en donde se pueden causar daños irreversibles a la retina, iris y a la membrana coroides.

El otro sitio de daño importante es cuando afecta al SNC ocasionando ceguera, parálisis, desequilibrio, desorientación, epilepsia, ataques espontáneos e

hidrocefalia obstructiva; sin embargo estos síntomas observados durante la NC resultan vagos y poco específicos a la enfermedad por lo que rara vez la presencia de estos síntomas se ligan al diagnóstico de la NC.

Los mecanismos por los que el ser humano puede contraer cisticercosis (7) son:

1. Heteroinfección: por la ingestión de huevos de *T. solium* provenientes de un segundo individuo que está afectado por teniasis.
2. Autoinfección externa: cuando una persona con teniasis ingiere los huevos que él mismo expulsa como consecuencia de malos hábitos de higiene (mecanismo de transmisión vía fecal-oral).
3. Autoinfección interna: posible mecanismo que ocurre cuando, por efectos de peristalsis inversa, los huevos y las proglótidos producidas en una persona con teniasis pasan directamente desde el intestino delgado hacia el estómago; sin embargo éste mecanismo no se ha comprobado.

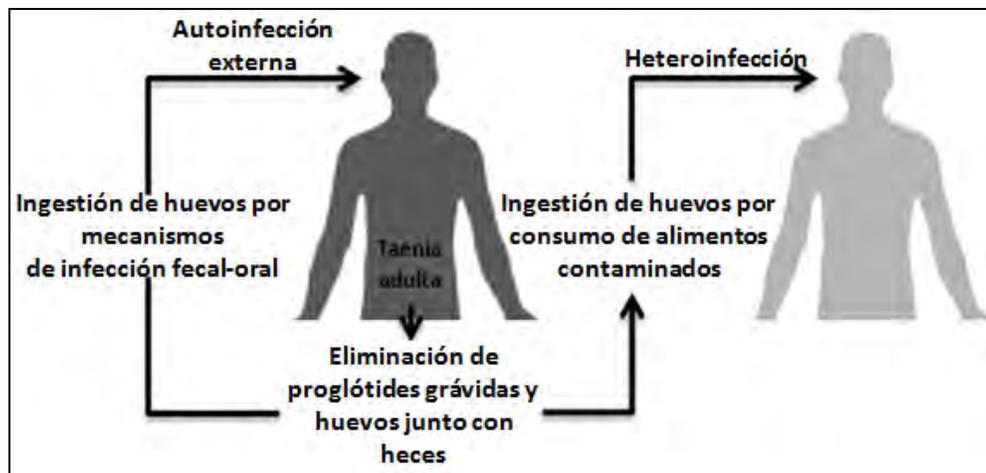


Figura 8. Mecanismos más comunes de infección para la cisticercosis por *Taenia solium* en humanos.

VI. DIAGNÓSTICO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA

Las formas de cisticercosis en zonas anatómicas como tejido musculo-esquelético, tejido subcutáneo e hígado generalmente no derivan en condiciones que sean detectables o que causen graves problemas y por lo tanto su diagnóstico rara vez

es una prioridad; por su parte la que se desarrolla en ojo generalmente resulta de fácil diagnóstico.

Caso contrario es la NC, la cual genera grandes problemas y riesgos; y la que, por sus síntomas no específicos, puede ser fácilmente confundida con otros padecimientos neurológicos haciéndola complicada de diagnosticar.

Entre los métodos de fácil acceso y que son ampliamente usados para el diagnóstico de laboratorio está la técnica de ELISA (del inglés *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*), en donde se detecta la presencia de inmunoglobulinas IgG en contra del metacestodo y que usualmente se realiza con muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) o muestras sanguíneas.

A pesar de que este método presenta una alta sensibilidad y especificidad, de estudios estadísticos realizados en México con muestras provenientes de pacientes con NC confirmada (8), se pudo determinar:

- Que la prueba sólo tiene validez cuando se realiza con LCR y no cuando la muestra es sanguínea.
- Que no siempre es un estudio definitivo ya que la negatividad de la prueba, en casos positivos de NC, se puede deber a baja concentración de anticuerpos en LCR.
- Que la cantidad de cisticercos en el SNC es un factor importante, si el número de éstos es muy bajo se podrían obtener resultados falsos negativos.
- El correcto manejo de las muestras es importante, ya que la degradación de las mismas puede derivar en obtener falsos negativos como resultado.

Sin embargo, es importante señalar que recientemente se han estado desarrollando estudios de ELISA que resulten en pruebas más específicas y en donde los antígenos de prueba son derivados del parásito *Taenia crassiceps*. De

estos estudios se ha observado una eficacia cercana al 100% al retar estos métodos con muestras de LCR de pacientes positivos a NC (9).

Otro método inmunológico es el EITB (del inglés *Enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot Assay*), en donde el suero del paciente reacciona con proteínas específicas del parásito. Este último método tiene la ventaja de ser mucho más sensible y específico que un ELISA; lamentablemente en la actualidad su uso no es rutinario y se ve en desventaja debido al costo que la prueba representa en comparación con el ensayo enzimático (ELISA).

Sin embargo las ventajas, que el método de EITB ofrece, son las razones por las que durante los últimos años se ha continuado en la búsqueda de una serie de antígenos de *T. solium* que puedan ofrecer una forma de diagnóstico que resulte confiable, rutinaria y de menor costo. Entre los antígenos hasta ahora estudiados y que han observado resultados prometedores están: la paramiosina, antígenos de excreción-secreción y glicoproteínas obtenidas con *Lentil lectina*.

Así pues, actualmente se considera que las pruebas definitivas en el diagnóstico de NC son las que implican el análisis de imágenes tales como la resonancia magnética nuclear (RMN), la tomografía axial computarizada (TAC) y la demostración histológica u observación directa del parásito (4). Por lo que los métodos inmunológicos (ELISA y EITB) sólo son considerados métodos de apoyo para diagnóstico y que por sí solas no representan una forma de diagnóstico definitivo y que permita confirmar o excluir la enfermedad (4).

La RMN y TAC proveen otras aportaciones importantes durante el diagnóstico de la NC: conocer el número exacto de cisticercos, su localización precisa, su viabilidad (es decir, si la neurocisticercosis es activa, transicional, inactiva o mixta) además de permitir establecer la magnitud del daño que el cisticerco ha ocasionado en el tejido circundante.

VII. MODELO MURINO DE METACESTODIASIS

Como consecuencia de la importancia que representa el estudio de la NC se ha tenido que recurrir al estudio de la enfermedad en modelos de laboratorio con el fin de entenderla mejor, los fenómenos que ocasionan su progresión, los factores patogénicos con los que cuenta el parásito, los factores que hacen que un hospedero se vea afectado o logre eliminar la infección y, en últimas instancias, poder trazar estrategias de combate en contra de la enfermedad.

El modelo de cisticercosis o metacestodiasis causado por *Taenia crassiceps* en el ratón se ha utilizado debido a su utilidad práctica. El ciclo de vida de *T. crassiceps* tiene grandes similitudes con el de *T. solium*: depende de un hospedero intermediario (en este caso ratones, ratas y marmotas) y de un hospedero definitivo (cánidos como: lobos, perros, zorros árticos y zorros rojos); con mecanismos de paso de un hospedador a otro que resultan similares a las que presenta *T. solium*.

El adulto de *T. crassiceps* localizado en el intestino delgado de cánidos también es hermafrodita, por lo que es capaz de producir huevos en forma autónoma; estos huevos son liberados y depositados junto con las heces. Los huevos se mantienen en pastos y vegetación por lo que son susceptibles de ser ingeridos por ratones y ratas quienes permiten así el paso de los huevos hacia la fase de metacestodo.

Una vez ingeridos los huevos, éstos liberan la oncósfera con la capacidad de atravesar el epitelio estomacal y así establecerse en otras zonas anatómicas en donde poder desarrollarse hasta la fase de metacestodo.

En forma natural, los tejidos más comunes en donde los metacestodos de *T. crassiceps* se localizan son: tejido subcutáneo, cavidad peritoneal y cavidad pleural (10). Finalmente los cánidos consumirán a los hospederos intermediarios

infectados, ingiriendo así las fases de metacestodos que pasaran hasta su fase adulta en el intestino delgado, cerrando así el ciclo.

El estudio de la fase adulta de *T. crassiceps* ha sido posible gracias a la producción experimental de los mismos en el modelo de hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*); bajo el cual es posible la obtención de los adultos en forma continua y en forma más sencilla que a partir de sus hospederos salvajes (10).

De éstos estudios se han podido observar muchas similitudes de su morfología adulta con respecto a la de *T. solium*:

- Un escólex con 4 ventosas y un róstelo con ganchos en forma de espina.
- Cuerpo estrobilar con proglótidos maduros hacia el final del cuerpo.
- Proglótidos recubiertas de tejido tegumental recubierto de microtricas.

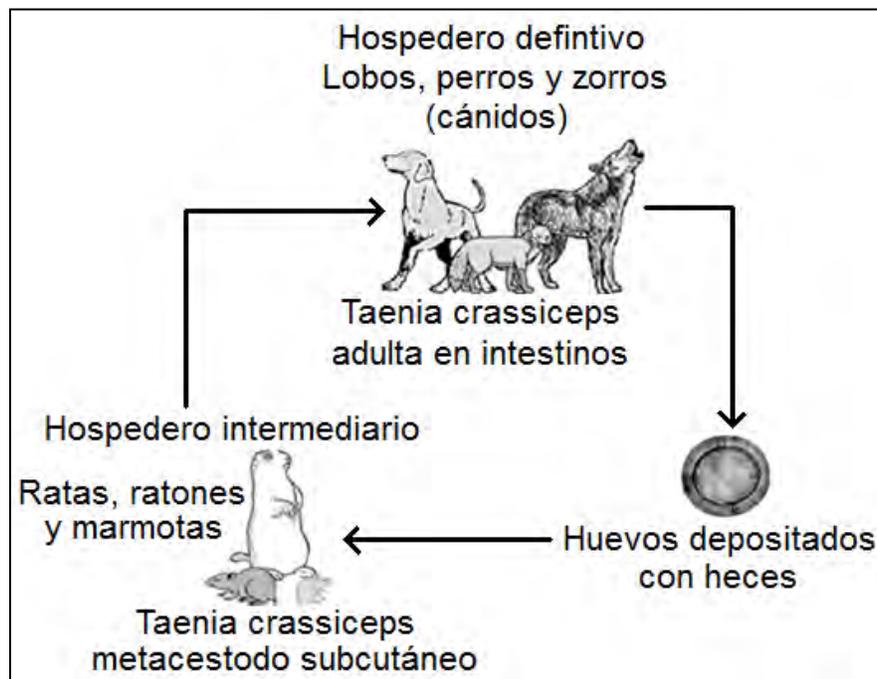


Figura 9. Ciclo de vida para *Taenia crassiceps*, hospederos intermediarios, hospederos Definitivos y los mecanismos de paso entre éstos.

Por su parte, la fase de metacestodo de *T. crassiceps* mantiene una gran homología con el de *T. solium* siendo estructuras muy similares. Y aunque estas similitudes son notables, la razón más importante y que da validez al modelo es que, de estudios antigénicos realizados a ambos platelmintos, se ha podido determinar que existe una homología entre algunas de sus determinantes antigénicas. Este hecho se ve reflejado en fenómenos de reacciones serológicas cruzadas que son capaces de conferir cierta protección (11) y que han sido aprovechadas como un recurso de obtención sencilla y económica de antígenos que puedan ser utilizados en procesos de diagnóstico de *T. solium* en laboratorio (9).

Finalmente la experimentación bajo el modelo murino posee las ventajas de ser:

- De fácil manejo dentro de las instalaciones del laboratorio.
- Accesible debido a la facilidad de encontrar distribuidores de animales de laboratorio que cumplan con las normas requeridas.
- De bajo costo con relación al modelo porcino.
- Sencillo de mantener en el laboratorio, debido a la capacidad que tienen los cisticercos de multiplicarse por gemación (reproducción asexual), proporcionando una reserva continua del parásito.
- Representar un riesgo biológico mínimo para humanos.

Sin duda todos los anteriores son importantes puntos a favor con respecto al modelo en cerdo; el cual posee las siguientes desventajas:

- La que implica mantener cerdos en condiciones de laboratorio (instalaciones e infraestructura).
- El gran número de animales que se requiere para realizar ensayos con validez estadística y el costo derivado de éste hecho.

- Las complicaciones derivadas del sacrificio de éstos animales, lo cual generaría una gran cantidad de desechos con el potencial de representar riesgos biológicos.

Por medio de estudios de cinéticas de infección realizados al modelo de metacestodiasis murina, se logró establecer que las ratones hembra de la cepa BALB/cAnN son particularmente susceptibles a la infección de metacestodiasis por la cepa ORF de *T. crassiceps* como consecuencia del fondo genético que presentan ([12](#), [14](#)), moléculas de histocompatibilidad ([13](#), [14](#)) y factores hormonales/sexuales ([15](#)); por lo que actualmente son el modelo de elección para el estudio de la metacestodiasis en condiciones de susceptibilidad.

La cepa ORF de *T. crassiceps* es el resultado de una mutación que derivó en la pérdida del escólex en la fase de metacestodo, como consecuencia ésta cepa es incapaz de generar la forma adulta en el hospedero definitivo. Sin embargo, tiene la capacidad multiplicarse por gemación en forma rápida, con respecto a las demás cepas, lo que la hace una cepa más infectiva y que otorga la ventaja de realizar estudios en periodos de tiempos reducidos ([16](#)).

VIII. RESPUESTA INMUNE ANTE LA METACESTODIASIS MURINA

Junto con el progresivo estudio de la respuesta inmune se comenzaron a establecer los diferentes papeles que las células del sistema inmune jugaban; en el caso particular de células T se pudieron definir diferentes subpoblaciones y se llegó a mediados de los 80's al establecimiento del paradigma Th1/Th2 ([18](#), [19](#)).

Éste paradigma señala que los linfocitos T CD4+ son capaces de adoptar uno de dos posibles perfiles de producción de citocinas e interleucinas con funciones específicas y antagónicas entre sí. Sin embargo, durante los últimos años y derivado de estudios en humanos, se han realizado cuestionamientos de éste supuesto paradigma.

No obstante el cuestionamiento del paradigma Th1/Th2, esta teoría es aplicable a la respuesta inmune de ratones durante la metacestodiasis, en donde existe una marcada diferencia entre el efecto que uno u otro perfil inmunológico tiene sobre la infección en ratones susceptibles.

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios inmunológicos del proceso de metacestodiasis intraperitoneal murina, algunos con cepas de ratones resistentes y una mayoría con cepas de ratones susceptibles (BALB/c).

De estos últimos se ha podido establecer que la respuesta inmune durante la metacestodiasis está compuesta por una serie de factores y células que cambian de perfiles inmunológicos a lo largo de la infección de una respuesta inicial tipo Th1 a una Th2.

Al final, este cambio de perfil Th1 a perfil Th2 es el que ocasiona un ambiente inmunológico que favorece el desarrollo de la infección parasitaria en ratones BALB/cAnN ([17](#), [15](#)). Contrario a lo que usualmente es esperado en otras parasitosis y en donde el cambio a respuesta tipo Th2 es la que permite resolver la infección (principalmente en parasitosis intestinales causadas por nematodos).

Actualmente se ha podido establecer que la respuesta tipo Th2, antes considerada como la respuesta inmune efectiva en contra de parásitos, no lo es en todos los casos de parasitosis, algunos ejemplos son: *Taenia crassiceps* y *Brugia malayi* ([20](#)).

En la fase inicial de la respuesta inmune innata, los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos, son reclutados en el sitio de infección debido al efecto quimioatrayente que presentan algunos componentes y productos de secreción que el parásito origina; además de los quimioatrayentes que las células

del sistema inmune innato son capaces de producir como consecuencia de su exposición directa al parásito.

La función de éstas células en el sitio de infección es la de degradar y eliminar pequeños fragmentos del parásito, procesar los antígenos y posteriormente presentarlos a las células de la respuesta inmune adaptativa. Además, como consecuencia de éste estímulo antigénico, los macrófagos comienzan a producir una serie de factores que son capaces de realizar un ataque directo sobre el parásito.

Al iniciar la respuesta inmune adaptativa a través del accionar de linfocitos T CD4+ (denominados también como linfocitos T cooperadores), existe un reconocimiento de los diferentes antígenos presentados; ocasionándose que se vean polarizados a adoptar un perfil de secreción de interleucinas definido. Y aunque este estímulo es uno de los principales, cabe mencionar que dicha polarización también se ve influenciada por el efecto de interleucinas y citocinas producidas por las células presentadoras de antígenos en las primeras fases de respuesta inmune.

En primera instancia, durante la metacestodiasis murina predomina el perfil definido como Th1, caracterizado por ser un perfil pro-inflamatorio y enfocado en la activación clásica de macrófagos y de linfocitos CD8+ (denominados también como linfocitos T citotóxicos) que tiene como principal función la de eliminar y atacar a patógenos intracelulares; sin embargo este estado inmunológico es el que resulta restrictivo para la metacestodiasis.

Posteriormente, con el avance de la infección, existe un cambio en el proceso inmunológico pasando de un perfil predominantemente tipo Th1 hacia uno predominantemente tipo Th2. Este último se caracteriza por la producción de citocinas anti-inflamatorias y se enfoca en dos tareas importantes: la activación de linfocitos B que puedan disparar la respuesta inmune mediada por anticuerpos como medio de combatir patógenos extracelulares y la limitación del proceso de

respuesta inflamatoria que derivaría en daños a los tejidos de mantenerse por periodos largos y sin regulación.

Es de hacer notar que en esta segunda etapa de la respuesta inmune es en donde la metacestodiasis murina en ratones BALB/c encuentra un estado inmunológico permisivo y en donde los mecanismos de contención a la infección dejan de ser efectivos.

Los linfocitos CD4+ con un perfil inmunológico tipo Th1 actualmente se caracterizan por la producción de las citocinas: IFN- γ , IL-2 e IL-12 (19). Bajo este microambiente de citocinas, los macrófagos, adoptan un estado denominado clásicamente activado o M1 como forma de analogía al perfil Th1.

Por su parte los linfocitos CD4+ con un perfil inmunológico Th2 se caracterizan por la producción de las citocinas IL-4, IL-13, en menor medida IL-5 y en ciertos fenotipos IL-10 (19). Bajo estas condiciones de citocinas los macrófagos son llevados a otro estado de activación denominado como alternativamente activado o M2 como analogía al perfil Th2.

También es importante mencionar que la polarización de las células T CD4+ en el equilibrio Th1/Th2 no está exento del efecto de otras citocinas producidas por otros tipos celulares tales como: células dendríticas, células NK (del inglés *Natural Killer*) y basófilos

Aunque en un principio la teoría de diferenciación de macrófagos en M1 y M2 (o clásicamente activados y alternativamente activados) resultó satisfactoria, en la actualidad se ha podido notar que resulta limitada para explicar el abanico de estados inmunológicos que los macrófagos son capaces de adoptar.

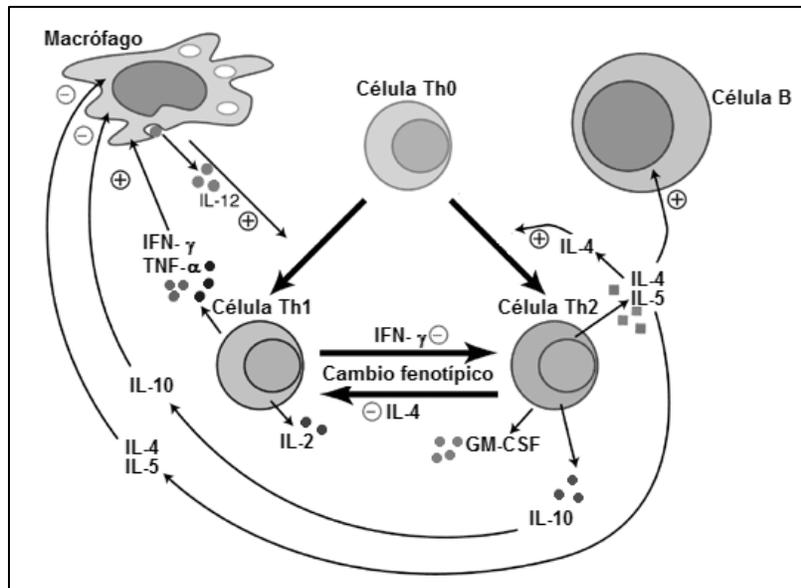


Figura 10. Polarización de linfocitos T CD4+ hacia los fenotipos Th1 o Th2 y su efecto sobre otros tipos celulares. El efecto positivo (+) sobre macrófagos denota su activación hacia el tipo M1 mientras que el efecto negativo (-) lo hace hacia el fenotipo M2.

IX. SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR.

De entre las células que tienen un papel importante a lo largo del desarrollo de la respuesta inmune Th1 y Th2 están las del sistema mononuclear fagocítico (SMF), tanto por que pueden contribuir al perfil inmunológico mediante la producción de citocinas que refuerzan la polarización del perfil, como por que se ven fuertemente influenciadas por los cambios en el microambiente de citocinas durante los cambios de perfiles Th1/Th2 de los linfocitos CD4+.

El SMF es un conjunto de células con capacidad fagocítica que se encuentran distribuidas en los tejidos, las cuales se denominan en forma genérica como macrófagos pero que reciben nombres específicos en función del tejido en que se encuentren:

- a) Histiocitos cuando están en tejido conectivo.
- b) Células de Kupffer cuando están en hígado.
- c) Macrófagos alveolares cuando están en pulmón.
- d) Osteoclastos cuando están en hueso.

- e) Microglía cuando están en sistema nervioso.
- f) Células de Langerhans cuando están en piel.
- g) Células mesangiales intraglomerulares cuando están en riñón.

Todas las células que componen el SMF tienen un precursor sanguíneo denominado monocito, el cual tiene la capacidad de salir del torrente sanguíneo y diferenciarse en célula fagocitaria.

Los cambios que sufren las células en su transformación de monocitos a macrófagos específicos de tejidos son considerables. Entre ellos están: un aumento de entre 5-10 veces su tamaño, un aumento del número y complejidad de los organelos, aumento de su capacidad fagocítica, producción de altos niveles de enzimas hidrolíticas y comienzan a sintetizar una variedad de factores solubles (citocinas y quimiocinas).

X. ESPECTRO DE ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS

Como ya se mencionó anteriormente, los macrófagos son unas de las células encargadas de iniciar la respuesta inmune, además de ser una pieza clave que sirve de puente entre la respuesta inmune innata y la adaptativa.

Sin embargo, estas representan un componente celular complejo, capaz de adoptar diferentes estados inmunológicos en función de los estímulos antigénicos y del microambiente de citocinas que les rodean; ya sea que estas citocinas sean producidas por los propios macrófagos o por otros tipos celulares (linfocitos entre ellos).

En un inicio, la clasificación de los macrófagos sólo contemplaba a los denominados clásicamente activados, asociados a un ambiente inmunológico tipo Th1; y los alternativamente activados, asociados a un ambiente tipo Th2.

