



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**PAPEL DE LA MOLÉCULA STAT-1 EN LA RESPUESTA
INMUNE Y RESISTENCIA A LA INFECCIÓN CON
*Taenia crassiceps***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

QFB. MIREYA BECERRA DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés (FES-Iztacala)

Comité tutor:

Dr. Julio César Carrero Sánchez (IIB)

Dr. Jorge Morales Montor (IIB)

MÉXICO, D. F., FEBRERO, 2015



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.

Este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunoparasitología (L8) de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la FES Iztacala.

Durante la realización de este trabajo la alumna fue apoyada por una beca por parte de CONACyT. Número de becario 295983.

Para la escritura de esta Tesis se contó con el apoyo de la Beca para Tesis de Posgrado de COMECyT, con el No. de Folio 14BTD0060.

Proyecto CONACyT 167799.

Proyecto PAPIIT-UNAM IN213512

ÍNDICE

ABREVIATURAS	01
RESUMEN	03
ABSTRACT	05
GENERALIDADES	07
REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR HELMINTOS	07
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR <i>Taenia crassiceps</i>	08
CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS Y MONOCITOS PRO Y ANTI INFLAMATORIOS	10
LOS MACRÓFAGOS	13
Características de los caM ϕ y aaM ϕ	14
LAS PROTEÍNAS DE LA VÍA JAK/STAT	16
La familia JAK	16
La familia STAT	18
SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA JAK/STAT	20
STAT1 y JAK 1/2 en respuesta a IFN- γ	20
MECANISMOS REGULADORES DE LA VÍA JAK/STAT	22
Regulación mediada por proteínas SOCS	22
Regulación mediada por proteín-tirosín fosfatasas SHP-1 y SHP-2	23
Regulación de la vía JAK/STAT por proteínas PIAS	23
ALTERACIONES DE LA VÍA STAT1-JAK1/2 EN INFECCIONES CON PARÁSITOS	24
<i>Leishmania donovani</i>	24
<i>Leishmania major</i> y <i>Leishmania mexicana</i>	25
<i>Toxoplasma gondii</i>	25
INFECCIONES PARASITARIAS EN ANIMALES DEFICIENTES DE STAT1	26
La deficiencia de STAT1 en la infección por <i>L. donovani</i> y <i>L. major</i>	26
La deficiencia de STAT1 en la infección por <i>Toxoplasma gondii</i>	27
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
Objetivos particulares	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
RESULTADOS Y PUBLICACIONES	37
DISCUSIÓN GENERAL	67

CONCLUSIONES	76
OTRAS PUBLICACIONES	77
REFERENCIAS	89

ABREVIATURAS

Å	Angstrom
aaMφ	Macrófago alternativamente activado
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Ag	Antígeno
APC	Célula presentadora de antígeno
Arg1	Arginasa 1
caMφ	Macrófago clásicamente activado (Classical activated macrophage)
CD	Grupo de diferenciación
CFSE	Éster carboxifluoresceína succinimidilo
CIS	Cytokine-inducible SH2 domain protein
DC	Célula dendrítica
ES-62	Glicoproteína excretada/secretada de 62 KDa de <i>Acantochilonema vitae</i>
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia
Fizz1	Encontrado en zona de inflamación 1
GAS	Gamma-activated sequence
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
IP	Intraperitoneal
JAK	Jannus cinasa
KDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMR	Receptor de manosa
Mφ	Macrófago

NFKB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
PAPM	Patrón molecular asociado a patógeno
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-T	Solución amortiguadora de fosfatos - Tween
PD-L1/2	Ligando de muerte programada 1/2
PECs	Células de exudado peritoneal
PIAS	Inhibidor de la proteína STAT activada
PTK	Proteína tirosina cinasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Transcriptasa reversa – reacción en cadena de la polimerasa
S/E	Secretado/excretado
SH2	Src Homology 2
SHP-1	Fosfatasa 1 que contiene el dominio de la región de homología 2 de Src
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SSF	Solución salina fisiológica
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TcES	Productos de excreción/secretión de <i>Taenia crassiceps</i>
Th1/2	T cooperadora 1/2
TLR	Receptor tipo Toll
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
Treg	T reguladora
Tyk2	Tirosina cinasa 2
WT	Tipo silvestre
μ g	Microgramo