Los denominados macrófagos clásicamente activados o M1, son células que fueron estudiadas en los 60's con macrófagos esplénicos de ratones infectados e inmunizados con bacterias facultativas intracelulares. Al estudiarlas se pudo observar que estos macrófagos tenían una capacidad bactericida incrementada, además de que existía un cambio en sus capacidades inmunológicas.

De esta forma, al estado inmunológico protector obtenido se le denominó como un estado activado y en donde las capacidades fagocitarias y digestivas inespecíficas de los macrófagos se encontraban perfeccionadas.

Posteriormente, del esfuerzo de obtener modelos *in vitro* que fueran capaces de producir este estado de activación en macrófagos, se llegó al uso de una citocina producida por linfocitos cooperadores tipo Th1 (el IFN- γ) y de lipopolisacáridos (LPS) como inductores de éste estado.

Por otra parte, el estudio de los denominados macrófagos alternativamente activados, comenzó cuando se estudiaba el efecto que tendrían interleucinas de la respuesta inmune tipo Th2 sobre los macrófagos; en particular la de IL-4. En un principio se pensaba que ésta tendría un efecto de desactivación, ocasionando que se revirtiera el estado que los LPS e IFN- γ ocasionaban.

El resultado fue que la IL-4 ocasionaba que los macrófagos vieran inhibida su capacidad de producir algunas interleucinas pro-inflamatorias a cambio de la producción de otras cuyo efecto era anti inflamatorio, fallaban en la producción de radicales de nitrógeno pero también incrementaba la expresión de algunos receptores fagocíticos (el receptor de manosa como el más importante).

Sin embargo también se encontró que monocitos humanos expuestos a IL-4 mantenían la capacidad de expresar algunas moléculas del MHC-II, en macrófagos murinos derivados de médula ósea se incrementaba la presentación

antigénica (21) y en macrófagos murinos peritoneales inducidos por Tioglicolato se ocasionaba un aumento de la actividad tumoricida (22).

Todas las características observadas llevaron a pensar que éste estado inmunológico encontrado no era propiamente una desactivación de los macrófagos, sino un estado de activación diferente al primeramente estudiado.

Con el fin de diferenciarlos se le considero al obtenido en presencia de IFN- γ y LPS como un estado de activación clásico y al obtenido por la exposición ante IL-4 como un estado de activación alternativa.

Aunque estos dos estados inmunológicos de macrófagos fueron considerados como las dos formas de activación de macrófagos hasta mediados y finales de los 90's, los más recientes estudios han señalado lo limitada de esta clasificación y la gran plasticidad que éstas células presentan (23, 24, 25, 26).

Entre las propuestas más recientes para categorizar a los macrófagos se encuentra la que indica que los macrófagos son capaces de adoptar por lo menos cinco estados diferentes de activación: el M1 (o clásicamente activado) y cuatro agrupados bajo la denominación de M2 (o alternativamente activados); cada uno con diferentes características y funciones.

Si bien, el estudio de estos diferentes estados de activación en macrófagos se ha realizado en forma más extensiva durante los últimos años, la realidad es que aún no está del todo claro los inductores que *in vivo* ocasionan una u otra diferenciación, los marcadores que nos pueden servir como diferenciadores definitivos de unos u otro, ni su papel específico dentro de la respuesta inmune.

XI. MACRÓFAGOS MURINOS M1 O CLÁSICAMENTE ACTIVADOS

Los macrófagos M1 o clásicamente activados, actualmente son definidos como los macrófagos obtenidos bajo el efecto de estimulación de la citocina IFN- γ y por inductores de estas citocinas entre los que se encuentran aquellos que unen a TLR's (LPS como el más usado).

La presencia de éstos dos estímulos es importante ya que se ha podido observar que la exposición de macrófagos murinos al IFN- γ en un ambiente en donde no existen inductores de TLR's no conduce a la producción de óxido nítrico, un marcador considerado clásico de macrófagos M1 en el modelo murino.

En condiciones *in vivo* el proceso inicial de activación se lleva a cabo por la producción temprana de IFN- γ por parte de células NK; sin embargo esta producción no es sostenida, por lo que el estímulo es mantenido posteriormente por el IFN- γ proveniente de linfocitos CD4+.

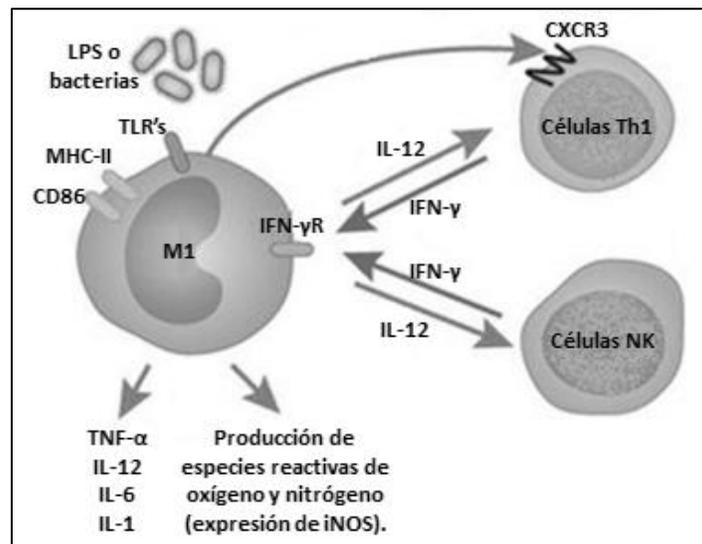


Figura 11. Estímulos para la diferenciación de macrófagos a M1, y sus productos de secreción más característicos. LPS, lipopolisacáridos; MHC-II, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad; TLR's, receptores tipo-Toll; IFN- γ , Interferón gamma; IFN- γ R, receptor del interferón gamma; CXCR3, Receptor de quimiocinas.

Por su parte, los macrófagos tienen la capacidad de contribuir a éste mismo estímulo de activación en forma autocrina debido a la producción de las citocinas

IFN- β y TNF- α que son capaces de actuar como efectoras en otros macrófagos llevándolos hacia el estado de activación M1.

Inmunológicamente los macrófagos M1 tienen la función de atacar patógenos intracelulares en forma eficaz, pueden ocasionar la lisis de células tumorales y funcionan como efectoras de la respuesta inmune tipo Th1 en linfocitos.

Recientemente, en un esfuerzo de caracterizar a los macrófagos M1, se han llegado a proponer los principales marcadores que los diferencian ([figura 11](#)):

- Producción de las interleucinas y citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-12 e IL-6).
- Aumento en la producción de moléculas del MHC-II.
- Incremento en la capacidad de presentación de antígenos.
- Producción de óxido nítrico como resultado de la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS del inglés *Inducible Nitric Oxide Synthase*).

Por último es de destacar la expresión del gen Stat4 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 4*) pues es un transductor de señales que ha probado ser importante en el establecimiento de la respuesta inmune tipo Th1 al ocasionar un incremento en la producción de IFN- γ , un factor necesario para la activación de la respuesta inmune Th1 ([32](#)).

XII. MACRÓFAGOS MURINOS M2 O ALTERNATIVAMENTE ACTIVADOS

Como ya se mencionó, los macrófagos M2 son células que se desarrollan bajo la respuesta inmune tipo Th2 y que también son capaces de inducirla; sin embargo no es un grupo de células homogéneo, ya que en la actualidad se han descrito poblaciones con funciones diversas y efectoras de un número de respuestas igual de variado.

Todo lo anterior ha ocasionado que se propusiera la subdivisión de ésta población de macrófagos M2 en: M2a, M2b, M2c y M2d.

Las principales características de los denominados macrófagos M2 son la producción de interleucinas y citocinas anti-inflamatorias (principalmente IL-10); estas células participan en funciones como la regulación de la respuesta inmune inflamatoria, la reparación y/o la remodelación de tejidos, la encapsulación de parásitos, la angiogénesis y la regulación inmune.

El primero de éste grupo son los denominados macrófagos M2a ([figura 12](#)), inducidos por el efecto de IL-4 e IL-13 que son producidas principalmente por mastocitos y basófilos cuando se producen lesiones en el epitelio mucoso. Es de hacerse notar que ambas citocinas comparten similitudes en su conformación tridimensional y que sus receptores comparten una fracción, la cadena alfa del receptor de interleucina 4 (IL-4R α).

Una vez que estos inductores se han unido a sus receptores se inicia la transducción de señales a través de varias proteínas, entre estas se encuentra STAT-6 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*) el cual se ha establecido mediante estudios como un factor indispensable para el paso de la respuesta inmune de tipo Th1 a Th2 ([31](#), [32](#)). Esta proteína, además de funcionar como transductor de señales para macrófagos M2a, ocasiona la supresión de genes que se inducen bajo el estímulo de IFN- γ y LPS (ambos inductores de macrófagos M1).

Los macrófagos M2a participan en la resolución de infecciones causadas por parásitos como nematodos y helmintos, y aunque en un inicio esta capacidad fue asociada a la producción de quitinasas o proteínas parecidas a las quitinasas por parte de los macrófagos, en la actualidad se ha podido determinar que la mayoría de ellas no posee dicha actividad de quitinasa debido a mutaciones presentes en sus sitios catalíticos.

Entre las características que los macrófagos M2a presentan están:

- Una disminución de la expresión superficial de receptores del complemento, por consecuencia su capacidad de presentación de antígenos también se encuentra disminuida.
- El aumento de la expresión de receptores no opsónicos como el receptor de manosa (RM) y el receptor de β -glucano.
- La inhibición de los efectos pro-inflamatorios de IL-1, debido al incremento de la expresión de su pseudoreceptor y a la inhibición de la producción de IL-1.
- Expresión de proteínas parecidas a quitinasas, entre las que destaca Ym1 (marcador sólo en macrófagos murinos).
- La producción de una molécula tipo resistina denominada FIZZ1 (del inglés *Found in Inflammatory Zone*) o RELM- α (del inglés *Resistin-Like Molecule alpha*).
- La expresión de Arginasa 1, una enzima que al actuar sobre la Arginina ocasiona la síntesis de precursores de colágeno y poliaminas; además de ocasionar el agotamiento del sustrato de la enzima iNOS inhibiendo así la síntesis de óxido nítrico.

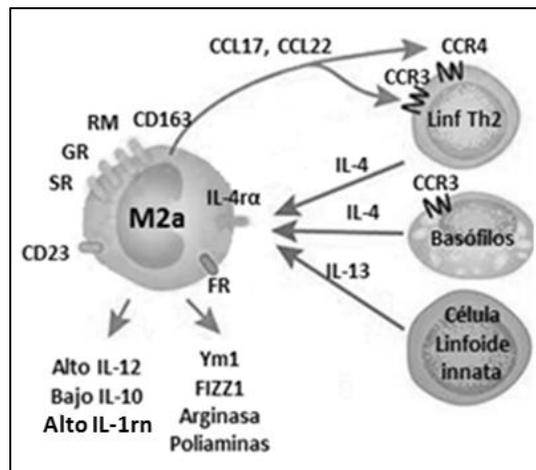


Figura 12. Estímulos para la diferenciación de macrófagos a M2a, y sus productos de secreción más característicos. RM, receptor de manosa; GR, receptor de galactosa; SR, receptor *Scavenger*; FR, receptor de folato.

El segundo grupo, los denominados macrófagos M2b son inducidos por la exposición a dos estímulos: en primera instancia el derivado de complejos inmunes (antígenos opsonizados por inmunoglobulinas) y en segundo lugar por el que ocasionan los ligandos de TLR's ([figura 13](#)).

Es de hacer notar que estos macrófagos M2b comparten algunas características que los asemejan a los macrófagos M1, como por ejemplo la producción de algunas citocinas pro-inflamatorias. No obstante, su categorización en el grupo M2 responde al hecho de presentar la producción de citocinas que característica a los macrófagos M2 (alta producción de IL-10 y baja producción de IL-12) induciendo finalmente una respuesta inmune de tipo Th2.

Entre las características de los macrófagos M2b están:

- Difiere del resto de macrófagos M2 por su capacidad de producir altos niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6, consideradas como citocinas pro-inflamatorias y cuya producción se asocia comúnmente a macrófagos M1.
- Produce altos niveles de IL-10 y bajos de IL-12.
- No expresa Arginasa 1 (una característica más que comparte con macrófagos M1).
- Producen óxido nítrico (al igual que los macrófagos M1).
- No presenta FIZZ1 (al igual que los macrófagos M1).
- Sus principales marcadores son las moléculas SPHK1 (del inglés *Sphingosine kinase 1*) y una molécula coestimuladora denominada LIGHT o TNFSF14.

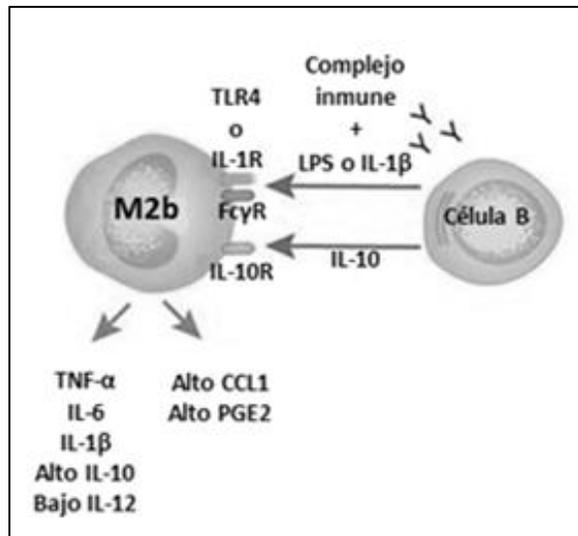


Figura 13. Estímulos para la diferenciación de macrófagos a M2a, y sus productos de secreción más característicos. TLR4, receptor tipo-Toll 4; LPS, lipopolisacáridos; PGE2, Prostaglandina E2.

El tercer grupo, los denominados macrófagos denominados M2c, son aquellos macrófagos inducidos por IL-10, TGF- β (del inglés *Transforming Growth Factor beta*) y glucocorticoides. La liberación de glucocorticoides tiene su origen en células adrenales del eje hipotalámico-pituitario-adrenal como respuesta al estrés ([figura 14](#)).

En particular el TGF- β puede actuar de diferentes maneras en función del grado de diferenciación celular que los macrófagos presentan; en etapas tempranas del proceso inflamatorio ocasiona el aumento en la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Mientras que en el proceso de resolución de procesos inflamatorios se ocasiona la inhibición de éstas citocinas.

Entre las características de los macrófagos M2c están:

- Regulan negativamente la producción de citocinas pro-inflamatorias.
- Una baja producción de moléculas del MHC-II, por lo que se encuentran disminuidos en su capacidad de presentar antígenos.
- Expresión de Arginasa 1, razón por la cual no producen óxido nítrico.

- Presenta alta expresión de receptores no opsónicos por lo que aumenta su capacidad de endocítica y fagocítica.

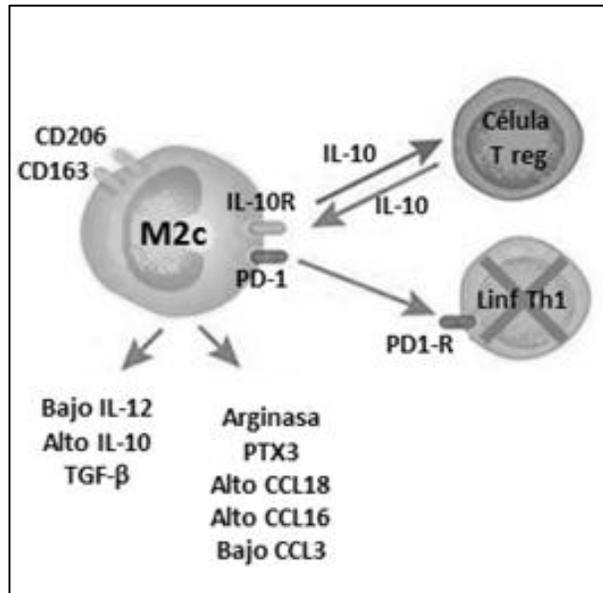


Figura 14. Estímulos para la diferenciación de macrófagos a M2c, y sus productos de secreción más característicos. TGF-β, Factor de crecimiento tumoral beta; PTX3, Pentraxina 3.

Por último está el cuarto grupo, el más recientemente descrito y denominado como M2d. Éstos fueron descubiertos durante el estudio de células asociadas a tumores y los factores que ocasionaban la tolerancia inmunológica ante el mismo (27).

Se piensa que la inducción hacia M2d se ocasiona por la exposición de los macrófagos al microambiente ocasionado por los tumores, sin embargo; éstos inductores no han sido identificados plenamente. Como posibles factores de esta diferenciación se han mencionado a IL-6, IL-10 y M-CSF (del inglés *Monocyte-Colony Stimulating Factor*) (28) (figura 15).

Entre sus propiedades inmunológicas se encuentra la de funcionar como células inmunosupresoras, resultado de su capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T y ocasionar su apoptosis. Este efecto tiene su origen en la capacidad que tienen estos macrófagos de formar metabolitos de triptófano por acción de la enzima Indolamina 2,3-deoxigenasa.

Entre las características de los macrófagos M2d están:

- Desregulación en los mecanismos de expresión del gen de IL-6.
- Aumento en la expresión del receptor de M-CSF.
- Expresión constitutiva de la molécula B7-H4.
- Disminución en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD80, necesarias para el proceso de activación de células T durante la presentación de antígenos.
- No existe expresión de Arginasa 1.
- No existe expresión de iNOS.
- Produce las interleucinas características de macrófagos M2 (alta producción de IL-10 y baja producción de IL-12), sin embargo también produce TNF- α en bajos niveles.
- Producción de citocinas inducibles por IFN- γ , tales como: CCL5, CXCL10 y CXCL16.

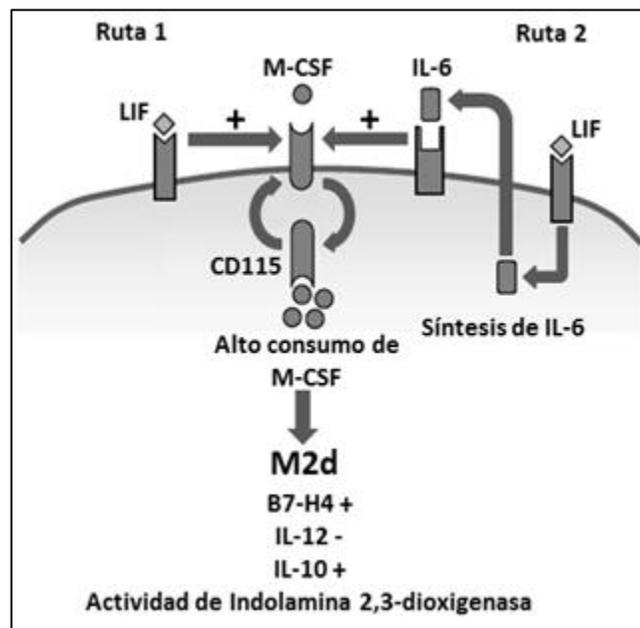


Figura 15. Modelos de diferenciación de macrófagos M2d propuesto por Duluc y colaboradores. El estímulo ocasionado por LIF (del inglés *Leukemia Inhibitory Factor*) puede ocasionar la sobreexpresión del receptor de M-CSF ya sea en forma directa (Ruta 1) o como consecuencia de inducir la producción y el consumo autocrino de IL-6.

XIII. PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS EN LA METACESTODIASIS MURINA

Entre los esfuerzos realizados durante los últimos años, en torno a la investigación de la respuesta inmune durante la metacestodiasis murina, se ha intentado determinar el papel que los macrófagos juegan durante la parasitosis y establecer si su cambio de fenotipo de M1 a M2 es una pieza importante dentro de la serie de fenómenos que derivan en la permisibilidad de la infección.

Uno de estos trabajos sugiere que los macrófagos M2 están fuertemente asociados con la sobrevivencia del parásito y la permisibilidad que se genera con el paso del tiempo (27). En éste, se realizó la eliminación temprana y selectiva de macrófagos por medio de liposomas cargados con un fármaco denominado Clodronato, un fármaco que actúa a nivel del translocador de ADP/ATP (del inglés *Adenosine Diphosphate* y *Adenosine Triphosphate*) en la membrana mitocondrial y que al final ocasiona la muerte celular de los macrófagos por apoptosis.

Como resultado de esta eliminación temprana de macrófagos M2 se permitió el desarrollo de una resistencia ante la infección, sin que se modifique el comportamiento inmunológico del resto de células de la respuesta inmune (respuesta inicial tipo Th1 con un posterior cambio a Th2 de linfocitos T CD4+ y los perfiles de citocinas que los caracterizan).

Lo anterior nos señala la importancia de comprender los mecanismos e inductores que regulan la diferenciación de los macrófagos de un fenotipo M1 a uno M2; y así poder establecer estrategias que nos permitan intervenir y modificar el proceso en vistas de poder establecer condiciones inmunológicas que lleven al establecimiento de un estado restrictivo ante la metacestodiasis.

XIV. MICROARREGLOS DE DNA

En este trabajo, para el análisis de las expresiones genéticas de macrófagos durante la metacestodiasis murina, hemos recurrido al uso de la herramienta de microarreglos como una forma de determinar las expresiones que *in vivo* presentan las células.

La técnica de biología molecular denominada microarreglos de DNA tiene su fundamento en la hibridación de material genético de estudio con material genético complementario conocido e inmovilizado en una matriz sólida

Las matrices sólidas más utilizadas son las de cristal, con dimensiones semejantes a las de un portaobjetos de microscopía y en donde por técnicas de impresión asistida por robots se imprimen puntos microscópicos de DNA complementario (DNAC) para cada uno de los genes presentes en la especie de estudio (con una densidad de impresión de aproximadamente 10,000 secuencias genéticas diferentes por cada centímetro cuadrado).

Estos puntos de DNAC funcionan como sondas que hibridarán en forma específica con sus cadenas complementarias (resultado de la formación de puentes de Hidrógeno entre los nucleótidos presentes en la cadena inmovilizada y sus contrapartes en la cadena muestra).

Éste método resulta sumamente específico e incluso capaz de diferenciar entre secuencias con alto grado de similitud y sus variantes ocasionadas por fenómenos de recorte y empalme de secuencias durante la maduración de la cadena de RNA mensajero (RNAm); lo cual lo convierte en una poderosa herramienta que nos permite el análisis de expresiones en forma confiable.

Los blancos a hibridar son obtenidos a partir de RNAm extraído de una muestra a estudiar; el proceso completo implica la síntesis de cadenas de DNAC a partir del

RNA mediante reacciones de retro transcripción, una posterior amplificación de las secuencias de DNA con ayuda de reacciones de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) y finalmente el marcado de estos DNA con un cromóforo, comúnmente cianina 3 (Cy3) o cianina 5 (Cy5) ([figura 16](#)).

Una vez que las secuencias de DNA han sido marcadas, se realiza la hibridación de las mismas en la placa de microarreglos permitiendo su interacción. Al final es posible realizar el escaneo de la placa mediante la excitación láser de los cromóforos y la captura de imagen en donde se pueden observar las señales emitidas.

La imagen obtenida es procesada mediante software, mediante el cual se realizan las correcciones de fluorescencia, la cuantificación de las señales en la imagen y la generación de datos numéricos.

A pesar de que el trabajo aquí realizado se limita a observar la expresión diferencial de algunos genes, los estudios de microarreglos pueden ser realizados con otros fines, entre los más comunes:

- Caracterización de diferentes cepas celulares.
- Establecer la presencia de factores de virulencia en cepas celulares.
- El estudio de mutaciones genéticas.
- El manejo farmacológico en trasplantes (mediante la identificación de señales que se expresan en procesos de rechazo).
- Para la identificación y diagnóstico de algunos tipos de cáncer que son difíciles de diagnosticar clínicamente.
- Predicción de la susceptibilidad a ciertos tipos de cáncer (al hacer estudio de factores).
- Esclarecimiento de mecanismo en ciertas enfermedades.

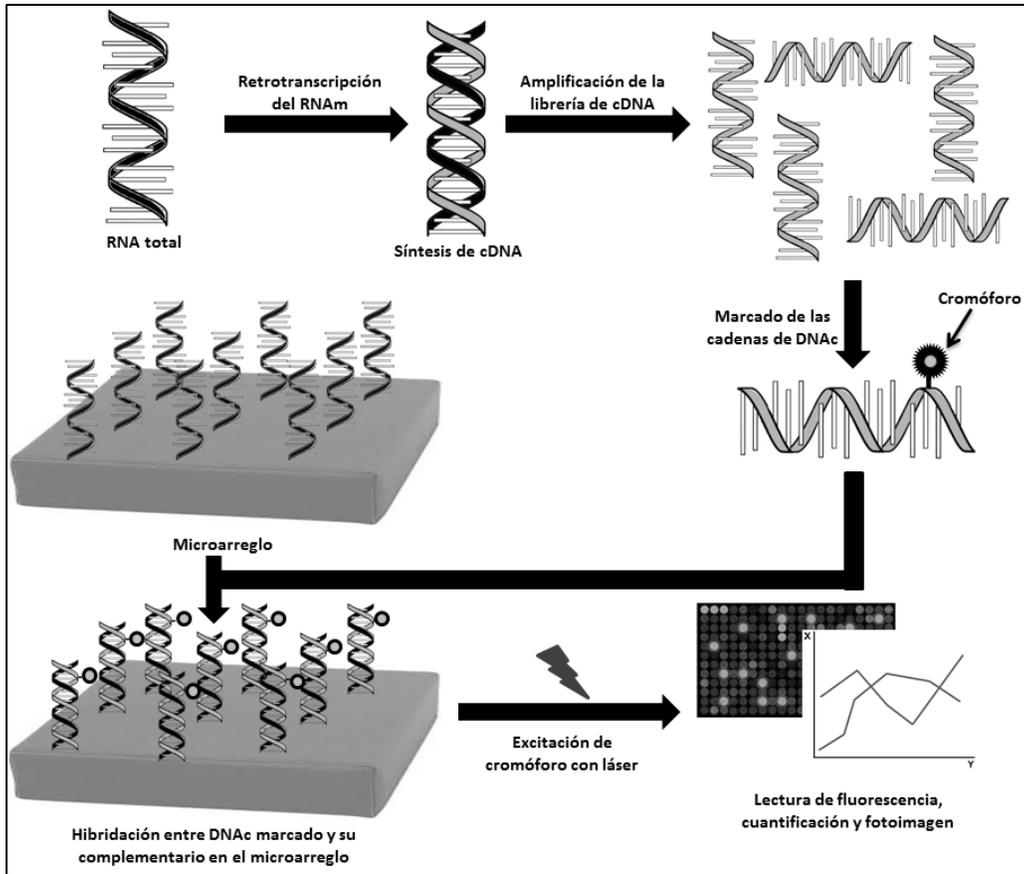


Figura 16. Procedimiento general del tratamiento de muestras y procesamiento de microarreglos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ante la incapacidad de poder erradicar la cisticercosis y neurocisticercosis en nuestro país, y al no poder evitar que la enfermedad se propague por fenómenos de migración; resulta importante conocer y comprender los factores que contribuyen al establecimiento de la infección.

El modelo de metacestodiasis murina y la metodología de microarreglos de DNA proporcionan herramientas importantes para el estudio de la cisticercosis y la interacción que la respuesta inmune mantiene con la infección. El cambio de una respuesta inmune restrictiva a una respuesta inmune permisiva en ratones BALB/cAnN, ocasiona en los macrófagos un cambio de fenotipo que contribuye al establecimiento de un ambiente inmunológico favorable para el desarrollo de la infección; así mismo resulta importante identificar los cambios que pueden contribuir al entendimiento de los mecanismos que permiten dicha permisibilidad.

HIPOTESIS

Durante la metacestodiasis murina causada por *Taenia crassiceps*, se ocasionan cambios en la expresión genética de macrófagos intraperitoneales.

OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Comparación de genes asociados a los perfiles inmunológicos Th1 y Th2 en macrófagos intraperitoneales, durante la metacestodiasis murina causada por *Taenia crassiceps*.

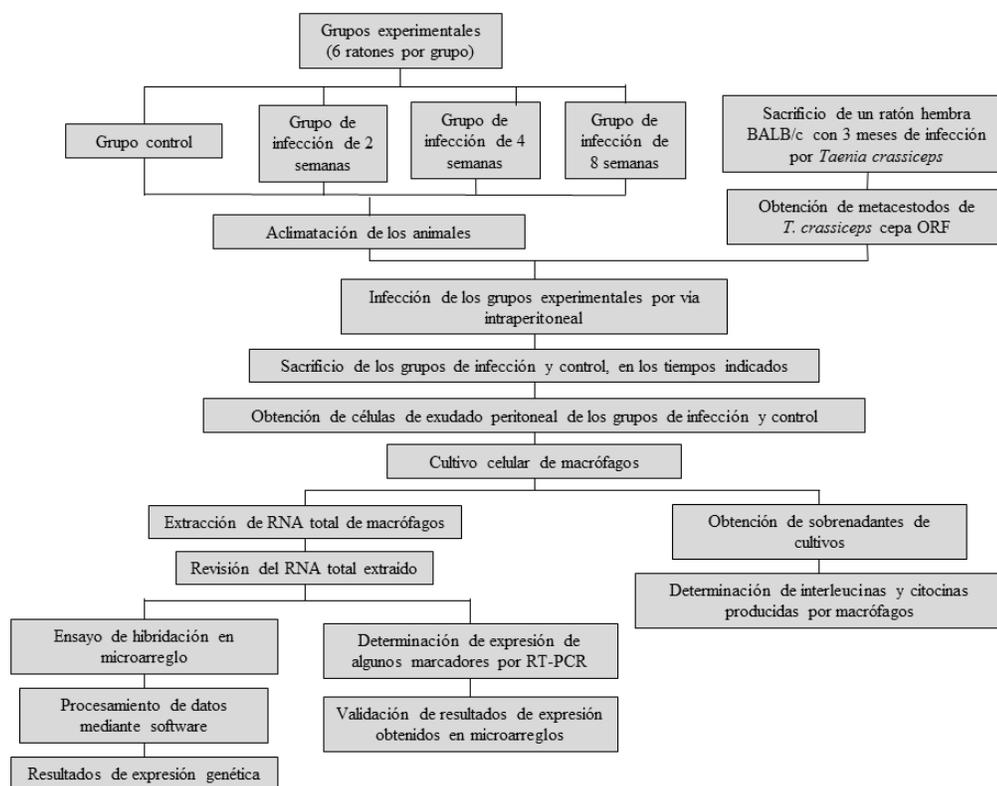
II. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar, durante la infección, los niveles de expresión de genes que codifican para citocinas y receptores celulares considerados bibliográficamente cómo marcadores de macrófagos M1 y M2.
2. Establecer los fenotipos en los que se diferencian los macrófagos intraperitoneales durante el proceso de metacestodiasis murina.
3. Validación de los marcadores expresados en los macrófagos M1 y M2 durante la infección.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Materiales biológicos: se utilizaron ratones hembra BALB/cAnN con nueve semanas de edad al inicio del trabajo experimental, éstos fueron comprados a *Research Global Solutions* (México) y mantenidos en el laboratorio con agua y alimentación *ad libitum* con *Rodent Laboratory Chow 5001*. Se utilizaron metacestodos de *T. crassiceps* de la cepa ORF, los cuales han sido mantenidos dentro de instalaciones del laboratorio de biología molecular de *Taenia solium* por medio del pase continuo en ratones hembras BALB/cAnN. La cepa original de *T. crassiceps* fue donada por el Dr. Ignacio Terrazas, jefe del laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Investigación en Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

Diseño experimental y esquema de trabajo: el diseño experimental y esquema de trabajo seguido a lo largo del experimento fue el siguiente:



Esquema 1. Esquema de trabajo y diseño experimental seguido.

Protocolo de infección y sacrificio de animales: para llevar a cabo la infección de los grupos experimentales se realizó la recolección de metacestodos de *T. crassiceps* a partir de un ratón hembra con una infección de 3 y medio meses. Ésta fue sacrificada por dislocación cervical, desinfectada en el área abdominal con etanol y, en condiciones de esterilidad proporcionadas por un mechero, se procedió a abrir el abdomen colectando los cisticercos peritoneales en una placa de Petri estéril. Los cisticercos obtenidos fueron lavados en tres ocasiones con solución salina de fosfatos estéril (PBS estéril): 0.15 M *NaCl*, 0.01 M *Na₂HPO₄*, 0.01 M *KH₂HPO₄* ajustado a pH 7.4 y esterilizado por filtración.

Posteriormente se infectó intraperitonealmente a cada ratón experimental con 10 cisticercos junto con un volumen aproximado de 500 μ L de PBS con jeringas de calibre 20; el criterio de elección de los cisticercos fue que midieran aproximadamente 2 milímetros de diámetro, que fueran translucidos y no presentaran gemación. Una vez cumplido con el tiempo indicado para cada uno de los grupos se llevó a cabo el sacrificio por dislocación cervical.

En campana de flujo laminar (*Nuair Biological Safety Cabinets Class-II Type AB/3*) y con condiciones de esterilidad, se desinfectó el área abdominal y las zonas cercanas con etanol; posteriormente se procedió a retirar la capa de piel de la zona abdominal sin que en el proceso se rompiera la membrana peritoneal.

Obtención de células de exudado peritoneal: ya retirada la piel de la zona abdominal se procedió a inyectar un volumen aproximado de 10 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril y fría en el peritoneo con una jeringa de calibre 21G, seguido de un ligero masaje de la zona abdominal del ratón. Posteriormente, con ayuda de la misma jeringa, se extrajo el líquido junto con las células de exudado peritoneal y se depositaron en tubos estériles. Éste lavado se realizó una vez más con el fin de obtener el máximo número de células posibles.

Los volúmenes obtenidos en los lavados fueron centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (*Heraeus Instruments Labofuge 400*). Al finalizar la centrifugación, se decantó el sobrenadante y el paquete celular obtenido se resuspendió en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) *High Glucose 1X-11971* (4.5 g/L D-glucosa y L-glutamina) que fue suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 unidades /mL de penicilina y 100µg/mL de Estreptomicina.

Determinación de cargas parasitarias: al término de las extracciones de células de exudado peritoneal se procedió a abrir la cavidad peritoneal de los ratones y realizar lavados minuciosos de las vísceras con PBS. Los cisticercos obtenidos en éste procedimiento se recolectaron y cuantificaron para cada uno de los ratones, en éste punto es posible determinar si los animales presentan infección y así determinar si las muestras obtenidas serán de utilidad.

Cuantificación de células y cultivos celulares: con las células en medio DMEM y verificadas las infecciones de los ratones, las muestras fueron mezcladas para formar una sola muestra homogénea de células; posteriormente los macrófagos fueron cuantificados en hemocitómetro de Neubauer y determinada su viabilidad con azul de tripán.

Al finalizar la cuantificación y verificar la viabilidad, se procedió a realizar el cultivo de volúmenes de suspensión celular en alícuotas de 2×10^6 macrófagos en placas de 24 pozos tratadas para células adherentes (marca FALCON). Posteriormente las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 por espacio de 4 horas, para propiciar que los macrófagos se adhieran a la placa.

Pasado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados de los pozos de cultivo con SSI estéril a 37°C para eliminar células no adherentes y dejar sólo la monocapa de células adherentes. Cabe mencionar que de las células adheridas, más del 90% son macrófagos (30).

Posteriormente se reintegró el volumen de medio de cultivo DMEM (300 μ L/pozo) para dejar incubar 24 horas más a 37°C y 5% de CO_2 . Pasado éste tiempo de incubación, se procedió a recolectar los sobrenadantes de cultivo en microtubos y posteriormente congelarlos a -20°C, hasta el momento de ser utilizados. Las monocapas de macrófagos adheridas en las placas de cultivo fueron procesadas inmediatamente para la extracción de RNA total mediante la técnica que se describe a continuación.

Extracción de RNA total: el RNA de macrófagos fue obtenido con Trizol (Invitrogen), realizando un continuo pipeteo en los pozos de cultivo (~20 pipeteos) y una posterior incubación por 30 minutos a 37°C. Las muestras obtenidas de ésta forma fueron recolectadas en microtubos de 1.5 mL y congeladas a -72°C hasta el momento de ser usadas.

El protocolo seguido para la obtención de RNA total comenzó con la adición de 220 μ L de cloroformo seguida de una homogenización de la muestra y posterior incubación de la mezcla por 3 minutos a 4°C. Al término de la incubación, la muestra fue centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm, para posteriormente recuperar la fase acuosa (fase superior) en un tubo nuevo.

A la fase acuosa obtenida se adicionó 500 μ L de isopropanol a 4°C y se incubo por 20 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugo la muestra por 5 minutos a 13000 rpm, el sobrenadante obtenido fue eliminado y el precipitado posteriormente lavado con 1 mL de etanol al 75% en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1% y a 4°C.

La muestra ya lavada con etanol fue centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm, el sobrenadante obtenido se desechó y el precipitado remanente fue secado y resuspendido en 50 μ L de agua tratada con DEPC.

La muestra de RNA total obtenida fue cuantificada usando un factor de dilución de 1:100 por espectrofotometría a 260 nm y la pureza se determinó mediante la relación de absorbancias 260 nm/280 nm. Finalmente la integridad fue determinada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y cargando 1µg de cada RNA.

Amplificación del transcriptoma: una vez obtenidas las muestras de RNA total con la cantidad, calidad e integridad necesarias se procedió a realizar la amplificación de todo el transcriptoma; para éste proceso se utilizó el equipo de reactivos *Transplex® Complete Whole Transcriptome Amplification Kit* (Sigma).

El proceso tiene como primer paso la retrotranscripción de las secuencias de RNAm hasta DNAc y como segundo paso, utilizar las secuencias sintetizadas como templetes que servirán para realizar la amplificación de la librería mediante reacciones de PCR.

El protocolo inicia con la adición de muestras de RNA (250 ng de cada muestra) en tubos de PCR, a los que posteriormente se agregaron 2.5 µL de la solución de síntesis de librería y el agua libre de nucleasas necesaria para un volumen final de 16.6 µL. Los volúmenes obtenidos fueron incubados a 70°C por 5 minutos y después enfriados hasta 18°C.

Al finalizar el termociclado se agregó a cada muestra y en forma inmediata 8.4 µL de la mezcla para síntesis de librería, cuya composición por reacción es la siguiente: 2.5 µL de amortiguador de la síntesis de librería, 3.9 µL de agua y 2 µl de enzima para la síntesis de librería; se mezclaron los volúmenes y se colocaron bajo un programa de temperaturas bajo las siguientes condiciones: 18° C por 10 minutos, 25° C por 10 minutos, 37° C por 30 minutos, 42° C por 10 minutos, 70° C por 20 minutos y enfriado final hasta 4° C.

Terminado el proceso de la síntesis de librería de DNAC se realizó su amplificado, para esto se adicionó a cada muestra: 301 μL de agua, 37.5 μL de la mezcla de amplificación, 7.5 μL de la mezcla WTA dNTP y 3.75 μL de la enzima de amplificación.

Los volúmenes totales resultantes de cada muestra fueron divididos en alícuotas de 75 μL y colocados en tubos de PCR, para posteriormente ser colocados en un programa de temperaturas con el siguiente programa: 94°C por 2 minutos y 17 ciclos de 94°C por 30 segundos y 70°C por 5 minutos.

El equipo utilizado para todas las reacciones fue de la marca *Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700*.

Purificación del amplificado: la purificación de las reacciones de amplificación del transcriptoma se realizaron con los reactivos *QIAquick® PCR purification* (Qiagen). El principio de funcionamiento del equipo de reactivos es la unión de las cadenas de DNAC sobre una membrana bajo unas condiciones determinadas; lo que permite eliminar los demás componentes de la reacción, al final el DNAC es eluido con agua libre de RNAsas.

El protocolo inicia con la unión de los 6 volúmenes de reacción de cada muestra en un nuevo tubo de 2 mL, a éste se le adicionó el equivalente de 5 volúmenes del amortiguador de PB por volumen de reacción del PCR y se mezcló.

Posteriormente se adicionó un volumen de 700 μL de la mezcla antes obtenida en una columna de purificación y se centrifugó a 13000 rpm por 30 segundos descartando el líquido obtenido al final de la centrifugación. Al terminar de centrifugar todos los volúmenes de reacción de PCR y amortiguador PB, se adicionó un volumen de 750 μL del amortiguador PE para luego centrifugar a 13000 rpm por 30 segundos, descartando el líquido obtenido al final.

Finalmente la columna fue secada por medio de una centrifugación a 13000 rpm por un minuto. Al término el DNAC es eluido en 50µL de agua y recuperado el volumen con una centrifugación a 13000 rpm por un minuto.

Las centrifugaciones necesarias a lo largo de la purificación se realizaron en una ultracentrifugadora *Sorvall® pico™*.

Marcaje de las cadenas de DNAC: se realizó la cuantificación de las muestras antes purificadas por medio del equipo *Nanodrop* (Thermo Scientific) y posteriormente marcada con los reactivos *NimbleGen One-Color DNA Labeling* (Roche) que utiliza Cy3 como cromóforo.

El protocolo inicia con la preparación de 1100 µL de amortiguador para los cebadores aleatorios adicionado con 2 µL de β-mercaptoetanol; en tubos de 1.5 mL se colocaron 1050 µL de la mezcla anteriormente preparada y el volumen total contenido en el vial de cebadores.

En forma separada y por cada una de las muestras a marcar, se realizó una preparación de DNAC (1µg cada uno), 40 µL de los cebadores diluidos y el volumen necesario de agua grado PCR para completar 80 µL. Ésta mezcla fue colocada en el siguiente programa de temperaturas: 98°C por 10 minutos, seguido de un enfriamiento rápido en baño de hielo por 2 minutos.

En forma paralela, mientras se lleva a cabo el programa de temperaturas antes mencionado, se procedió a preparar la mezcla *dNTP/Klenow* que se compone de 10 µL de la mezcla de dNTP's, 8µL de agua grado PCR y 2 µL del fragmento *Klenow* (3'->5' exo, 50U/µL). Al finalizar el termociclado se adicionó a cada tubo 20 µL de la mezcla antes preparada mezclando bien los volúmenes, posteriormente las mezclas fueron incubadas a 37°C por 2 horas y protegidas de la luz.

Al término de la incubación a cada tubo se adicionó 21.5 µl de la solución para detener la reacción, los volúmenes obtenidos fueron colocados en un nuevo tubo que ya contenía 110 µL de isopropanol y posteriormente incubados a 20 °C por 10 minutos y protegidos de la luz.

Al finalizar la incubación los tubos fueron centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante obtenido es desechado y el precipitado de color rosa posteriormente lavado y suspendido con etanol frío al 80%. Finalmente las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm por 2 minutos, el sobrenadante eliminado y el precipitado secado y mantenido a -20 °C y protegidas de la luz hasta su posterior uso.

El equipo utilizado para estas reacciones fue un termociclador *Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700*, las centrifugaciones se realizaron en una ultracentrifugadora *Sorvall® pico™* y el secado de la muestra en un concentrador *SpeedVac® DNA120* (Thermo Scientific).

Hibridación del microarreglo: la hibridación de las muestras (DNAc) en microarreglos de 12 pozos de *NimbleGen* con el genoma de *Mus musculus* se realizó utilizando los reactivos *NimbleGen Sample Tracking Control* con el protocolo que a continuación se describe:

Primero se preparó una mezcla para hibridación que se compuso de: 88.5 µL del amortiguador de hibridación, 35.4 µL del componente A de hibridación y 3.6 µL del oligonucleótido de alineación.

Posteriormente las muestras secas obtenidas en el proceso de marcado se suspendieron en 3.3 µL de la solución para seguimiento de muestra, seguido de la adición de 8.7 µl de la mezcla para hibridación antes preparada; el volumen obtenido fue incubado en una primera fase a 95°C por 5 minutos y en una

segunda fase a 42°C por 5 minutos más (protegiendo las muestras en todo momento de la luz).

En forma paralela a las incubaciones antes mencionadas, se procedió al armado de la placa de microarreglo y de la plantilla de llenado con ayuda de la herramienta de alineamiento preciso. Una vez adherida la plantilla de llenado al microarreglo se procedió a llevar el sistema a 42°C, con la temperatura estabilizada a 42°C se procedió al inyectado de volúmenes de 6 µL de cada una de las muestras con una pipeta *Gilson Microman pipette* y puntas CP10.

Finalmente con las muestras ya cargadas en el microarreglo se procedió al sellado de los puertos de llenado y ventilación; para después incubar la placa por 20 horas a 42°C.

Lavado de la placa de microarreglo: el proceso de lavado de los microarreglos se realizó con los reactivos *SeqCap EZ Hybridization and Wash* y siguiendo el protocolo que a continuación se describe:

Se prepararon dos volúmenes de la solución I de lavado y un volumen de las soluciones II y III según las siguientes proporciones:

Reactivos	Solución de lavado I	Solución de lavado I, II y III
Agua	243 mL	24.3 mL
Buffer de lavado I, II o III (10X)	27 mL	2.7 mL
Solución DTT 1M	27 µL	2.7 µL
Total	270 mL	27 mL

Posteriormente la solución I con volumen de 270 mL fue vertida en la tina de lavado y llevada a 42°C, mientras que el resto de las soluciones de lavado se mantuvieron a temperatura ambiente.

Cuando la placa de microarreglos termino su ciclo de hibridación, fue llevada en forma inmediata a la tina que contiene los 270 mL de la solución I de lavado a

42°C. Allí, con ayuda de la herramienta de desarmado, se retiró la plantilla de llenado y se realizó un primer lavado del microarreglo por 15 segundos. Posteriormente se realizaron otra serie de lavados: un lavado energético por espacio de 2 minutos en la solución de lavado I a temperatura ambiente, uno de 1 minuto en la solución de lavado II y otro en la solución de lavado III por 30 segundos.

Para finalizar el lavado del microarreglo, la placa fue secada en una secadora de microarreglos por espacio de 30 segundos.

Lectura de microarreglo: esta se realizó con el equipo *NimbleGen MS 200 Microarray Scanner* en el canal de radiación del láser verde (532 nm), al 100% de intensidad y con resolución de 2µm. El resultado de la lectura es una imagen en donde se pueden ver las intensidades de las señales ocasionadas por el cromóforo en cada punto de hibridación.