RESUMEN

Los helmintos parásitos son un grupo de organismos que a pesar de su heterogeneidad presentan propiedades comunes que los han llevado a obtener beneficios que facilitan su establecimiento y permanencia en los hospederos. Como la generalidad de los helmintos, *Taenia crassiceps*, el causante de la cisticercosis murina, induce en su hospedero una respuesta polarizada hacia un perfil Th2, dando lugar a una linfoproliferación inhibida a estímulos antígeno-específicos o inespecíficos. En las etapas tempranas de la infección (menor a 4 semanas) se observa una respuesta inmune Th1 con concentraciones altas de interleucina (IL) 12, Interferón gamma (IFN- γ), óxido nítrico (NO) e inmunoglobulina (Ig) G2a, que es reemplazada por una respuesta Th2 con concentraciones altas de IL-4, IL-13, IgG1 e IgE en la fase crónica de la infección (mayor a 4 semanas). El cambio hacia el perfil Th2, correlaciona con el aumento en la carga parasitaria, lo que ha sugerido una susceptibilidad asociada a esta respuesta y una posible resistencia mediada por la respuesta inmune Th1.

La respuesta Th2 parece ser inducida a través de la señalización por STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6), ya que ratones STAT6^{-/-} restringen de manera más eficiente el crecimiento de *T. crassiceps* que los STAT6^{+/+} y esta resistencia coincide con el mantenimiento de la respuesta tipo Th1 y la presencia de macrófagos clásicamente activados (caM ϕ) en la fase crónica de la enfermedad. De hecho, la susceptibilidad mediada por STAT6 se relaciona al menos parcialmente con la inhibición de la producción de NO por los M ϕ . El NO participa en la respuesta clásica de los M ϕ y su producción depende importantemente del factor de transcripción STAT1 el cual también participa en la respuesta por IFN- γ y en el desarrollo del perfil Th1. En este trabajo se analizó la participación de STAT1 en la regulación de la respuesta inmune generada por la infección con *T. crassiceps*.

Una característica importante que demuestra este trabajo, es la disminución en la capacidad de los aaM ϕ de ratones susceptibles BALB/c de infecciones crónicas con *T. crassiceps* para fosforilar STAT1 frente al estímulo con IFN- γ , mientras que la fosforilación de STAT1 en los M ϕ peritoneales de ratones C57BL/6, resistente a la infección, no se observó disminuida. Por otro lado, la exposición de M ϕ peritoneales de ratones BALB/c no infectados a los productos de excreción/secreción del parásito (TcES) logró emular la disminución de la fosforilación de STAT1. Es importante señalar que este fenómeno no se trata de una abolición generalizada de la vía JAK/STAT, ya que la activación de STAT6 en respuesta a IL-4 no fue afectada en estas mismas células. El efecto regulador de la fosforilación de STAT1 en los M ϕ de ratones

infectados crónicamente con *T. crassiceps* y en los expuestos a TcES parece estar mediado por la fosfatasa SHP-1, ya que ambos estímulos indujeron su sobreexpresión; mientras que el uso del inhibidor de fosfatasas, ortovanadato de sodio, facilitó el restablecimiento de la fosforilación de STAT1 en estos M ϕ . Lo que sugiere una modulación de la actividad de STAT1 inducida por la infección con *T. crassiceps* y sus moléculas de secreción. Este es el primer reporte en infecciones por helmintos en el que se describe esta vía de inmunomodulación. Más aún, se encontraron efectos similares en células humanas (leucocitos) que fueron expuestas *in vitro* a TcES, lo que indica que el efecto regulador de los TcES no es exclusivo del hospedero natural.