Extracción y análisis de datos: la imagen obtenida con la lectura de la placa de microarreglo se analizó con el *software* DEVA; el procesamiento de los datos obtenidos mediante DEVA se realizó en la plataforma de red denominada *Analysis of NimbleGen Arrays Interface Suite* o ANAIS por sus siglas en inglés, (<http://anais.versailles.inra.fr/>). En este procedimiento, se realiza la corrección de las lecturas de fondo por medio de análisis estadístico.

Normalización de datos: una vez obtenidos en forma numérica las intensidades de señales de cada punto de hibridación se procedió a realizar las normalizaciones de expresiones. Éste procedimiento permite realizar las comparaciones entre los grupos experimentales y el grupo control, éste último grupo nos proporcionará el valor de corte para expresiones en condiciones control y a partir de los cuales poder determinar sobre expresiones o represiones genética.

La normalización es la comparación de intensidades de señales del mismo gen en dos condiciones diferentes y la posterior obtención del logaritmo base 2 de la relación antes señalada. Así pues para un gen A en dos condiciones diferentes se tendrán dos intensidades de señal: una denominada IAe que es la intensidad de señal del gen A de una muestra experimental y la denominada IAc que es la intensidad de señal del gen A pero para la muestra establecida como control. Con esto en cuenta la ecuación de normalización del gen A es la siguiente:

$$A = \log_2 \frac{IAe}{IAc}$$

Con esta ecuación es posible realizar cálculos de expresiones de cada uno de los genes presentes en el microarreglo y así poder obtener valores que podrán ser analizados mediante software.

Listado de genes candidatos a marcadores: una vez obtenidos los valores finales en los microarreglos para todas las muestras, se procedió a construir una lista de genes. Ésta lista responde a la necesidad de realizar un estudio más limitado de los cambios de expresión genética pero que a su vez tome en cuenta genes mucho más específicos e involucrados con la respuesta inmune, además de ser un método eficiente para la obtención de resultados dentro de los objetivos y alcances de ésta tesis de licenciatura.

El listado de genes se construyó a partir de dos objetivos:

1. El estudio de la expresión de marcadores reportados bibliográficamente para macrófagos M1 y macrófagos M2 durante la infección.
2. El análisis de genes con potencial de ser propuestos como marcadores de macrófagos M1 o M2 durante la infección por *T. crassiceps*.

Como primer paso para la selección de genes que servirán para proponer marcadores de macrófagos M1 y M2, se realizó una compilación de genes por

medio del listado de identidades de genes presentes en el microarreglo que se proporciona por el fabricante (con cerca de 35,000 genes). La primera selección se llevó a cabo bajo criterios de búsqueda que tomaran en cuenta factores, células y funciones inmunológicas.

Con los números de identificación de cada gen se procedió a la consulta de bases de datos en línea mediante el concentrador de servicio BioGPS (www.biogps.org), lo que permitió obtener información de cada gen (función molecular y función biológica del producto de transcripción) y su expresión en diferentes tipos celulares de *Mus musculus*.

Con estos criterios de exclusión mencionados se construyó una lista final que cuenta con alrededor de 210 genes involucrados en la respuesta inmune, expresados por macrófagos y que maximizan la posibilidad de proponer marcadores al final del análisis ([Apéndice A](#)).

Análisis de datos: los análisis se llevaron a cabo por medio del software Genesis versión 1.7.6 desarrollado por Alexander Sturn y Rene Snajder del Instituto de Genómica y Bioinformática de la Universidad de Tecnología de Graz (Austria).

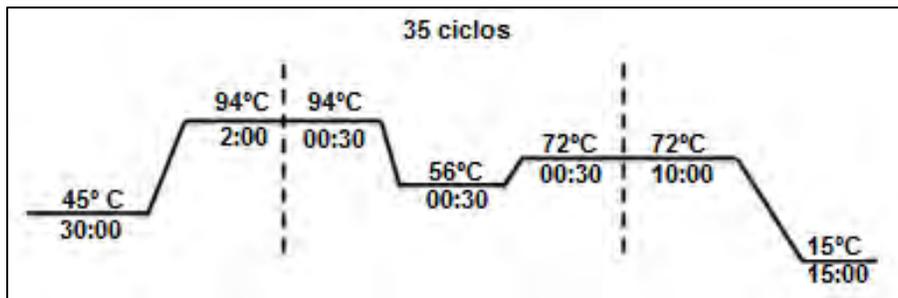
Cuantificación de citocinas: para la cuantificación en sobrenadantes de cultivos celulares se utilizó el método de ELISA de sándwich para IL-10 y TNF- α (*Peptotech murine IL-10 900-K53* y *Peptotech murine TNF- α 900-K54*) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

Transcripción reversa acoplada a la polimerasa de reacción en cadena (RT-PCR): las reacciones de RT-PCR se realizaron para los genes iNOS (por su nombre en inglés *Inducible Nitric Oxide synthase*), Ym1 (*Chitinase 3-like 3*), Arg1 (*Arginase*) y Gapdh (*Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogeanse*); todos los cebadores utilizados con una concentración de 50 pM/ μ l y utilizando muestras de RNA de 0.5 μ g.

Los reactivos utilizados fueron *Invitrogen SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq* (Invitrogen), utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante.

Los productos obtenidos de la RT-PCR's fueron analizados mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, cargando 10 µL de cada muestra.

Los programas de temperaturas utilizadas para la retro transcripción de todos los genes fueron las siguientes:



Esquema 2. Programa de termociclado seguido para las reacciones de RT-PCR.

RESULTADOS

Determinación de cargas parasitarias.

En la [figura 17](#) se puede observar que durante la segunda semana de infección la carga parasitaria presenta un promedio de 11 metacestodos. A la cuarta semana de infección sucede una reducción de la carga a sólo 3 metacestodos y posteriormente un drástico incremento de la misma en la octava semana de infección (809 metacestodos).

Los resultados nos señalan que hacia el inicio de la infección, el establecimiento de la respuesta inmune produce un estado de restricción al crecimiento del parásito y que alcanza su máximo alrededor de la cuarta semana; permitiendo contrarrestar la reproducción de los metacestodos. En contraste, durante la octava semana podemos observar que dicha respuesta ha dejado de ser eficiente para la limitación de la infección, permitiendo que la tasa de reproducción de metacestodos se disparé y la parasitosis alcance un ambiente permisible. Lo anterior discrepa un poco con los resultados reportados bibliográficamente ([17](#), [29](#), [33](#)) en donde se establece un mínimo de la carga parasitaria en la segunda semana y un aumento progresivo de la carga parasitaria con el paso del tiempo.

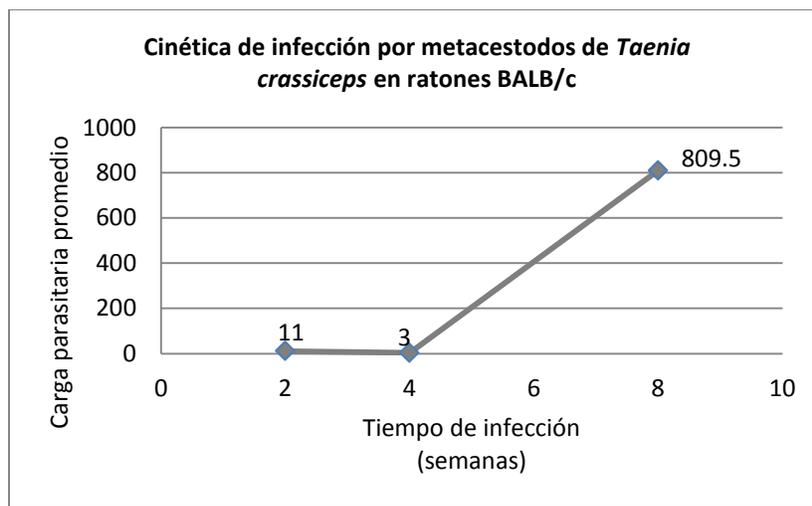


Figura 17. Cinética de la infección por *Taenia crassiceps* en ratones susceptibles (BALB/c) a lo largo del experimento, la carga inicial de infección utilizada fue de 10 cisticercos.

Extracción y caracterización del RNA total.

Los datos de la cuantificación y los de la prueba de pureza se muestran en la [tabla 1](#). Podemos observar que los ratios obtenidos en la relación 260/280 nm de las muestras presentan baja cantidad de contaminantes dando un grado de pureza aceptable para los análisis a realizar.

Muestra	Concentración (µg/mL)	Pureza	Cantidad de RNA total extraída (µg)
Control	110	1.7	5.50
Infección semana 2	155	1.7	7.75
Infección semana 4	150	1.7	7.50
Infección semana 8	225	1.55	11.25

Tabla 1. Valores de cantidades de RNA total y pureza (relación A260/A280) obtenidos de las muestras.

La electroforesis en gel de agarosa al 1% ([figura 18](#)) muestra las bandas ribosomales de 28s y 18s con buena intensidad y la presencia de un barrido difuso antes y entre las bandas ribosomales que representa el RNAm, además no se observaron bandas de pesos moleculares altos, ni acúmulos o manchas difusas por debajo del RNAr de 18s que sean consecuencia de la degradación del RNA.

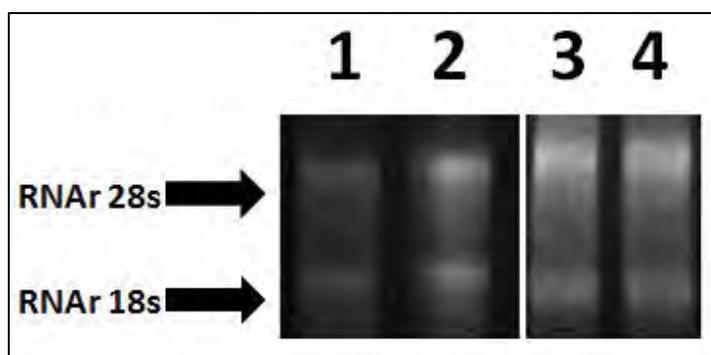


Figura 18. Muestras procesadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Muestra control (1), muestra de infección de segunda semana (2), infección de cuarta semana (3) e infección de octava semana (4).

Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivo por método de ELISA.

En los sobrenadantes de cultivo obtenidos de los macrófagos cultivados por 24 horas se realizó la cuantificación de las citocinas TNF- α e IL-10, las cuales corresponden a los perfiles de respuesta inmune tipo Th1 y Th2, respectivamente. Las concentraciones obtenidas para ambas citocinas mostraron valores muy bajos y sin diferencias significativas (datos no mostrados).

Amplificación de genes por RT-PCR.

Con las muestras de RNA obtenidas a lo largo del experimento se realizaron las RT-PCR's para determinar la expresión de los genes Gapdh (gen de mantenimiento), Nos2 (iNOS gen marcador de macrófagos M1) y Arg1 (gen marcador de macrófagos M2). Los resultados muestran importantes diferencias en las expresiones de los marcadores genéticos elegidos dentro de los grupos experimentales estudiados ([Figura 19](#)).

Las expresiones de los genes muestran que el gen Gapdh se mantiene expresado en forma constante a lo largo de todo el experimento. La expresión de iNOS ocurre sólo en el grupo de ratones con dos semanas de infección y el gen Arg1 se expresa desde la segunda semana de infección manteniéndose a lo largo de todo el experimento.

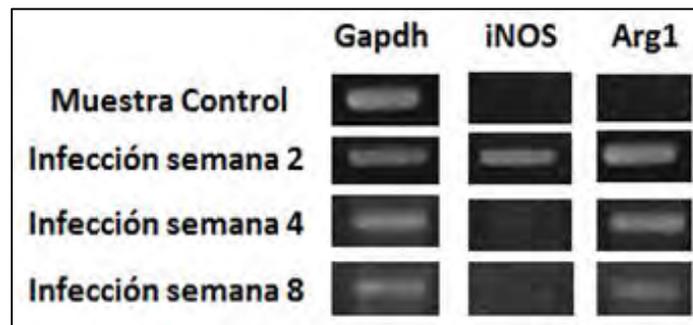


Figura 19. Determinación de la expresión de los genes: Gapdh (201 pb), iNOS (449 pb) y Arg1 (250 pb) por RT-PCR en macrófagos durante la infección, observados por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Normalización de genes en software Genesis.

Mediante el software Genesis se procesaron las lecturas de intensidad de las señales obtenida para cada gen en los microarreglos, los resultados generados por el software se denotaron en una escala de colores que van desde el rojo brillante para valores de genes altamente sobre expresados con respecto al valor basal (representado por el grupo control), pasando por colores negros si es que los valores de expresión experimentales tienen una relación 1:1 con respecto al grupo control y hasta el verde brillante para valores de represión genética con respecto al grupo control.

Para fines de mejor visualización, los resultados finales de expresiones estudiados en ésta tesis se expresarán con gráficos de barras en donde la expresión de cada gen está dada en función de los valores obtenidos en los procesos de normalización (logaritmo base 2 de la relación entre las señales experimentales y control de los genes).

Perfil de expresión de genes de mantenimiento.

Como primer resultado se denotan los perfiles de expresión de los genes de mantenimiento que funcionan como controles. Los genes de mantenimiento seleccionados fueron: la Aldolasa A (Aldoa) que es una enzima que participa en la glucólisis, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh) que cataliza la conversión del gliceraldehído-3-fosfato en un intermediario de alta energía y en el proceso produce 2 equivalentes de reducción y finalmente la Ubiquitina C (Ubc) que funciona como marcador de proteínas que serán degradadas en el proteosoma. Como se puede observar en la [figura 20](#), estos tres genes mantienen niveles de expresión muy cercanos a los basales durante todo el proceso infectivo.

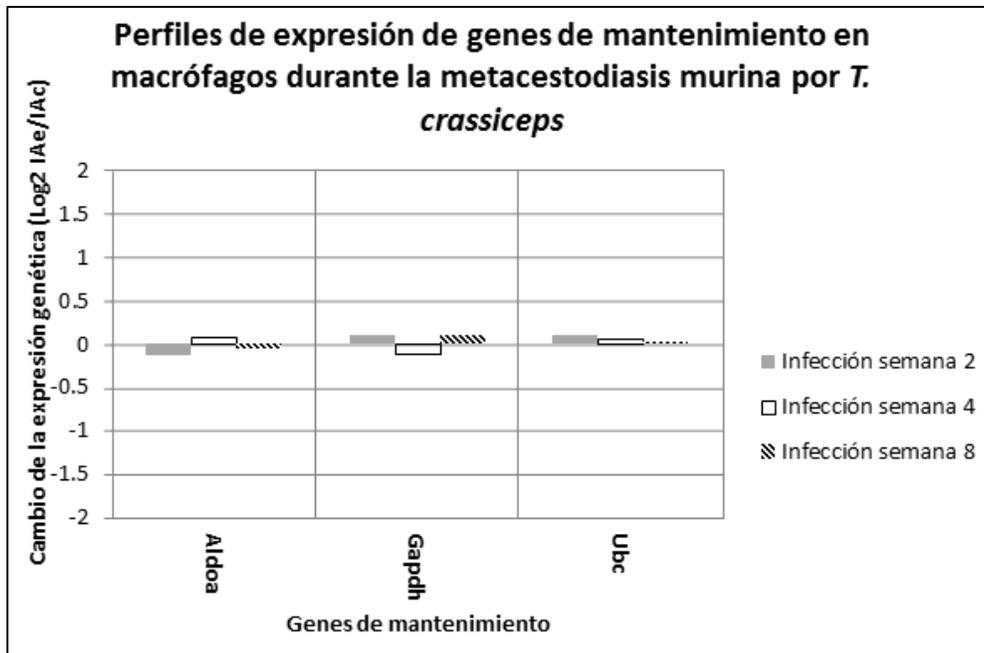


Figura 20. Perfiles de expresión de genes de mantenimiento en macrófagos de ratones BALB/c durante la infección por *Taenia crassiceps* de la cepa ORF. Los valores numéricos de expresión resultan de la obtención del logaritmo base 2 de la relación entre señales del mismo gen en las condiciones experimentales indicadas y las condiciones control.

Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de macrófagos M1.

La [figura 21](#) muestra los perfiles de expresión de los genes de marcadores de macrófagos M1, en ésta podemos destacar varios comportamientos:

- Los genes Tnf e Ifng aumentan su expresión al inicio de la infección para después expresarse en valores cercanos a los basales durante la cuarta semana de infección. Sin embargo, podemos notar que ambos genes vuelven a aumentar su expresión durante la octava semana de infección.
- El gen Il1a se encuentra reprimido en la segunda semana de infección, alcanza un máximo de expresión en la cuarta semana y finalmente, en la octava semana de infección, mantiene un alto nivel de expresión pero a un nivel ligeramente inferior al alcanzado durante la cuarta semana de infección.
- Las secuencias uno y dos del gen Il1b reprimen su expresión en las semanas dos y ocho de infección, alcanzando la sobre expresión sólo en la

cuarta semana de infección; por su parte la secuencia tres del gen Il1b se sobre expresa en la segunda semana de infección manteniéndose más o menos constante hasta la cuarta semana para después ser reprimido en la octava semana de infección.

- El gen Il12a sólo presenta sobre expresión al inicio de la infección y después es fuertemente reprimido en todo el resto de la infección.
- La secuencia uno del gen Il12b sólo presenta sobre expresión en la semana ocho de infección, manteniendo valores de represión genética durante la segunda y cuarta semanas de infección. Por su parte, la secuencia dos del mismo gen, se encuentra reprimido a lo largo de toda la infección.
- La secuencia dos de Il6 presentan una fuerte sobre expresión en la segunda semana de infección, en la cuarta semana muestra una fuerte represión genética para después alcanzar valores cercanos a los basales en la semana ocho de infección. Por su parte, la secuencia uno de Il6 muestra poca variación en su expresión a lo largo de la infección, manteniendo valores de expresión cercanos a los basales.
- El gen Nos2 (codificador de iNOS) presentan un aumento de su expresión en la segunda semana de infección, para después ser reprimido genéticamente durante el resto del proceso infeccioso.
- El gen Cd86 sólo presenta sobre expresión en la cuarta semana, mientras que para los tiempos de dos y ocho semanas de infección es reprimido.
- La expresión del gen Ifngr1 mantiene niveles de represión genética a lo largo de toda la infección.
- La secuencia dos del gen Stat4 mantiene valores de expresión cercanos a los basales durante toda la infección. Por su parte, la secuencia uno alcanza su máximo de expresión en la segunda semana de infección y posteriormente es reprimido en el transcurso de la infección.

Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de los macrófagos M2a.

En la [figura 22](#) se muestra la expresión de genes relacionados con marcadores de macrófagos M2a, en ésta podemos destacar:

- El gen Il10 se sobre expresa al inicio de la infección, pero después es reprimido manteniendo niveles de expresión cercanos a los basales por el resto de la infección.
- Las dos secuencias del gen que codifica para el antagonista del receptor de IL-1 (Il1rn) se mantienen reprimidas durante la mayor parte de la infección.
- El gen Chi3l3 que codifica para la proteína Ym1 sólo se sobre expresa en la semana dos de infección y posteriormente es fuertemente reprimido.
- El gen Retnla es sobre expresado sólo en la semana ocho de infección.
- Las dos secuencias del gen Arg1 muestran aumento importante en su expresión hacia el final de la infección. Sin embargo, es de notar que la secuencia uno se sobre expresa desde la segunda semana de infección y se mantienen más o menos constante en el resto de la infección; mientras que la secuencia dos sólo aumenta su expresión a partir de la cuarta semana y alcanza su máximo en la semana ocho de infección.
- El gen Fcrlg, que codifica el antígeno CD23, pasa de un estado de represión genética durante la segunda semana a un estado de ligera sobre expresión en la cuarta y octava semana de infección.
- La secuencia dos del gen Cd163 muestra un aumento de su expresión en todo el proceso infectivo, pero alcanza un máximo importante durante la octava semana de infección. Por su parte, la secuencia uno sólo alcanza niveles importantes de expresión en la cuarta semana de infección.
- Las tres secuencias del gen Il4ra aumentan su expresión en la octava semana. Sin embargo, estas tienen perfiles de expresión diferentes: la secuencia uno se sobre expresa desde la cuarta semana y mantiene ese nivel hasta la octava semana de infección, la secuencia dos se ve sobre

expresada desde la segunda semana y hasta la octava de infección; y finalmente la secuencia tres se sobre expresa sólo durante la octava semana.

- Los genes Ccl17 y Ccl22 no muestran cambios importantes en su expresión genética, ambos se mantienen en niveles de represión a lo largo de toda la infección.
- El gen Stat6 pasa de un estado de represión genética en la segunda semana de infección a uno de expresión progresiva que alcanza su máximo en la octava semana de infección.

Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de los macrófagos M2b.

En la [figura 23](#) se muestran las expresiones de marcadores de macrófagos M2b. De ella podemos destacar los siguientes comportamientos:

- El comportamiento de los genes Tnf, Il1a, las tres secuencias de Il1b, Il6 y el gen Il12b ya antes mencionados, los cuales además de estar relacionados con los macrófagos M1 también están relacionados con los macrófagos M2b.
- El gen Ccl1 presenta un leve aumento de su expresión en la segunda semana de infección y después regresa a niveles basales durante el resto de la infección.
- La secuencia dos del gen Sphk1 se encuentra reprimido durante la segunda y cuarta semana de infección, posteriormente sufre un ligero aumento de su expresión durante la octava semana de infección. Por su parte, la secuencia uno se mantiene reprimida a lo largo de la infección.
- El gen Light (codificador de Tnfsf14) se expresa fuertemente al inicio de la infección, regresa a niveles de expresión cercanos a los basales en la cuarta semana y finalmente se expresa en forma moderada durante la semana octava de infección.

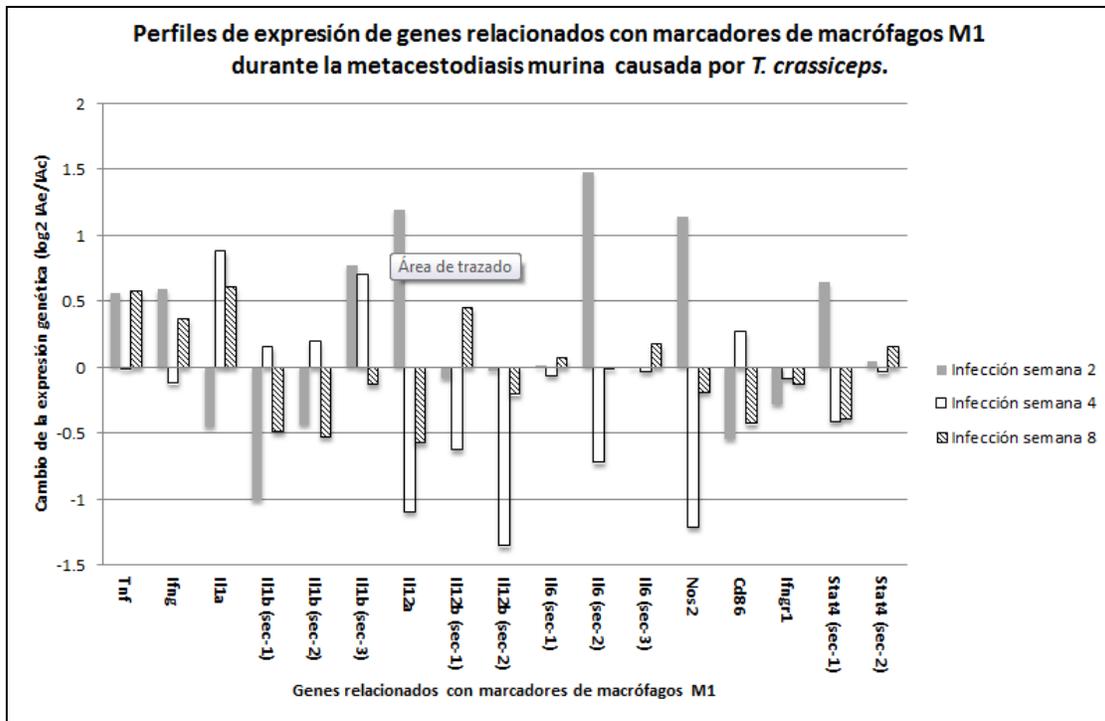


Figura 21. Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de macrófagos M1 en ratones BALB/c durante la infección por *Taenia crassiceps*. Los valores numéricos de expresión resultan de la obtención del logaritmo base 2 de la relación entre señales del mismo gen en condiciones experimentales y condiciones control.

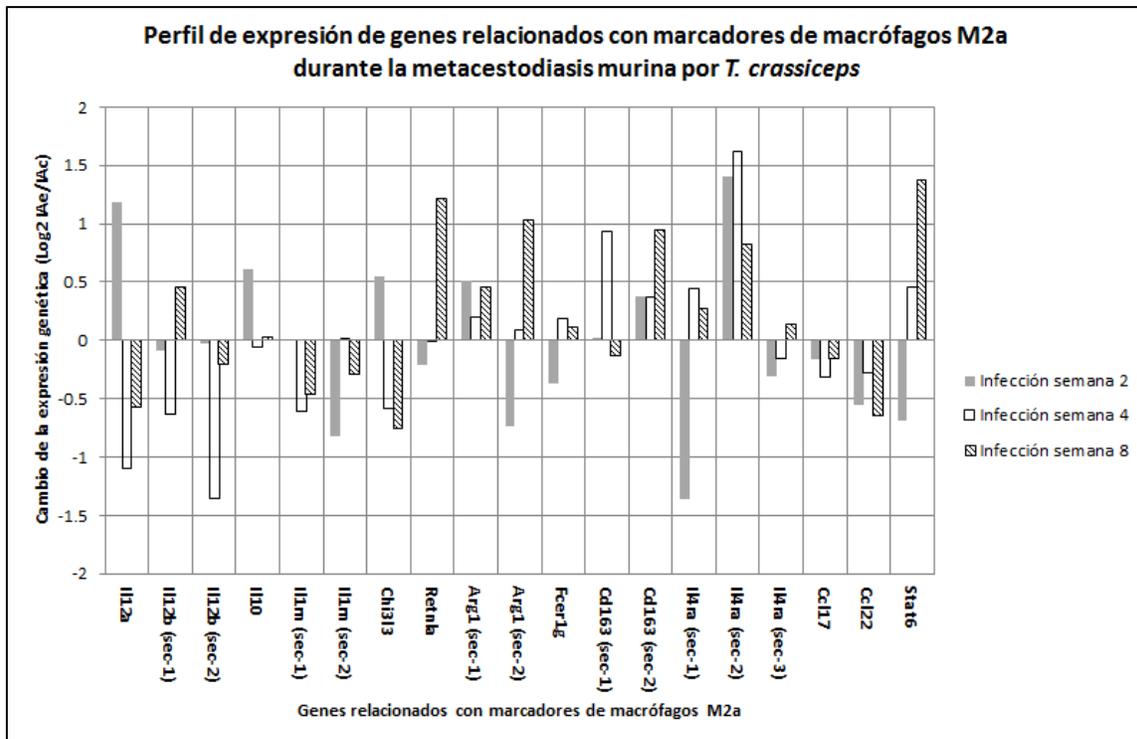


Figura 22. Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de macrófagos M2a en ratones BALB/c durante la infección por *Taenia crassiceps*. Los valores numéricos de expresión resultan de la obtención del logaritmo base 2 de la relación entre señales del mismo gen en condiciones experimentales y condiciones control.

Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de los macrófagos M2c.

En la [figura 24](#) se muestran las expresiones de marcadores de macrófagos M2c, en ella podemos destacar los siguientes comportamientos:

- La secuencia dos del gen Cd163 se expresa en forma constante durante la segunda y cuarta semana de infección, y posteriormente aumenta su expresión en la octava semana. Por su parte, la secuencia uno sólo alcanza la sobre expresión durante la cuarta semana de infección.
- El gen Tgfb1 es reprimido en la segunda semana de infección, en la cuarta semana se expresa a nivel basal y finalmente vuelve al estado de represión genética hacia el final de la infección.
- El gen Ptx3 presenta una represión genética durante la segunda y cuarta semana de infección, posteriormente es sobre expresado ligeramente durante la octava semana de infección.
- La secuencia uno del gen Ccl3 sufre un progresivo aumento de su expresión que va desde la represión durante la segunda semana de infección, hasta la sobre expresión en la cuarta y octava semana. Por su parte, la secuencia dos se ve sobre expresada sólo durante la segunda semana de infección, y muestra represión durante el resto de la infección.

Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de los macrófagos M2d.

Finalmente en la [figura 25](#) se muestran las expresiones de marcadores relacionados con macrófagos M2d. En este grupo se pueden resaltar los siguientes comportamientos:

- El gen *Vtcn1* que codifica para la proteína B7H4 presenta un ligero aumento de su expresión en la segunda y octava semana de infección; mientras que durante la cuarta semana muestra una ligera represión.
- La secuencia dos del gen *Cd80* se encuentra reprimida y mantiene esa represión a lo largo de la infección. Por su parte la secuencia uno aumenta su expresión durante la segunda y cuarta semana de infección para posteriormente regresar a valores de expresión basales durante la octava semana de infección.
- El gen *Ccl5* se mantiene reprimido durante la segunda y cuarta semana de infección, y en la octava semana alcanza su valor máximo de expresión.
- El gen *Cxcl10* se mantiene reprimido a lo largo de toda la infección.
- Las secuencias uno y dos del gen *Cxcl16* presentan pocas variaciones en sus expresiones a lo largo de la infección. La secuencia uno varía su expresión desde la ligera represión hasta un ligero aumento de expresión, por su parte la secuencia dos mantiene constante su bajo nivel de expresión.

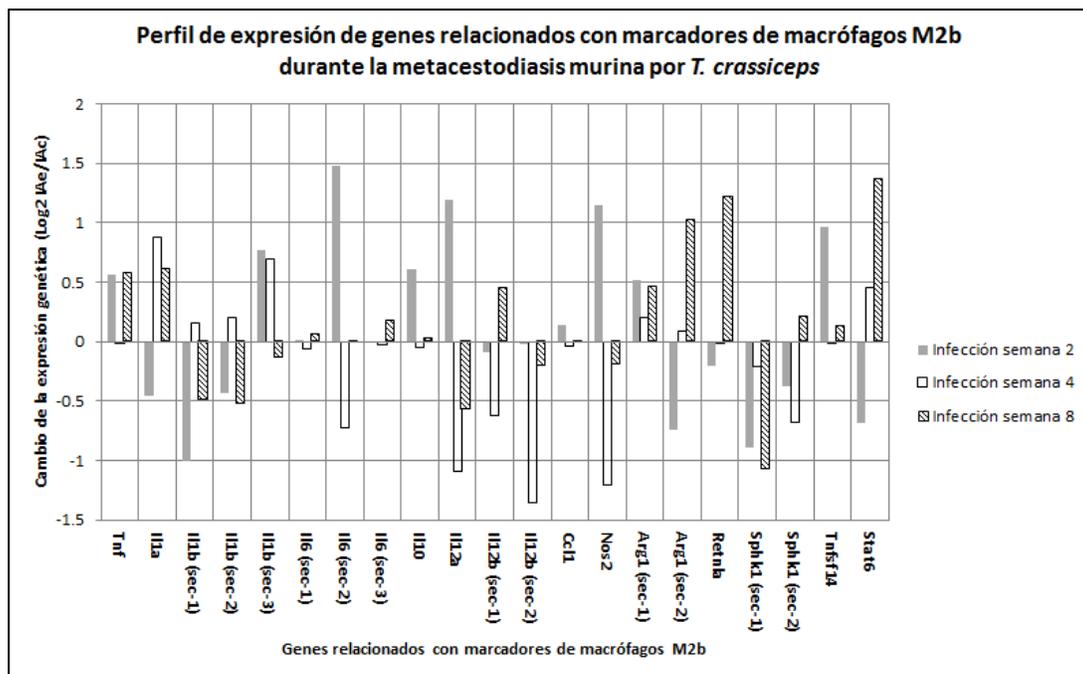


Figura 23. Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de macrófagos M2b en ratones BALB/c durante la infección por *Taenia crassiceps*. Los valores numéricos de expresión resultan de la obtención del logaritmo base 2 de la relación entre señales del mismo gen en condiciones experimentales y condiciones control.

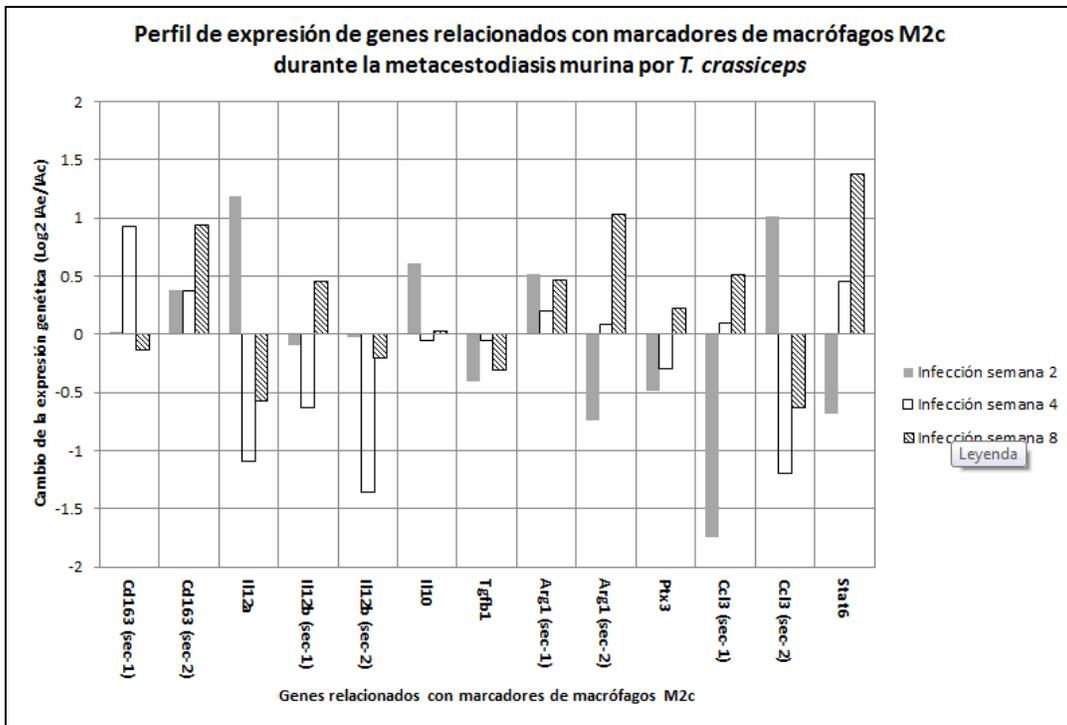


Figura 24. Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de macrófagos M2c en ratones BALB/c durante la infección por *Taenia crassiceps*. Los valores numéricos de expresión resultan de la obtención del logaritmo base 2 de la relación entre señales del mismo gen en condiciones experimentales y condiciones control.

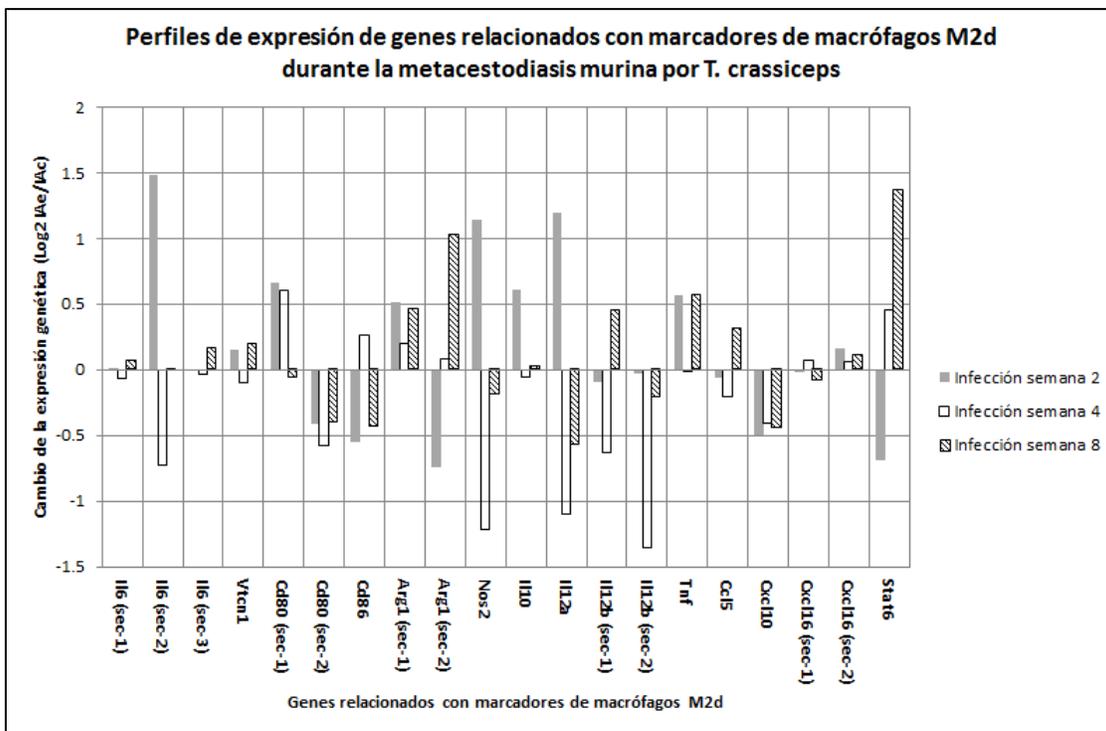


Figura 25. Perfiles de expresión de genes relacionados con marcadores de macrófagos M2d en ratones BALB/c durante la infección por *Taenia crassiceps*. Los valores numéricos de expresión resultan de la obtención del logaritmo base 2 de la relación entre señales del mismo gen en condiciones experimentales y condiciones control.

Formación de conglomerados y elección de grupos de interés.

Como último procedimiento, con el software Genesis se analizaron los genes de la lista construida ([Apéndice A](#)) con el fin de poder identificar y proponer genes que pudiesen ser potenciales marcadores para los estados de activación M1 y M2 en macrófagos. Para esto se realizó un análisis de conglomerados en donde, por medio de herramientas estadísticas, se conformaron grupos de genes, de tal manera que los conglomerados formados posean homogeneidad dentro de los mismos y a la vez exhiban la máxima diferencia entre ellos.

Como resultado de la formación de conglomerados se obtuvo un dendograma que nos permite el análisis de 75 grupos de genes y la distinción de los mismos en base a sus comportamientos de expresión ([figura 26](#)). Auxiliado de éste gráfico, fue posible realizar la selección de aquellos grupos cuyo perfil de expresión a lo largo de la infección pudiera proporcionar potenciales marcadores en los estados de activación de macrófagos.

Así pues, para posibles genes marcadores de macrófagos M1 se eligieron aquellos grupos en donde se presentara un aumento de expresión considerable durante la segunda semana de infección, pero que hacia las semanas cuatro y ocho de infección mostrarán represión en forma importante ([figuras 26 y 27](#)). A su vez los posibles marcadores de macrófagos M2 se eligieron bajo los criterios de presentar un aumento de expresión durante la octava semana de infección pero una fuerte represión durante la segunda y cuarta semana de infección ([figuras 26 y 28](#)).

Al final del procesamiento y discriminación de grupos, bajo los criterios antes mencionados, se eligieron los siguientes grupos:

- Grupos con potenciales marcadores de macrófagos M1: 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18 y 19; los cuales suman un total de 42 genes con sus diferentes secuencias.
- Grupos con potenciales marcadores de macrófagos M2: 4, 6, 28, 29, 31, 43, 56 y 58; para un total de 35 genes con sus diferentes secuencias.

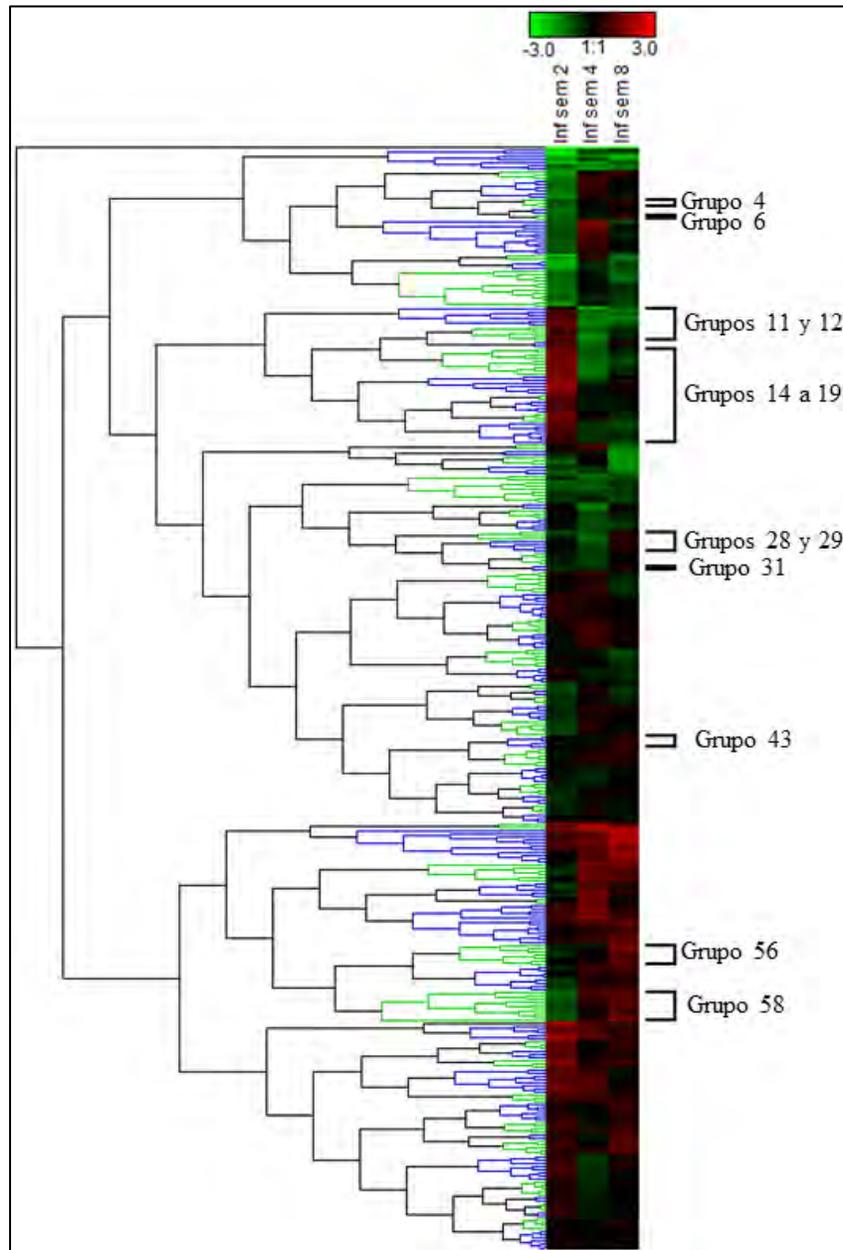


Figura 26. Dendrograma de la lista de 355 genes, los grupos señalados son aquellos que por su perfil de variación en su expresión podrían ser potenciales marcadores de los fenotipos M1 y M2 en macrófagos. Los valores de expresión en tonos rojos denotan sobre expresión genética, los valores cercanos al color negro denotan expresiones cercanas a las basales y los tonos verdes valores de represión genética.

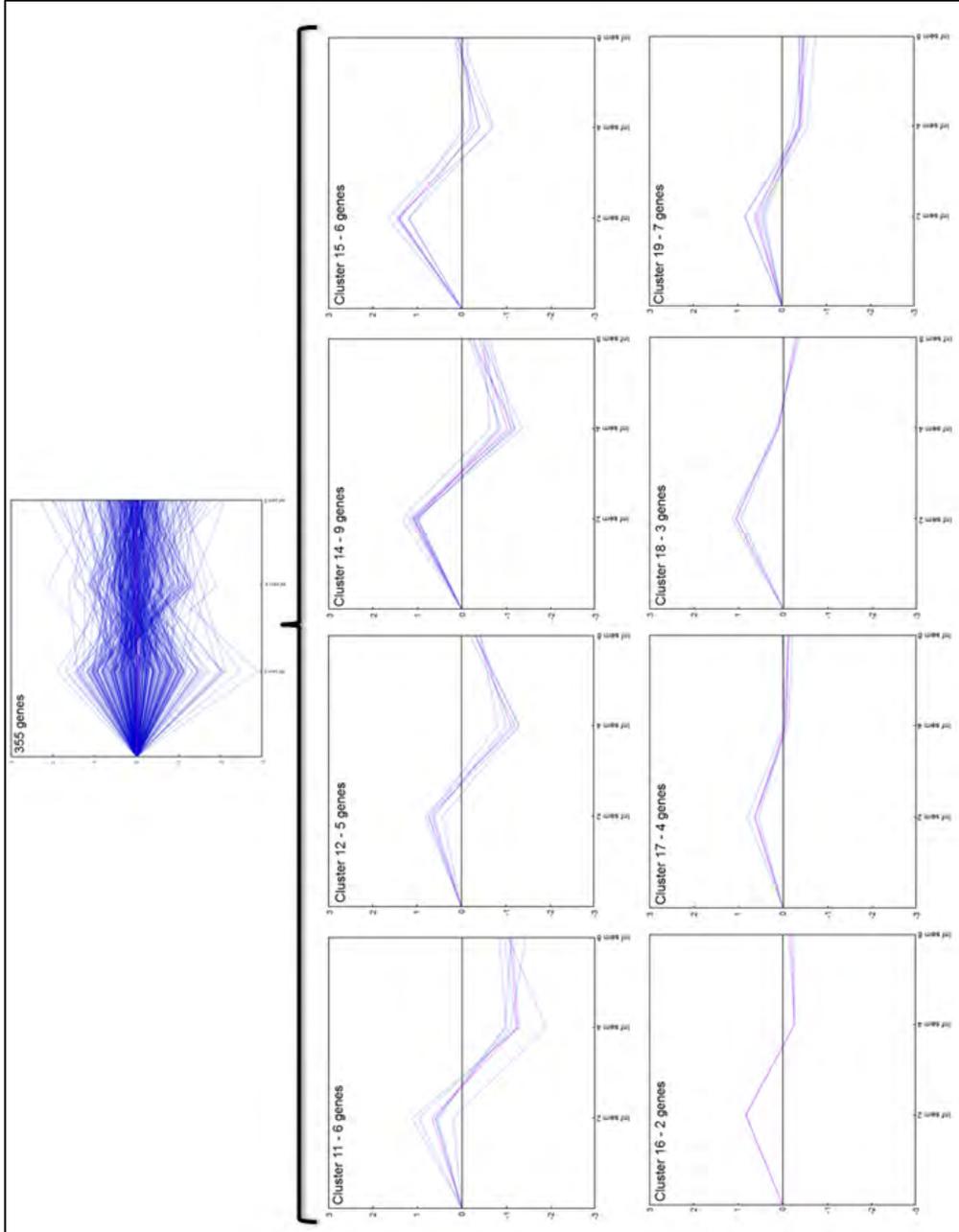


Figura 27. Perfiles de expresión genética de grupos con potenciales marcadores de macrófagos M1. El eje de las abscisas tiene en la escala los tiempos de infección del experimento (2, 4 y 8 semanas de izquierda a derecha), el eje de las ordenadas tiene la escala de valores de normalización (valores positivos para sobre expresión y valores negativos para represión genética). Las líneas azules representan los perfiles de expresión de genes individuales y la línea rosada representa la expresión promedio del grupo.

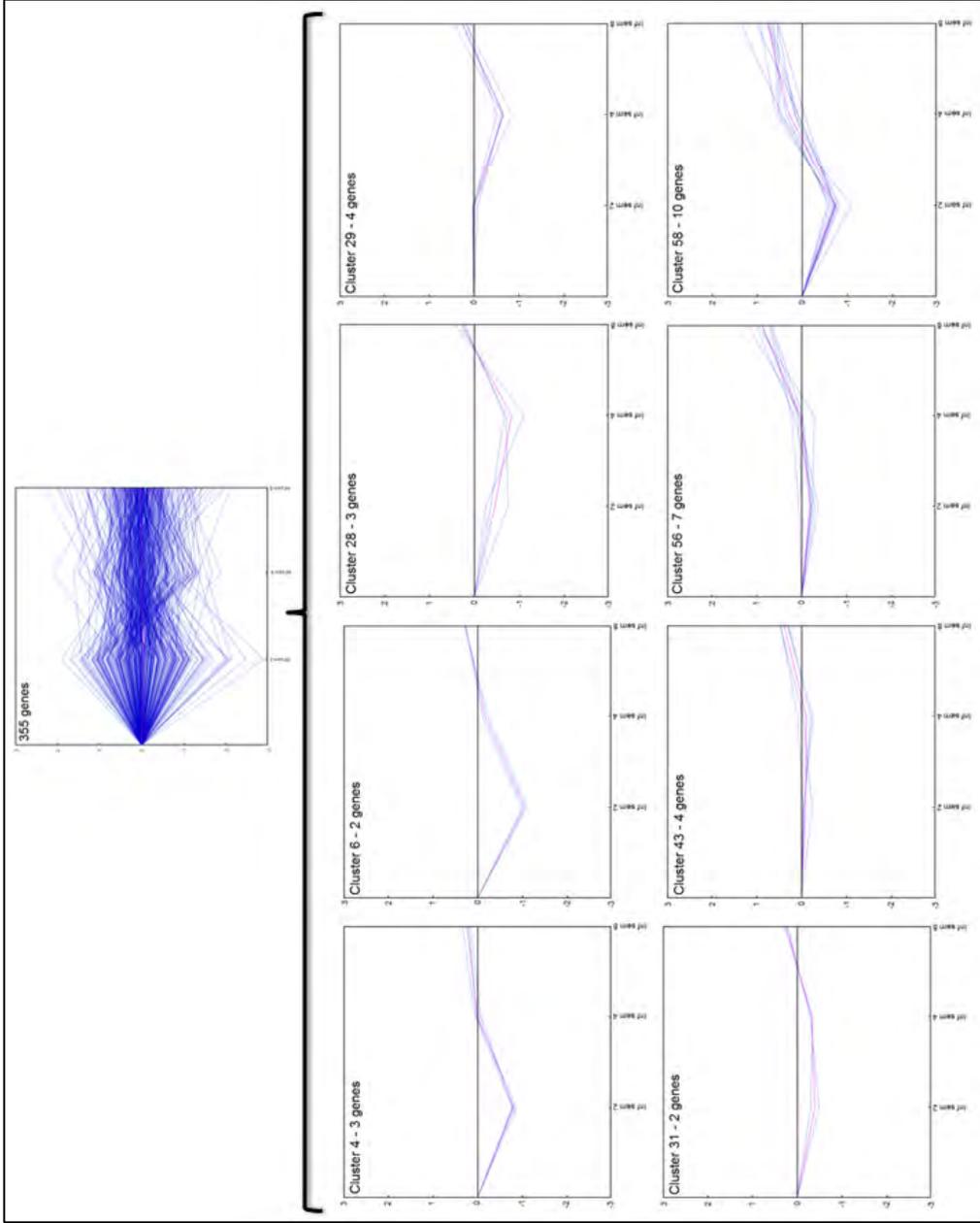


Figura 28. Perfiles de expresión genética de grupos con potenciales marcadores de macrófagos M2. El eje de las abscisas tiene en la escala los tiempos de infección del experimento (2, 4 y 8 semanas de izquierda a derecha), el eje de las ordenadas tiene la escala de valores de normalización (valores positivos para sobre expresión y valores negativos para represión genética). Las líneas azules representan los perfiles de expresión de genes individuales y la línea rosada representa la expresión promedio del grupo.

Potenciales marcadores para macrófagos M1 durante la infección por *T. crassiceps*.

De los conglomerados formados y su análisis se obtuvieron 22 genes con potencial de fungir como marcadores de macrófagos M1 durante el proceso de metacestodiasis por *T. crassiceps*. Los marcadores propuestos en éste trabajo fueron categorizados en tres grupos como resultado de la función biológica que desempeñan: citocinas, receptores y marcadores mixtos; los resultados finales se muestran en la [tabla 2](#).

Potenciales marcadores para macrófagos M2 durante la infección por *T. crassiceps*.

Del análisis de los conglomerados fue posible obtener una lista de 16 genes con potencial de fungir como marcadores de macrófagos M2 durante la metacestodiasis murina por *T. crassiceps*. Al igual que la lista construida para marcadores de macrófagos M1, la de potenciales marcadores de macrófagos M2 se categorizó en tres grupos obteniéndose la mostrada en la [tabla 3](#).

Marcadores con funciones de citocinas (Símbolo/ Nombre)	Ontologías del gen (Claves GO)
Il2/Interleucina 2	GO:0006955, GO:0032725, GO:0042102, GO:0042104
Ccl7/Chemokine (C-C motif) ligand 7	GO:0006935, GO:0006954, GO:0006955, GO:0007010, GO:0048245, GO:2000503
Ccl3/Chemokine (C-C motif) ligand 3	GO:0002548, GO:0006935, GO:0006954, GO:0006955, GO:0048245, GO:0048246, GO:0048247, GO:2000503
Ccl2/Chemokine (C-C motif) ligand 2	GO:0002548, GO:0006935, GO:0006954, GO:0006955, GO:0007010, GO:0048246, GO:0048247, GO:0051770
Cxcl9/Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	GO:0006954, GO:0006955
Marcadores con funciones de receptores (Símbolo/ Nombre)	Ontología del gen (Claves GO)
Tirap1/Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein	GO:0006954, GO:0032735, GO:0032760, GO:0045089, GO:0045410
Cx3cr1/Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	GO:0006935, GO:0048246
Tnfrsf13b/Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	GO:0006955, GO:0030890, GO:0031295, GO:0042102
Tnfrsf13b/Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b	GO:0030889
Tnfrsf1b/Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	GO:0006954, GO:0006955, GO:0033209, GO:0050728
Tlr7/Toll-like receptor 7	GO:0002224, GO:0006954, GO:0032755, GO:0045078
Cd11h/CD11d antigen	GO:0001916, GO:0006955, GO:0019882, GO:0042102, GO:0043032, GO:0045078
Marcadores variados (proteínas, enzimas, etc.) (Símbolo/ Nombre)	Ontología del gen (Claves GO)
Saa3/Serum amyloid A3	GO:0006953
C3/Complement component 3	GO:0006954, GO:0006956, GO:0045087, GO:0050766
Icam1/Intercellular adhesion molecule 1	GO:0007155, GO:0045429
Socs1/Suppressor of cytokine signaling 1	GO:0019221, GO:0035556, GO:0046426
Arpc3/Actin related protein 2-3 complex subunit 3	GO:0030833
Pigo/Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O	GO:0006506
Nexn/Nexilin	GO:0030334
Bin1/Bridging integrator 1	GO:0045807
Spn/Sialophorin	GO:0007162, GO:0031295, GO:0042102, GO:0042535
AF251705/cDNA sequence AF251705	GO:0050715

Tabla 2. Lista de genes propuestos como marcadores de macrófagos M1. Las claves de ontología de los genes (claves GO) denotan el proceso biológico en el que participan (listado de significados de claves GO en [APÉNDICE B](#)).

Marcadores con funciones de citocinas (Símbolo/ Nombre)	Ontologías del gen (Claves GO)
Cish /Cytokine inducible SH2-containing protein	GO:0040008, GO:0035556, GO:0009968
Marcadores con funciones de receptores (Símbolo/ Nombre)	Ontología del gen (Claves GO)
Fcgr3 /Fc receptor, IgG, low affinity III	GO:0001788, GO:0001798, GO:0001805, GO:0001812, GO:0006910, GO:0030593, GO:0038094, GO:0045576
Ly9 /Lymphocyte antigen 9	GO:0007155
Cxcr3 /Chemokine (C-X-C motif) receptor 3	GO:0006935, GO:0010818, GO:0019722, GO:00700098
Igsf6 /Immunoglobulin superfamily, member 6	-----
Fcgr2b /Fc receptor, IgG, low affinity Iib	GO:0002638, GO:0002862, GO:0002865, GO:0006955, GO:0016064, GO:0030889, GO:0032693, GO:0050777
Siglec5 /Sialic acid binding Ig-like lectin 5	GO:0007155
Fcaml /Fc receptor IgA, IgM, high affinity	GO:0006955, GO:0007165
Klra12 /Killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 12	-----
Marcadores variados (proteínas, enzimas, etc.) (Símbolo/ Nombre)	Ontología del gen (Claves GO)
Bcl6 /B cell leukemia/lymphoma 6	GO:0002829, GO:0008285, GO:0030183, GO:0030308, GO:0030890, GO:0042092, GO:0043380, GO:0045629
Timp1 /Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	GO:0043066, GO:0051045
Oasl2 /2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	GO:0006955, GO:0045087
Mmp12 /Matrix metalloproteinase 12	GO:0006408, GO:0035313, GO:0060054
Socs6 /Suppressor of cytokine signaling 6	GO:0001678, GO:0035556, GO:0050868
Nmi /N-myc (and STAT) interactor	-----
Rnase4 /Ribonuclease, RNase A family 4	-----

Tabla 3. Lista de genes propuestos como marcadores de macrófagos M2. Las claves de ontología de los genes (claves GO) denotan el proceso biológico en el que participan (listado de significados de claves GO en [APÉNDICE B](#)).

DISCUSIONES

Cinética de infección y carga parasitaria.

La infección realizada en el ratón con 10 metacestodos mostró que el proceso de infección coincide con el perfil previamente reportado en la bibliografía ([12](#), [17](#)); en donde existe una resistencia a la infección durante la segunda y cuarta semana como consecuencia de la destrucción de los parásitos y que se relaciona con la respuesta inmune tipo Th1. Por su parte hacia la octava semana de infección existe un aumento de la carga parasitaria alcanzando valores del orden de 800 metacestodos, que coincide con cambio en la respuesta inmune del tipo Th2 y el establecimiento del parásito.

Por otro lado, las expresiones en los microarreglos de los genes marcadores relacionados con macrófagos M1 y M2 en los diferentes tiempos de muestreo mostraron que efectivamente, en el inicio de la infección, se establece un estado inmunitario del tipo Th1 y en donde los macrófagos adoptaron un fenotipo M1; mientras que hacia el final de la infección se estableció una respuesta inmune tipo Th2, donde los macrófagos adoptaron un fenotipo M2.

Cuantificación de citocinas por método de ELISA.

Los resultados obtenidos en las cuantificaciones de las citocinas IL4, TNF- α e IL10 en cultivos de macrófagos sin estimular con LPS fueron bajos y sin diferencias significativas entre ellos (resultados no mostrados), por el contrario en estudios en donde los macrófagos son obtenidos de la misma manera pero con una posterior estimulación en cultivo se muestran cantidades elevadas de citocinas. Debido a que la expresión genética se vería modificada como consecuencia de la estimulación en cultivo, se optó por no administrar dichos estímulos en cultivo y así poder obtener expresiones genéticas apegadas a las que las células muestran *in vivo*.

Expresión de marcadores genéticos por RT-PCR.

De los resultados obtenidos por reacciones de RT-PCR podemos observar que el comportamiento de la expresión del gen Gapdh es consistente con lo esperado para un gen de mantenimiento, expresándose en forma constante a través del tiempo en ratones infectados y sin infectar.

Así mismo, los perfiles de los genes relacionados con marcadores de macrófagos M1 (iNOS) y M2 (Arg1) indican el establecimiento de una población de macrófagos mixta durante la segunda semana de infección.

A pesar de lo anterior la determinación de carga parasitaria determinó que la respuesta predominante en la segunda semana de infección es restrictiva. En éste sentido, la diferenciación temprana de macrófagos bajo el fenotipo M2 podría tener dos posibles razones: que la población de macrófagos M2 exista como un mecanismo de la respuesta inmune para mantener controlado el proceso inflamatorio y la segunda posibilidad es que esta diferenciación sea resultado del efecto inmunorregulador que el parásito puede realizar por medio de diferentes metabolitos secretados.

Por su parte, las reacciones de RT-PCR hacia la cuarta y octava semana de infección muestran que existe una expresión del marcador de macrófagos del fenotipo M2 y la represión del marcador de macrófagos M1, señalando una respuesta inmune del tipo Th2.

Estos resultados concuerdan con estudios realizados y en los que se establece que la respuesta inicial es predominantemente del tipo Th1, pero en donde también es posible determinar la diferenciación temprana de macrófagos hacia el fenotipo M2 ([34](#)); mientras que durante la infección de 8 semanas sucede el establecimiento de la respuesta inmune del tipo Th2.

Caracterización fenotípica de macrófagos en la fase inicial de la respuesta inmune mediante microarreglos.

En éste momento de la infección se verifica la expresión genética de marcadores como: Tnf, Ifng, Il12a, Il1b, Il6, iNOS (Nos2) y Stat4, identificándose un perfil de respuesta inmune en el que los macrófagos adoptaron el fenotipo M1 ([tabla 4](#)). Sin embargo dentro de los marcadores relacionados con macrófagos M1, existen ciertos genes que no se expresan según lo esperado como: CD86 e IFN γ r1.

La falta de sobre expresión de estos genes podría ser el resultado de dos factores: el primero es a la falta de un estímulo secundario en los cultivos de macrófagos provenientes de la infección, no ocasionándose la amplificación del estado inmunológico. Un segundo factor, que podría explicar las diferencias, está en el hecho de que se utilizaron macrófagos cultivados por 24 horas lo que podría haber ocasionado una disminución del estado de activación del macrófago y que genes de rápida respuesta hayan regresado niveles basales de expresión.

Por otra parte, en lo que a marcadores de macrófagos M2 corresponde, es notable que exista una sobre expresión de algunos de ellos en el inicio de la infección entre los que se encuentran: Il10, Chi3l3, Arg1, Cd163 y Il4ra. Así pues, la sobre expresión temprana de éstos genes típicamente asociados a macrófagos M2, nos sugieren que la diferenciación en la segunda semana de infección no es absoluta hacia el fenotipo M1 y que existe un balance en donde una mayoría de ellos si adopta un perfil de activación inflamatorio (M1) y cuyo accionar prevalecerá sobre la acción de su contraparte, pero que no implica la ausencia de macrófagos en estado de activación anti inflamatorio (M2).

Estos perfiles de expresión de genes marcadores resultan congruentes, pues resulta lógico pensar que exista dicho equilibrio entre ambos estados de activación como una forma de asegurar la regulación de la respuesta inmune inflamatoria; la presencia de macrófagos M2 en forma temprana podría contribuir a mantener

controlada la respuesta tipo Th1 previniendo la exacerbación de la misma y por consiguiente los daños relacionados a una respuesta no regulada.

Otra posibilidad, que explicaría la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo M2 en la fase inicial de la infección, es que esta diferenciación fuese el resultado de la acción de factores que el metacestodo posee y que utiliza como herramientas para modificar la respuesta inmune llevándola rápidamente hacia un perfil menos hostil para su desarrollo; en cuyo caso podríamos estar identificando algunos de los factores que son modificados fuertemente por éstos procesos de inmunorregulación por parte del parásito.

Caracterización fenotípica de macrófagos en la fase final de la respuesta inmune mediante microarreglos.

Por su parte, hacia la octava semana de infección se han podido establecer los perfiles de expresión de la gran mayoría de los marcadores de macrófagos M2 (Retn1a, Arg1, Fcgr1g, Cd163, Il4ra y Stat6); pero no resulta sencillo establecer a qué subpoblación de macrófagos corresponden debido a un número grande de inconsistencias.

Los valores de sobre expresión, hacia la octava semana de infección, de la secuencia 1 de la subunidad beta de IL-12 y niveles de expresión cercanos a los basales para IL-10, nos sugieren que existe un perfil alto para IL-12 y bajo para IL-10; basándonos en la [tabla 4](#) podemos observar que éste comportamiento de producción de citocinas concuerda sólo con el producido por el fenotipo M2a. La posible presencia de éste fenotipo de macrófagos se refuerza debido al aumento de la expresión de genes como: Relm- α , Arg1 y el receptor alfa de la interleucina 4 (Il4ra). No obstante lo anterior existen factores que, por sus perfiles de expresión, ocasionan que la categorización de los macrófagos dentro del fenotipo M2a no resulte tan sencilla, por ejemplo tenemos:

- El gen Ym1, considerado como un importante marcador de macrófagos M2a, no se expresa según lo esperado; debido a que presenta niveles de represión hacia el final de la infección.
- El gen Il1rn (receptor antagonista de la interleucina 1) no aumenta su expresión hacia el final de la infección sino que se ve reprimido a lo largo de todo el experimento.

Marcador (Símbolo/ Nombre)	Expresión de genes en macrófagos M2			
	M2a	M2b	M2c	M2d
Il12/Interleucina 12	Alto	Bajo	Bajo	Bajo
Il10/Interleucina 10	Bajo	Alto	Alto	Alto
Il1rn/ Receptor antagonista de interleucina 1	Alto			
Chi313/Proteína parecida a quitinasas	Si			
Retnla/Proteína parecida a resistina alfa	Si	No		
Arg1/Arginasa	Si	No	Si	No
Fcgr1g/Polipéptido gama de alta afinidad al Fc de IgE's	Si			
Cd163/Antígeno Cd163	Si		Si	
Il4ra/Receptor alfa de interleucina 4	Si			
Ccl17/Ligando 17 de quimiocinas (C-C motif)	Si			
Ccl22/Ligando 22 de quimiocinas (C-C motif)	Si			
Tnf/Factor de necrosis tumoral alfa		Alto		Bajo
Il1b/Subunidad beta de la interleucina 1		Alto		
Il6/Interleucina 6		Alto		
Ccl1/Ligando 1 de quimiocinas (C-C motif)		Alto		
Nos2/Óxido nítrico sintetasa inducible		Si		No
Sphk1/Esfingosina quinasa 1		Si		
Light/Miembro 14 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral alfa		Si		
Tgfb1/Factor de crecimiento transformante beta 1			Si	
Ptx3/Gen relacionado con Pentraxina			Si	
Ccl3/Ligando 3 de quimiocinas (C-C motif)			Bajo	
Vtcn1/Dominio V-set que contiene el inhibidor 1 de la activación de células T				Si
Cd80/Antígeno CD80				Bajo
Cd86/Antígeno CD86				Bajo
Ccl5/Ligando 5 de quimiocinas (C-C motif)				Si
Cxcl10/Ligando 10 de quimiocinas (C-X-C motif)				Si
Cxcl16/Ligando 16 de quimiocinas (C-X-C motif)				Si

Tabla 4. Resumen de la expresión de marcadores en los diferentes fenotipos de macrófagos M2.

([23](#), [24](#), [25](#), [26](#), [27](#), [28](#), [31](#), [32](#))

Estas diferencias en la expresión de los genes con respecto a las expresiones esperadas podría explicarse en los dos factores ya descritos con anterioridad: la falta del fenómeno de “amplificación” ocasionado por el cultivo sin estímulos o el posible restablecimiento en los niveles de expresión de algunos genes. Ahora, si bien existe una mayoría de expresiones genéticas que concuerdan con el fenotipo

M2a, también existen genes que señalan la presencia de otros fenotipos celulares diferentes del M2a.

El comportamiento de un gen tan importante como Tnf, pareciera sugerir la presencia de macrófagos M1 en éste punto de la infección, sin embargo la ausencia de marcadores clave cómo: Nos2, Il1 e Il6 nos lleva a descartar esta posibilidad; todo parece señalar que en este momento de la infección existe una población diferente de la M1 y que también es capaz de expresar a Tnf, por ejemplo macrófagos del fenotipo M2b. La posible existencia de esta subpoblación de macrófagos se refuerza debido a que se encontraron expresados los genes Sphk1 y Tnfsf14.

Finalmente, la expresión de los genes Ptx3, Ccl3 y Cd163 sugiere también la posibilidad de la existencia de macrófagos M2c; mientras que la represión de Vtn1, la ausencia de desregulación de Il6, y la falta de aumento de expresión de Cxcl10 y Cxcl16 descartan la posibilidad de que existan macrófagos M2d.

Lo anterior lleva a pensar que en éste momento de la infección, la diferenciación de macrófagos ha ocasionado la generación de una población mixta de macrófagos M2, una mayoría de macrófagos del fenotipo M2a y una minoría de las poblaciones M2b y M2c.

Posiblemente esta minoría de poblaciones M2b y M2c se deba a que los niveles de expresión de IL-10 (importante para la diferenciación de los dos grupos) no alcanzan valores altos de expresión impidiendo el desarrollo de una población mayor.

Caracterización fenotípica de macrófagos mediante microarreglos en la cuarta semana de infección ocasionada por metacestodos de *T. crassiceps*.

La cuarta semana de infección bibliográficamente se ha establecido como el tiempo en donde existe el cambio de la respuesta inmune tipo Th1 a una de tipo Th2. Los perfiles de expresión de algunos genes relacionados con macrófagos M1 (Il1a, Il1b y Cd86) y expresión de genes relacionados como macrófagos M2 (Arg1, Fcer1g, Cd163, Il4ra y Stat6) nos indican que los macrófagos se encuentran en un estado de transición, coexistiendo la respuestas Th1 y Th2, así como macrófagos M1 a M2. Sin embargo, la cantidad de genes relacionados con marcadores del fenotipo M2 es mayor, por lo que podríamos inferir que la respuesta inmune se encuentra mayormente polarizada hacia el tipo Th2.

Perfil de la respuesta inmune ante la metacestodiasis murina por *T. crassiceps*.

Según los datos obtenidos, podemos observar que los genes de marcadores clave para macrófagos M1 como: Nos2, Tnf, Ifng y Stat4 se limitan a expresarse en la segunda semana de infección, sólo algunos como Il1 y Cd86 se mantiene en la cuarta semana y ninguno de ellos se expresa hacia la octava semana de infección, sugiriendo que la respuesta tipo Th1 tiene su máximo alrededor de la segunda semana. Por su parte, algunos genes de marcadores clave para macrófagos M2 como: Arg1, Il4ra, Il10, Cd163 y Stat6 se expresan en forma temprana durante la infección, pero la mayoría alcanza su máximo hacia la octava semana de infección, lo cual nos señala que establecimiento de una respuesta inmune tipo Th2 en forma temprana durante la infección como los señala la bibliografía ([29](#), [33](#)) pero con su máximo alrededor de la octava semana.

Potenciales marcadores para macrófagos M1 y M2 durante la infección por *T. crassiceps*.

Una lista de genes marcadores de macrófagos M1 fue encontrada. Además, interesantemente estos se involucran en procesos relacionados durante la respuesta inmune inflamatoria: Il2, Ccl7, Ccl3, Ccl2, Cxcl19, Tirap1, Cx3cr1, Tnfsf13b, Tnfrsf13b, Tnfrsf1b, Tlr7, Cd1d1, Saa3, C3, Icam1, Socs3, Arpc3, Pigo, Nexn, Bin1, Spn y AF251705.

De ésta lista resultan particularmente importantes los siguientes genes:

1. Ccl2, el gen codifica para un factor quimiotáctico de monocitos sin embargo su importancia radica en el hecho de que la citocina es activada como consecuencia de dos citocinas importantes dentro de la respuesta tipo Th1: el TNF- α y la subunidad alfa de la IL-1.
2. Cd1d1, que codifica para una proteína presentadora de antígenos capaz de unir glicolípidos y presentarlos a una especie de células T denominadas NKT (del inglés *Natural Killer T cells*) que tienen la particularidad de expresar un marcador asociado a células NK. Este marcador es de importancia debido a que esta subpoblación de células T además de estar en ratones, también se presenta en humanos.
3. Socs1, codifica una proteína que regula negativamente la activación de STAT-6 ([31](#)).

De igual manera que para marcadores de macrófagos M1, se obtuvo una lista de potenciales marcadores de macrófagos M2 (Cish, Fcgr3, Ly9, Cxcr3, Igsf6, Fcgr2b, Siglec5, Fcamr, Klra12, Bcl6, Timp1, Oasl2, Mmp12, Socs6, Nmi y Rnase4) los cuales participan en procesos como la regulación negativa de la respuesta inmune, funciones de reparación de heridas y la unión de antígenos opsonizados con anticuerpos.

De estos es de resaltar:

1. Socs6, que codifica una proteína que actúa como un mecanismo negativo clásico de la transducción de señales de citocinas. En forma análoga a la anteriormente mencionada Socs1, Socs6 podría estar funcionando a nivel de represión de señales y contribuir a la represión de la respuesta inmune inflamatoria vía STAT-4.

CONCLUSIÓN GENERAL

Por medio de la expresión de genes relacionados con los marcadores de los diferentes macrófagos (M1 y M2), se pudo establecer que existe una temprana diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo M2.

Ésta temprana diferenciación podría tener dos posibles explicaciones: la primera es que la presencia de macrófagos M2 sea parte natural del desarrollo de respuesta inmune y en podrían estar participando como un mecanismo para mantener bajo control el proceso inflamatorio.

Otra posibilidad es que la diferenciación temprana de macrófagos M2 sea el resultado de fenómenos de inmunorregulación que el parásito genera en la respuesta inmune. De ser así, los genes identificados podrían ser los factores más fuertemente influenciados por dicha inmunorregulación. En éste sentido el estudio abre la puerta para proponer nuevas estrategias inmunológicas para combatir a las metacestodiasis, haciendo un estudio detallado de los factores relacionados con macrófagos M2 y establecer si alguno de ellos resulta clave en el proceso de diferenciación ocasionando la susceptibilidad ante la parasitosis.

CONCLUSIONES

El perfil de expresión durante la segunda semana de la metacestodiasis por *T. crassiceps* adopta un fenotipo M1; mientras que hacia la octava semana se presenta un fenotipo M2.

La población de macrófagos M2 en la octava semana está compuesta por una mayoría del fenotipo M2a y una minoría de fenotipos M2b y M2c.

La citocina IL-10, la proteína YM1 y el receptor antagonista de IL-1 no resultan marcadores confiables para la determinación del fenotipo M2 en macrófagos murinos en la metacestodiasis por *T. crassiceps*.

Los genes que codifican para Socs1, Ccl2, y Cd1d1 de macrófago podrían ser potenciales marcadores para el fenotipo de macrófagos M1.

Las proteínas Cish, Fcgr3, Ly9, Cxcr3, Bcl6 y Socs6 de macrófago son potenciales marcadores para el fenotipo M2 de macrófagos.

La temprana diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo M2 podría ser un mecanismo de regulación inmunológica por parte del parásito.

El estudio abre la puerta para proponer nuevas estrategias inmunológicas para combatir a las metacestodiasis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. -Willms K.; Vargas L. & Laclette J. 2006. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. México Secretaria de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Fundación Mexicana para la Salud. Capítulos I y III.
2. -Flisser, Laclette y Vargas. 2006. *Taenia solium*: un parasito cosmopolita. Investigación y Ciencia Mayo 24-33.
3. -Aluja & Villalobos. 2000. Cisticercosis por *Taenia solium* en cerdos de México. Veterinaria México 31(3):239-244.
4. -Del Brutto O.H. y cols. 1996. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. Journal of Neurological Sciences 142:1-6.
5. -Larralde C.; Padilla A. y cols. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública (México) 34(2):197-210.
6. -Secretaria de Salud. 2007. Aspectos relevantes del binomio teniasis/cisticercosis (primera de tres partes). Sistema Único de Información 24(41):1-5.
7. -Zavala J.T; Sánchez-Vega J.T. & Ruiz Sánchez Dora 2002. Helmintiasis y cisticercosis. Revista de la Facultad de Medicina UNAM 45(3):118-125.
8. -Mondragón, A.; Plancarte A.; Flisser A. 1994. El diagnóstico de la cisticercosis humana por ELISA. Salud Pública (México) 36(4):393-398.
9. -García E.; Ordoñez G.; Sotelo J. 1995. Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and

Western Blot (Immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. *Journal of Clinical Microbiology* 323(12):3324-3325.

10. -Willms K. & Zurabian R. 2010. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology*. 137:335-346.

11. -Toledo A.; Fragoso G.; Larralde C.; Sciutto E. 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infection and Immunity* 69(3):1766-1773.

12. -Sciutto E.; Fragoso G. y cols. 2009. *Taenia crassiceps* cysticercosis: Variations in its parasite growth permissiveness that encounter with local immune features in BALB/c substrains. *Experimental Parasitology* 123:362–368.

13. -Sciutto E.; Fragoso G. y cols. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77:243-246.

14. -Sciutto E.; Fragoso. G y cols. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* 66(2):760-764.

15. -Huerta L.; Terrazas L.I.; Sciutto E. & Larralde C. 1992. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *Journal of Parasitology* 78(3):471-476.

16. -Sciutto E.; Larralde C. y cols. 2008. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *Journal of Parasitology* 94(2):551-553.

- 17.** -Terrazas L.I. y cols. 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 84(1):74-81.
- 18.** -Mosman T.R.; Cherwinski H.; Bond M.W.; Giedlin M.A. & Coffman R.L. 1986. Two types of murine helper T cells clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136(7):2348-2357.
- 19.** -Parris Kidd. 2003. Th1/Th2 balance: The hypothesis, it's limitations and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review* 8(3):223-246.
- 20.** -Rodriguez-Sosa M.; Saavedra R.; Tenorio E.; Rosas L.; Satoskar A. & Terrazas L. 2004. A STAT-4 dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and Immunity* 72(8):4552-4560.
- 21.** -Zlotnik A.; Fischer M.; Roehm N. & Zipori D. 1987. Evidence for effects of interleukin 4 (B cell stimulatory factor 4) on macrophages: Enhancement of antigen presenting ability of bone marrow-derived macrophages. *The Journal of Immunology* 138(12):4275-4279.
- 22.** -Crawford R. y cols. 1987. B cell stimulatory factor-1 (Interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *The Journal of Immunology* 139(1):135-141.
- 23.** -Duque-Correa M. A. & Rojas-López M. 2007. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología* 26(2):73-86.
- 24.** -Mosser D.M. 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology* 73:209-212.

- 25.** -Mosser D. M. & Edwards J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* 8:958-969.
- 26.** -Mantovani A. y cols. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *TRENDS in Immunology* 25(12):677-686.
- 27.** -Duluc D; Delneste Y. y cols. 2007. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood Journal* 110(13):4319-4330.
- 28.** -Wang Q.; Ni H, y cols. 2010. Fra-1 proto-oncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Research* 20(6):701-712.
- 29.** -Terrazas L.I.; Satoskar A.R. y cols. 2010. Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance *in vivo*. *International Journal of Parasitology* 40:731-742.
- 30.** -Satoskar A.R.; Bojalil R.; Terrazas L.I. y cols. 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infection and Immunity* 70(7):3656-3664.
- 31.** -Wurster A. L.; Tanaka T. & Grusby M.J. 2000. The biology of STAT-4 and STAT-6. *Oncogene* 19:2577-2584.
- 32.** -Lang R.; Patel D.; Morris J.J.; Rutschman R.L. & Murray P.J. 2002. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *The Journal of Immunology* 169:2253-2263.

33. -Toenjes S.; Spolski R.; Mooney K. & Kuhn R. 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2 type response. *Parasitology* 118:623-633.

34. –Terrazas L.I. y cols. 2009. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strain mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, genetics and evolution* 9:1115-1127.

APENDICE A

Listado de genes construido para el análisis y procesamiento en el software Genesis.

Símbolo	Información acerca del gen
Il12a	Codifica para una subunidad de la citocina IL-12, un factor de crecimiento de células T activadas y NK's, incrementa la producción de IFN- γ y resulta importante para la diferenciación de células Th1
Il12b	Codifica para una subunidad de la citocina IL-12, un factor de crecimiento de células T activadas y NK's, incrementa la producción de IFN- γ y resulta importante para la diferenciación de células Th1
Il6	La citocina codificada actúa en forma importante en el proceso de inflamación, participa en la maduración de células B y en la diferenciación de monocitos
Cd86	El codificado es una proteína miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, es ligando para proteínas de superficie de células T (en las que estimula la proliferación y la producción de IL-2)
Il1a	La proteína codificada es producida por monocitos y macrófagos como una pro-proteína que es procesada proteolíticamente y liberada en procesos de daño celular induciendo apoptosis
Il1b	El codificado es producido por macrófagos activados como una pro-proteína que es procesada por la Caspasa1 para pasar a su forma activa; la IL-1 estimula la respuesta inflamatoria
Tnf	El codificado es una citocina (TNF- α) principalmente producida por macrófagos que es capaz de inducir apoptosis de ciertas células tumorales y capaz de estimular el crecimiento y diferenciación celular
Il18	La citocina pro inflamatoria codificada aumenta la actividad de células NK's además de ocasionar que las células T tipo 1 aumente su producción de IFN- γ
lfnf	La proteína codificada es un miembro de la familia del interferón tipo II, una citocina soluble con propiedades antivirales, antitumorales e inmunorregulatorias ya que es capaz de ocasionar una potente activación de macrófagos
Cxcl11	El codificado es un quimioatrayente de células T (previamente activadas por interleucinas), neutrófilos y monocitos. Induce la liberación de calcio por parte de células T activadas
Cxcl9	La función de éste gen no ha sido específicamente definida, sin embargo afecta el desarrollo, activación y movimiento de células que participan en la respuesta inmune inflamatoria
Ccl3	El codificado es un quimiotáctico de linfocitos y monocitos; es un ligando de CCR1, CCR3 y CCR5
Ccl5	El codificado es un quimioatrayente de monocitos, linfocitos Th de memoria y eosinófilos; causa la liberación de histamina de basófilos y eosinófilos activados
Cxcl10	El codificado es una quimiocina y ligando de CXCR3, cuando lo une ocasiona la estimulación de monocitos, la migración de células T y NK además de resultar quimiotáctico para monocitos y células T
Ccl4	La proteína codificada es una quimiocina con propiedades inflamatorias que une a CCR5
Nos2	Codifica la proteína iNOS que produce óxido nítrico, en macrófagos su acción es tumoricida y bactericida
Timp1	El codificado forma complejos con metaloproteinasas inactivándolas
Timp2	El codificado forma complejos con metaloproteinasas inactivándolas
Mmp12	El codificado es una proteína miembro de la familia de metaloproteinasas de matriz

	involucradas en los procesos de degradación de matriz extracelular
Arg1	Codifica una enzima citosólica con actividad de arginasa, en condiciones anti-inflamatorias ocasiona la inhibición de iNOS
Chi3l3	El codificado también denominado Ym1 es una proteína secretoria, está involucrada en la reacción en contra de organismo que contienen quitina (levaduras, hongos, nematodos)
Il13	La citocina codificada inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias, sinergiza con IL-12 para regular la producción de IFN- γ ; resulta crítica en la regulación de reacciones inflamatorias y en el cambio de isotipo de inmunoglobulinas
Il4ra	El codificado es la cadena alfa del receptor de IL-4 aunque también es capaz de unir IL-13 para regular la producción de IgE
Il13ra2	El codificado es capaz de unir a IL-13 con gran afinidad, pero carece de dominio citoplasmático; se ha reportado que tiene un papel en la internalización de IL-13
Socs1	El codificado es una proteína miembro de la familia de proteínas SOCS que forman parte del clásico sistema de retroalimentación negativa en la transducción de señales de citocinas al inhibir a STAT
Cish	La expresión de éste gen puede ser inducida por IL-2, IL-3, GM-CSF y EPO; su función es la de ser un inhibidor de STAT inducida por citocinas
Retnla	El codificado es una proteína también denominada RELM- α o FIZZ1 ricas en cisteína que además guarda homología con la resistina. Esta proteína es considerada marcador de macrófagos alternativamente activados
Itgam	El codificado también denominado CD11b es una integrina implicada en interacciones de adhesión de monocitos, macrófagos y granulocitos; sirve como mediador en la captura de partículas que han sido atacadas por el complemento
Itgax	El codificado también denominado CD11c es una integrina que funciona como receptor de fibrinógeno, es importante en el proceso de adhesión y quimiotaxis de monocitos
Itgb2	El codificado también denominado CD18 es una integrina que funciona como receptor de un fragmento de uno de los componentes del complemento y como receptor de fibrinógeno
Itgb1	El codificado también denominado CD29 es una integrina que funciona como receptor de colágeno, se involucra en adhesión celular y reconocimiento durante procesos como respuesta inmune o reparación de tejidos
Clecsf6	El codificado es una lectina tipo C que podría estar involucrada en la reactividad inmune al favorecer la presentación antigénica de lípidos y glicolípidos
Fcgr1g	El codificado también denominado CD23 se asocia con una variedad de receptores de cadenas alfa del Fc para formar un complejo de señalización regulando varios aspectos de la respuesta inmune
Ccl17	El codificado es factor quimiotáctico para linfocitos T, podría tener un papel en el desarrollo de linfocitos en el timo; además del tráfico y maduración de células B
Ccl22	El codificado podría tener un papel en el tráfico de linfocitos T activados a los sitios de inflamación; resulta quimiotáctico para monocitos, células dendríticas y NK's
Il18r1	El receptor codificado es un receptor de la IL-18
Il8rb	Codifica para el receptor beta de IL-8 (también denominado CXCR2), funciona como mediador en el proceso de migración de neutrófilos al sitio de inflamación
Ccl24	El codificado es una proteína que funciona como factor quimiotáctico para linfocitos T en reposo y eosinófilos, es poco quimioatrayente para neutrófilos pero no lo es para monocitos y linfocitos T activados
Tgfb1	El codificado es una proteína multifuncional que controla la proliferación y diferenciación celular de muchos tipos celulares
Fcgr2b	La proteína codificada también denominada Cd32 es un receptor de baja afinidad para la fracción Fc de las gamma inmunoglobulinas
Fcgr1	La proteína codificada también denominada CD64 es un receptor de alta afinidad para la fracción Fc de las gamma inmunoglobulinas; tiene funciones tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa

Cd14	El codificado es un antígeno de superficie expresado preferentemente por monocitos/macrófagos, éste coopera junto con otras proteínas para mediar la respuesta inmune innata ante LPS bacterianos
Fcgr3	La proteína codificada también denominada CD16 es un receptor de baja afinidad para la fracción Fc de las gamma inmunoglobulinas, inicia la respuesta celular en contra de antígenos solubles y antígenos opsonizados
Il10	La proteína codificada es una citocina producida principalmente por monocitos y en menor grado por linfocitos
Il4	La citocina codificada participa en procesos de activación de células B, induce la expresión de moléculas del MHC-II en células B y regula la expresión del receptor de Fc de baja afinidad para IgE (CD23) en linfocitos y monocitos
Ccl1	El codificado es una citocina con propiedades quimioatrayentes en monocitos
Sphk1	Cataliza la fosforilación de esfingosina para formar un mediador intra y extracelular
Tnfsf14	El codificado también denominado LIGHT esta involucrado en procesos de activación de NF-κB y estimula la proliferación de células T
Ccl2	El codificado es un factor quimiotáctico capaz de atraer monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos
Ccl12	El codificado también denominado MCP-5 (Monocyte Chemotactic Protein-5) es capaz de atraer monocitos, eosinófilos y linfocitos a las zonas de inflamación
Ccr1	El codificado es un receptor para las citocinas tipo C-C; después de unir las se ocasiona la transducción de señales que deriva en el aumento intracelular de iones de calcio
Ccr2	El codificado es un receptor de las quimiocinas MCP-1, MCP-3 y MPC-4; las que ocasionan la transducción de señales que desemboca en un aumento intracelular de calcio
Cd80	El codificado es una proteína coestimuladora esencial en la activación y proliferación de células T; además de la producción de citocinas
Il23a	El codificado es una subunidad que al unirse con Il-12β forma la IL-23, una citocina heterodimérica con funciones en la respuesta inmune innata y adaptativa
H2-DMb1	El codificado participa en el procesamiento y presentación de antígenos vía MHC-II
H2-M3	El codificado participa en el procesamiento y presentación de antígenos vía MHC-II
Il1rap	El codificado es una proteína accesoria del receptor de IL-1 (el receptor es un complejo junto con Il1r1), éste receptor es el encargado de iniciar los eventos de señalización que resulta en la activación de genes como respuesta a IL-1
Itgal	El codificado también denominado CD11a es una integrina involucrada en interacciones leucocitos-células endoteliales, citotoxicidad mediada por células T y citotoxicidad mediada por anticuerpos en granulocitos y monocitos
Icam1	El codificado también denominado CD54 es un glicoproteína de superficie que funciona como ligando de la proteína de adhesión de leucocitos LFA-1
Tnfrsf5	La proteína codificada también denominada CD40 es un receptor de la superfamilia de las TNF, es esencial en mediar un amplia variedad de respuestas inmunes e inflamatorias
Bcl6	Codifica la proteína BCL6 que actúa como un represor de la transcripción específico a una secuencia en los genes y ha demostrado modular la transcripción de células B ante el estímulo de IL-4
Myd88	Codifica la proteína MYD88 que es una adaptadora involucrada con TLR's y la ruta de señalización de IL-1 en la respuesta inmune innata ocasiona la activación de NF-κ-B y la secreción de citocinas en la respuesta inflamatoria
Cd84	Codifica para una proteína que incrementa la respuesta proliferativa de linfocitos T activados e incrementa la secreción de IFN-γ en linfocitos
Cd4	Codifica la también denominada Ly-4 que es un transductor de señales cuya tarea es la de iniciar o aumentar la fase temprana de activación en células T
C1qr1	Codifica la denominada CD93 que es el receptor del complemento C1q para la fagocitosis; podría actuar como mediador de la fagocitosis en monocitos y macrófagos
Cd1d1	También denominada CD1d o Ly-38 está involucrado en la presentación de antígenos,

	sus ligandos son antígenos lipídicos y glicolipídicos
Ccl25	Codifica para una citocina que se cree juega un rol en el desarrollo de células T, la proteína recombinante muestra función quimiotáctica en macrófagos, timocitos y células dendríticas
Cx3cr1	Codifica para el receptor 1 de la quimiocina CX3C también denominada receptor de fractalina; su expresión en monocitos juega un rol principal en su sobrevivencia
Cxcr4	Codifica la denominada CD184 o fusina, proteína con una potente función quimiotáctica
Il2	La citocina codificada actúa como un factor de proliferación de linfocitos T y B, es crucial en la regulación de la respuesta inmune y capaz de estimular linfocitos B, monocitos y NK's
F3	Codifica para una proteína también denominada CD142, tromboplastina o factor de coagulación III. Por ser una proteína relacionada con la familia de receptores de citocinas clase II, esta puede jugar un rol en la angiogénesis y apoptosis
Gp9	Codifica la glicoproteína de membrana también denominada CD42a o glicoproteína de plaquetas; que ocasiona la adhesión de plaquetas
Spn	Codifica para la sialoglicoproteína también denominada Cd43, sialoporina o leucosialina. Ésta forma parte del complejo ligando-receptor involucrado en la activación de linfocitos T
Ly75	El codificado también conocido como CD205 funciona como un receptor endocítico para la captura directa de antígenos extracelulares, también causa una reducida proliferación de células B
Pigo	El codificado resultante es una proteína que ayuda en el proceso de anclaje de proteínas en la membrana celular
Il9	La interleucina codificada actúa como un estimulador de la proliferación celular además de prevenir la apoptosis
Pign	El codificado resultante es una proteína que ayuda en el proceso de anclaje de proteínas en la membrana celular
Ly78	El codificado también denominado CD180 es una proteína de membrana que forma complejos que son capaces de identificar ciertos patógenos
Il5	La interleucina codificada actúa como un factor de crecimiento y diferenciación tanto para células B como para eosinófilos
Clecsf13	
Bin1	La proteína codificada podría estar involucrada en la regulación de vesículas endocíticas, podría tener funciones de supresión de tumores y transformación maligna de células
Dnm2	La proteína codificada está involucrada en procesos de tráfico de vesículas, en particular de vesículas endocíticas
Pscd2	
Clecsf5	El codificado regula la respuesta inflamatoria
Sybl1	La proteína codificada se encuentra involucrada en la fusión de vesículas de transporte durante la movilización de proteínas desde los endosomas tempranos hasta los lisosomas
Npc2	La proteína codificada está involucrada en el transporte de lípidos en las células
Cd72	La proteína está involucrada en la proliferación y diferenciación de células B
Ifit3	El codificado es una proteína que sirve de mediador ante las señales ocasionadas por interferón
Ppie	
Scye1	La proteína codificada es una citocina específicamente inducida por la apoptosis, está involucrada en el control de la angiogénesis, la inflamación y la reparación de heridas
Procr	El codificado es un receptor capaz de unir a la proteína C activada, jugando un papel en la regulación del proceso de coagulación sanguínea
Sh3d1B	Codifica para una proteína adaptadora que podría ser la unión entre el tráfico de membrana durante la endocitosis y la maquinaria de ensamblaje de actina
Ifit1	

Ifit2	
Ppib	Codifica para una enzima que acelera el plegamiento de las proteínas
Cxcl2	La citocina codificada también denominada proteína 2 α inflamatoria de macrófagos (MIP-2 α) es principalmente producida por monocitos activados y macrófagos actuando como quimiocina
Oasl2	El codificado presenta actividad enzimática funcionando como una 2'-5'-oligoadenilato sintasa
Lgals3	El codificado tiene un papel importante en numerosos procesos celulares como la apoptosis, la inmunidad innata, la adhesión y la regulación de células T
2610020 N02Rik	
Cstb	El codificado es una proteína con múltiples secuencias parecidas a la cistatina, se cree que esta proteína actúa como un protector ante las proteasas que puedan fugarse de los lisosomas
Il3	La codificado es una citocina con una potente capacidad de promover el crecimiento de un amplio rango de células hematopoyéticas además de estar involucrada en procesos de diferenciación y apoptosis
Cst7	El codificado podría tener un papel en la regulación a través de la inhibición de un único blanco en el sistema hematopoyético
C1r	El codificado es una proteasa que se involucra en la cascada de reacciones que activa el complemento por la vía clásica
H2-M10.1	
Cxcl1	El codificado es una quimiocina de la subfamilia CXC, y juega un rol en la respuesta inflamatoria al atraer neutrófilos
Rgs1	El codificado inhibe la transducción de señales. Además podría estar involucrada en la regulación de la proliferación y activación de células B
Il18bp	La isoforma A del codificado es capaz de unir a IL-18 inhibiendo su actividad, funciona como un inhibidor temprano de la respuesta de Th1 a citocinas
Aif1	Gen inducido por interleucinas e interferón, su codificado juega un papel de regulador negativo del crecimiento vascular, contribuyendo a la respuesta anti-inflamatoria. Podría regular la activación de macrófagos
Arpc3	
Becn1	El codificado juega un rol central en la autofagia
Il1f6	
Gsr	El codificado es una enzima que juega un papel central ante la defensa antioxidante celular generando productos (GSH) que tienen el mencionado efecto
Coro1a	El codificado funciona en el proceso de evaginación de grandes fragmentos de membrana plasmática y en el proceso de formación de protrusiones de la membrana durante el proceso de locomoción
Siva	El codificado es una proteína que induce la apoptosis mediada por CD27, inhibe la activación de NF- κ -B y promueve la apoptosis mediada por el receptor de células T
Tnfrsf13b	El codificado está involucrado en la estimulación de células B y T, además de regular la inmunidad humoral
Rnase4	
F2rl3	El receptor codificado ayuda a mantener la agregación plaquetaria durante la exposición prolongada a trombina
Tnfsf4	El codificado co-estimula la proliferación de células T y la producción de citocinas
Samhd1	El codificado es una nucleasa involucrada en la respuesta inmune innata, podría jugar un papel mediando la regulación de la respuesta pro inflamatoria iniciada por TNF- α
H2-M9	
Il7	La proteína codificada es una citocina importante en el desarrollo de células B y T (estimulación de progenitores linfoides)
Il22	El codificado es una citocina que contribuye a la respuesta inflamatoria
Anxa5	La proteína codificada pertenece a la familia de las anexinas, involucradas en procesos de exocitosis y endocitosis; además podría tener un papel en la

	transducción de señales en la célula, inflamación, crecimiento e inflamación
Cxcl5	El codificado es un factor quimiotáctico para neutrófilos y granulocitos
Gbp3	La proteína codificada juega un papel en la respuesta celular ante IFN- β e IFN- γ ; además de tener un papel en la respuesta de defensa ante protozoarios y bacterias G+
Icosl	La proteína codificada actúa como una señal coestimuladora para la proliferación y producción de citocinas por parte de células T, como estimulador de la proliferación de células B y su diferenciación a células plasmáticas
Fpr1	El codificado es un receptor involucrado en la respuesta anti bacterial e inflamación. Además de actuar como mediador en la inducción de quimiotaxis de neutrófilos, la producción de ROS y estimulación de la degranulación de neutrófilos
Ccr4	El codificado es un receptor de alta afinidad para las citocinas tipo C-C. Puede funcionar como un receptor quimioatrayente para el proceso de diapédesis en células T
Ly9	El codificado es una proteína que forma parte de la familia de receptores inmuno moduladores; podría participar en reacciones de adhesión entre linfocitos T y células accesorias a través de reacciones hemofilicas
Ebag9	El codificado podría participar en la proliferación celular e inducir la apoptosis a través de la activación de una enzima convertidora de la interleucina 1- β
Zfp297	
Blnk	La proteína codificada podría tener un papel importante en la apoptosis de células B inducida por el receptor de células B (BCR)
Cxcr3	El codificado es un receptor acoplado a una proteína G que es capaz de unir a 3 quimiocinas (CXCL9, CXCL10 y CXCL11); la unión ocasiona la activación de integrinas, cambios en el citoesqueleto y migración quimiotáctica
Fpr1	El codificado es un receptor acoplado a una proteína G en células fagocíticas de mamíferos, es capaz de mediar la respuesta fagocítica de las células en respuesta a la invasión por microorganismos
Indo	El codificado es una hemoenzima, se piensa que además juega un papel en una variedad de procesos patofisiológicos tales como defensa antitumoral, antimicrobial, inmunorregulación y actividades antioxidantes
Ccl6	El codificado es una citocina perteneciente a las quimiocinas C-C únicamente identificada en ratones; está involucrado en procesos de quimiotaxis
Ifi30	El codificado es una tiol reductasa lisosomal que puede reducir los puentes bisulfuro en las proteínas, juega un papel importante en el proceso de procesamiento de antígenos
Pbef1	El codificado es una enzima que cataliza la condensación de nicotinamida con 5-fosforribosil-1-pirofosfato para formar un intermediario de la biosíntesis de NAD
AI595338	El codificado es una proteína que une a GTP, GDP y GMP, tiene un papel en la respuesta celular ante IFN- β e IFN- γ ; además de participar en la respuesta en contra de protozoos y bacterias G+
Ranbp1	El codificado incrementa la hidrólisis de GTP, podría actuar en la señalización intracelular que controla la progresión en el ciclo celular
Anxa7	El codificado es una proteína cuya función es la de promover la fusión de membrana además de estar involucrada en la exocitosis
Cxcl13	La proteína codificada es un quimioatrayente para linfocitos B (no así para linfocitos T, monocitos o neutrófilos)
Tlr2	El receptor codificado coopera con Ly96 en mediar la respuesta inmune innata ante lipoproteínas bacteriales, coopera con TLR1 para mediar la respuesta inmune ante lipopolipéptidos y lipoproteínas
Cxcl4	La proteína codificada es un quimiotáctico para neutrófilos y monocitos además de inhibir la proliferación celular endotelial
Il1rn	La proteína codificada es capaz de inhibir la actividad de la IL-1 α e IL-1 β al unirse al receptor IL1R1; además modula una variedad de respuestas inflamatorias relacionadas con la IL-1

Anxa11	El codificado es una proteína perteneciente a la familia de las anexinas, es requerida para la formación del cuerpo medio y para completar la fase final de la citoquinésis
Il15	La citocina codificada regula la activación y proliferación de células T y NK's, comparte actividades biológicas con la IL-2
Anxa4	El codificado es una proteína de la familia de las anexinas, su función es la de promover la fusión de membrana además de estar involucrada en la exocitosis
C3	La proteína codificada juega un papel central en el proceso de activación del complemento, tanto por la vía clásica como por la alternativa
Pfc	La proteína codificada es un regulador positivo de la activación alternativa del complemento, une y estabiliza el complejo enzimático formado por C3 y C5 (convertasa)
Crry	El codificado participa en la activación del complemento por la vía clásica
Clecsf8	El codificado funciona como un receptor endocítico, podría estar involucrada en la captura de antígenos en el sitio de infección y en la posterior presentación de antígenos ante células T
Lst1	El codificado participa en la regulación negativa de la proliferación de linfocitos
Ebi3	El codificado es una citocina con propiedades anti-inflamatorias e inflamatorias, regula el desarrollo de células, suprime la proliferación de células T, estimula la actividad de células Tc e induce el cambio de isotipo en células B
Prdx1	El codificado está involucrado en la regulación Redox celular, podría participar en la cascada de señalización de factores de crecimiento y TNF- α a través de la regulación de las cantidades intracelulares de peróxido de hidrógeno
Sepr1	
Adrm1	El codificado regula la diferenciación de células T en el timo, regula positivamente la señalización del receptor de hormonas de crecimiento
Tnfrsf1b	El codificado es un miembro de la superfamilia de receptores 1B del factor de necrosis tumoral, este receptor es un mediador de casi todos los efectos que TNF- α
C1qc	El codificado es una proteína (C1q) que se une a la pro enzimas C1r y C1s para generar C1 (el primer componente sérico del sistema de complemento)
Trem1	El codificado es una proteína que estimula la respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y monocitos, amplifica la respuesta inflamatoria ocasionada por infecciones bacterianas y fúngicas
Psme1	El codificado está implicado en el ensamblado del inmunoproteasoma además de ser requerido para la eficiente presentación de antígenos
Loxl3	El codificado tiene actividad de receptor scavenger que es capaz de mediar la endocitosis
Fcamr	El codificado actúa como receptor de alta afinidad para la fracción Fc de IgA e IgM y mediador de la endocitosis de éstos; podría funcionar en la respuesta inmune ante microorganismos previamente marcados de Iga's o IgM's
Ifngr	El codificado es el ligando para la cadena alfa del receptor de IFN
Tnfsf13b	El codificado es una citocina que se tiene un papel en la estimulación de células B y T además de regular la inmunidad humoral
Ccl7	El codificado es un factor quimiotáctico para monocitos y eosinófilos, y aumenta la actividad antitumoral de los monocitos
Lcp2	La proteína codificada está involucrada en la señalización mediada por el receptor de antígenos de células T
Socs6	El codificado es una proteína miembro de la familia de proteínas SOCS que forman parte del clásico sistema de retroalimentación negativa en la transducción de señales de citocinas
Nmi	El codificado podría estar involucrada en el aumento del reclutamiento de proteínas coactivadoras
Csf1	El codificado también denominado MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) es una citocina que controla la producción, diferenciación y función de macrófagos; además de promover la liberación de citocinas pro-inflamatorias
Tnfsf13	El codificado es una citocina que une a TNFRSF13B/TACI y a TNFRSF17/BCMA;

	podría estar implicado en el crecimiento celular tumoral y en procesos inmunológicos en donde los monocitos-macrófagos son mediadores
Ifna11	La proteína codificada es producida por macrófagos y tiene actividad antiviral además de estimular la producción de 2 enzimas: la proteincinasa y la oligoadenilato sintetasa
Ifna7	La proteína codificada tiene actividad antiviral y actividad de citocina
Ifnab	La proteína codificada tiene actividad antiviral y actividad de citocina
Ifnb	La proteína codificada tiene actividad antiviral, antibacterial y anti cáncer; además posee actividad de citocina
Csf3r	El codificado es una citocina capaz de controlar la producción, diferenciación y función de granulocitos
Tapbp	El codificado está involucrado en el proceso de cargado de péptidos en el MHC-I además de participar en el proceso de asociación de MHC-I con TAP
H2-Ab1	El codificado es una proteína que interviene en el procesamiento y presentación de antígenos; además actúa regulando positivamente la activación de células T
Mup3	
Fcgrt	El codificado es un receptor que une la fracción Fc de las inmunoglobulinas monoméricas G
Ifitm2	El codificado está involucrado en el proceso de defensa ante virus al inhibir los pasos tempranos de replicación, además induce el arresto del ciclo celular para dar lugar a la apoptosis
Mr1	El codificado tiene la función de presentar antígenos, está involucrado en el desarrollo y expansión de una pequeña población de células T que expresan MAIT (Mucosal-Associated Invariant T-cells)
Smyd2	
Pilra	El codificado es un receptor que se involucra en la regulación del sistema inmune, se cree que actúa como un receptor inhibidor de señales al reclutar fosfatasa citoplasmáticas
Trem2	El codificado forma un complejo de señalización con TYROBP que dispara la activación de la respuesta inmune en macrófagos y células dendríticas, además podría tener un papel en la inflamación crónica
Pirb	El codificado juega un papel en la inmunidad mediada por células B y en la ruta de señalización mediada por citocinas
Pirb	El codificado es un mediador en la respuesta inmune mediada por células B, en la homeostasis de células B así como en las rutas de señalización mediadas por citocinas
Gp49b	El codificado es una proteína con actividad de receptor (Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4)
Tnfsf13	El codificado es una citocina que une a TNFRSF13B y a TNFRSF17; podría estar implicado en la regulación del crecimiento de células tumorales y en procesos inmunológicos en los que los monocitos-macrófagos son mediadores
Nexn	El codificado está involucrado en la regulación de la migración celular a través de su asociación con la actina del citoesqueleto
Bpil1	El codificado tiene la capacidad de unir lípidos
Siglec5	El codificado tiene la capacidad de unir azúcares (monosacáridos)
Tirap	El codificado es un adaptador que tiene un papel en las vías de señalización de TLR2 y TLR4 en la respuesta inmune innata. Regula positivamente la producción de TNF- α y de IL-6
Mox2r	El codificado tiene actividad de receptor capaz de unir proteínas
Slamf8	El codificado podría tener un papel de modulador del linaje de células B a través de la señalización del receptor de células B
Tlr7	El receptor codificado es una pieza importante en el sistema inmune innato y adaptativo. Actúa vía MYD88 y TRAF6 ocasionando la liberación de citocinas pro-inflamatorias
Igsf6	
Lair1	La proteína codificada funciona como un receptor constitutivo que inhibe la función

	citólítica de células NK, células T y células B; modula la producción de citocinas de células T CD4+
Mamdc2	
Def6	El codificado tiene un papel en el desarrollo y/o activación de linfocitos Th2 tal vez interfiriendo en la señalización de ZAP70
Slamf7	La isoforma 1 del codificado es un mediador de la activación de células NK y podría jugar en papel en la adhesión de linfocitos
H2-D1	El codificado participa en el procesamiento y presentación de antígenos vía MHC-I, regula positivamente la citotoxicidad de linfocitos T
Smyd3	El codificado actúa como metil transferasa de histonas, juega un papel importante en la activación de la transcripción
Orm2	El codificado aparentemente modula la actividad del sistema inmune durante la reacción en fase aguda
H2-Q7	El codificado participa en el procesamiento y presentación de antígenos vía MHC-I
Ifitm3	El codificado es una proteína transmembranal que regula negativamente la proliferación celular
Serpina3m	El codificado participa en el proceso de apoptosis y participa en la respuesta ante estímulos ocasionados por citocinas
Saa3	El codificado participa en la respuesta de reacciones de fase aguda
Saa1	El codificado participa en la respuesta de reacciones de fase aguda, en la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos; además de la regular positivamente la secreción de citocinas
Klra12	
Igsf7	El codificado tiene funciones de receptor y regula positivamente la secreción de citocinas
Lyzs	El codificado actúa como una lisosima que participa en el proceso de defensa ante bacterias G+ y G-
H2-T22	
C2	El codificado es una glicoproteína que es parte de la vía clásica de activación del complemento (respuesta inmune innata)
C4	El codificado es la forma ácida de C4, que es parte de la vía clásica de activación del complemento (respuesta inmune innata)
Ms4a4c	
Ms4a6b	
Tlr8	El codificado es un receptor clave en la respuesta inmune innata capaz de unir DNA, cadenas dobles de RNA, cadenas sencillas de RNA, regula positivamente la síntesis de IFN- α , IFN- β , IFN- γ e IL-8
Tlr3	El receptor codificado es un componente en la respuesta inmune adaptativa e innata; es un sensor de nucleótidos que es activado por cadenas dobles de RNA como consecuencia de una infección viral
AI595338	El codificado es una proteína producida como respuesta a IFN- γ e IFN- β ; por lo que es parte de la respuesta inmune ante bacterias G+ y protozoarios
Ifi1	El codificado es una GTPasa que resulta importante en la respuesta inmune innata, se cree que podría regular la producción de citocinas pro-inflamatorias y participar en procesos de adhesión y movilidad en macrófagos
Cd163	El codificado es un receptor que se involucra en la endocitosis de hemoglobina/haptoglobina, su forma soluble podría tener un comportamiento anti-inflamatorio
Fgl2	El codificado podría tener un papel en el desempeño de las funciones fisiológicas de linfocitos en la mucosa
Birc1e	
Msr2	El codificado posee actividad de receptor
Socs3	El codificado es miembro de una familia de proteínas que por retroalimentación negativa regulan la transducción de señales ocasionada por las citocinas; regula el inicio y mantenimiento de la respuesta alérgica mediada por células T tipo 2

Il12rb1	El codificado es el receptor de baja afinidad para IL-12; al asociarse con IL12RB2 forma un receptor funcional y de alta afinidad para IL-12, al asociarse con IL23R forma el receptor de IL-23
Il12rb2	El codificado es una subunidad del receptor de IL-12; al asociarse con IL12RB1 forma un receptor funcional y de alta afinidad para IL-12
Slc11a2	El codificado es importante en el transporte de metales, en particular de hierro. También puede transportar manganeso, cobalto, cadmio, níquel, vanadio y plomo.
Maea	El codificado juega un papel en la maduración de macrófagos, funciona como mediador de la unión de células elitroides con macrófagos maduros. Al asociarse con F-actina regula la distribución de actina en eritroblastos y macrófagos
Zbp1	El codificado es la proteína 1 de unión a Z-DNA; podría jugar un papel en la defensa en contra de tumores and patógenos.
Clec12b	El codificado es un receptor celular de superficie que protege células blanco de la lisis celular mediada por células NK's
Lcp1	El codificado es una proteína de unión a actina, juega un papel en la activación de células T en respuesta a la costimulation a través de TCR/CD3 y CD2 o CD28
Clec10a	El codificado podría participar en la interacción entre macrófagos tumoricidas y células tumorales
Stat6	El codificado es un transductor de señales y activador de la transcripción inducida por la IL-4
Mif	El codificado es una citocina pro inflamatoria involucrada en la respuesta inmune innata ante patógenos bacterianos. La expresión de MIF regula la función de los macrófagos durante la respuesta del hospedero
Cd209a	El codificado es un probable receptor de reconocimiento de patógenos, podría mediar la endocitosis de patógenos que posteriormente son degradados en compartimientos lisosomales
Stat4	El codificado es un transductor de señales y activador de la transcripción inducida por TNF-a
Ptx3	El codificado juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune innata y en el proceso de inflamatorio
Vtcn1	El codificado regula negativamente la respuesta inmune mediada por linfocitos al inhibir la activación, proliferación, producción de citocinas y citotoxicidad de los mismos
Cxcl16	El codificado actúa como un receptor tipo Scavenger en macrófagos especializado en unir lipoproteínas de baja densidad oxidadas

APENDICE B

Listado de claves GO y sus correspondientes ontologías.

Accession	Ontology
GO:0001678	Cellular glucose homeostasis
GO:0001788	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
GO:0001798	Positive regulation of type IIa hypersensitivity
GO:0001805	Positive regulation of type III hypersensitivity
GO:0001812	Positive regulation of type I hypersensitivity
GO:0001916	Positive regulation of T cell mediated cytotoxicity
GO:0002224	Toll-like receptor signaling pathway
GO:0002548	Monocyte chemotaxis
GO:0002638	Negative regulation of immunoglobulin production
GO:0002829	Negative regulation of type 2 immune response
GO:0002862	Negative regulation of inflammatory response to antigenic stimulus
GO:0002865	Negative regulation of acute inflammatory response to antigenic stimulus
GO:0006355	Regulation of transcription DNA-dependent
GO:0006506	GPI anchor biosynthetic process
GO:0006508	Proteolysis
GO:0006910	Phagocytosis, recognition
GO:0006935	Chemotaxis
GO:0006953	Acute-phase response
GO:0006954	Inflammatory response
GO:0006955	Immune response
GO:0006956	Complement activation
GO:0007010	Cytoskeleton organization
GO:0007155	Cell adhesion
GO:0007162	Negative regulation of cell adhesion
GO:0007165	Signal transduction
GO:0008285	Negative regulation of cell proliferation
GO:0009968	Negative regulation of signal transduction
GO:0010818	T cell chemotaxis
GO:0016064	Immunoglobulin mediated immune response
GO:0019221	Cytokine-mediated signaling pathway
GO:0019722	Calcium-mediated signaling
GO:0019882	Antigen processing and presentation
GO:0030183	B cell differentiation
GO:0030308	Negative regulation of cell growth
GO:0030334	Regulation of cell migration
GO:0030593	Neutrophil chemotaxis
GO:0030833	Regulation of actin filament polymerization
GO:0030889	Negative regulation of B cell proliferation
GO:0030890	Negative regulation of nucleotide biosynthetic process
GO:0031295	T cell costimulation
GO:0032693	Negative regulation of interleukin 10 production
GO:0032725	Positive regulation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor production
GO:0032735	Positive regulation of interleukin 12 production
GO:0032755	Positive regulation of interleukin 6 production
GO:0032760	Positive regulation of tumor necrosis factor production
GO:0033209	Tumor necrosis factor-mediated signaling pathway

GO:0034097	Response to cytokine stimulus
GO:0035313	Wound healing, spreading of epidermal cells
GO:0035556	Intracellular signal transduction
GO:0038094	Fc-gamma receptor signaling pathway
GO:0040008	Regulation of growth
GO:0042092	Type 2 immune response
GO:0042102	Positive regulation of T cell proliferation
GO:0042104	Positive regulation of activated T cell proliferation
GO:0042535	Positive regulation of tumor necrosis factor biosynthetic process
GO:0043032	Positive regulation of macrophage activation
GO:0043066	Negative regulation of apoptotic process
GO:0043380	Regulation of memory T cell differentiation
GO:0045078	Positive regulation of interferon-gamma biosynthetic process
GO:0045087	Innate immune response
GO:0045089	Positive regulation of innate immune response
GO:0045410	Positive regulation of interleukin 6 biosynthetic process
GO:0045429	Positive regulation of nitric oxide biosynthetic process
GO:0045576	Mast cell activation
GO:0045629	Negative regulation of T-helper 2 cell differentiation
GO:0045807	Positive regulation of endocytosis
GO:0046426	Negative regulation of JAK-STAT cascade
GO:0048245	Eosinophil chemotaxis
GO:0048246	Macrophage chemotaxis
GO:0048247	Lymphocyte chemotaxis
GO:0050715	Positive regulation of cytokine secretion
GO:0050728	Negative regulation of inflammatory response
GO:0050766	Positive regulation of phagocytosis
GO:0050777	Negative regulation of immune response
GO:0050868	Negative regulation of T cell activation
GO:0051045	Negative regulation of membrane protein ectodomain proteolysis
GO:0051770	Positive regulation of nitric-oxide synthase biosynthetic process
GO:0060054	Positive regulation of epithelial cell proliferation involved in wound healing
GO:0070098	Chemokine-mediated signaling pathway
GO:2000503	Positive regulation of natural killer cell chemotaxis