Posteriormente se determinó el papel de la molécula STAT1 *in vivo* durante la infección con *T. crassiceps*. Los datos encontrados indican que el papel de STAT1 es mucho más complejo de lo que se conoce, ya que cuando ratones STAT1^{-/-} de fondo genético BALB/c se retaron con 10 metacístodos de *T. crassiceps*, presentaron una mayor resistencia a la infección que los ratones WT, al desarrollar hasta 50% menos carga parasitaria a pesar de presentar una respuesta inmune Th1 disminuida, como se determinó por los niveles de anticuerpos específicos en circulación. Otra observación importante fue que la infección crónica con *T. crassiceps* no logró inducir completamente un perfil alternativo en los M ϕ de los ratones STAT1^{-/-}. Esto significa que, si bien los M ϕ peritoneales obtenidos de ratones STAT1^{-/-} expresaron genes asociados a la activación alternativa, como Fizz1 y Ym1, no expresaron proteínas de membrana asociadas con el perfil alternativo como PD-L1, PD-L2 y MMR, lo que sugiere una participación directa o indirecta de STAT1 en la polarización alternativa de los M ϕ . Además de las diferencias encontradas en los M ϕ , los ratones STAT1^{-/-} presentaron un reclutamiento de células mieloides diferente a los WT en las etapas muy tempranas de la infección. Mientras que en los ratones WT, *T. crassiceps* indujo de manera importante el reclutamiento de células monocíticas Ly6C⁺ en el peritoneo, en los ratones STAT1^{-/-} estas células prácticamente no se reclutaron, siendo las Ly6G⁺ (granulocitos) las que se reclutaron de manera importante. La diferencia en el reclutamiento de células inmunes innatas puede ser responsable en algún grado de la menor susceptibilidad observada en los ratones STAT1^{-/-}. Posiblemente las células Ly6C⁺, generalmente consideradas como monocitos inflamatorios, puedan dar origen a los aaM ϕ , y ante la ausencia de éstos, se incremente la resistencia a *T. crassiceps*. Nuestros datos en conjunto sugieren que STAT1 no solo es importante en el desarrollo de la respuesta Th1 y la activación clásica de los macrófagos, sino que su participación en otros procesos inmunológicos es un tema que aún falta por comprender completamente, especialmente en infecciones por helmintos.

Abstract

Helminths are a diverse group of organisms with the interesting ability to modulate the host immune system, triggering a permissive environment in their hosts that allows them to survive. As most helminths, *Taenia crassiceps*, the responsible of murine cysticercosis, induces in the host a polarized Th2 immune profile resulting in an impaired lymphocyte-proliferative response to parasitic and unrelated antigens. *T. crassiceps*-infected BALB/c mice develop an initial (less than 4 weeks) but brief Th1-like response with high concentrations of interleukin (IL) 12, Interferon gamma (IFN- γ), nitric oxide (NO) and Immunoglobulin (Ig) G2a, which is replaced by a strong Th2-biased response with high concentrations of IL-4, IL-13, IgG1 and IgE in the chronic stage of infection (after 4 weeks), accompanied with a strong recruitment of aaM ϕ . The switch to a Th2 immune response correlates with an increase in the parasite load. These observations suggest that susceptibility to *T. crassiceps* can be related to a Th2-like response while a Th1 immune response can be associated with resistance.

The Th2 immune response seems to be induced through STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6) signaling, since STAT6^{-/-} mice restrict more efficiently the development of *T. crassiceps* than STAT6^{+/+} mice, and this resistance agree with the maintenance of Th1 immune response and the presence of classically activated macrophages (caM ϕ) in the chronic stage of infection. In fact, susceptibility mediated by STAT6 is related, at least partially, with the inhibition of NO production in macrophages. Nitric oxide participates in the classic macrophage response and its production is significantly STAT1-dependent. STAT1 also participates in the response to IFN- γ and in the development of the Th1 immune prolife. In this work the participation of STAT1 in the regulation of the immune response generated by *T. crassiceps* was analyzed.

An important feature demonstrated in this work is the diminished capacity of the aaM ϕ of susceptible BALB/c mice obtained from chronic *T. crassiceps* infection to phosphorylate STAT1 when are stimulated with IFN- γ , while STAT1 phosphorylation in C57BL/6 resistant mice was not affected. Furthermore, naive peritoneal macrophages from BALB/c mice exposed to *T. crassiceps* excreted/secreted products (TcES) displayed a significant defect in IFN- γ -mediated STAT1 phosphorylation. This effect was not due to a global inhibition of STATs activity, as macrophages from *T. crassiceps*-infected mice responded to IL-4 treatment with higher levels of STAT6 phosphorylation than macrophages from naïve mice. The regulatory effect on STAT1 phosphorylation in macrophages from chronically *T. crassiceps*

infected mice and in the macrophages exposed to TcES, seems to be mediated by the phosphatase SHP-1 since both stimuli induced SHP-1 overexpression and the usage of the phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate, facilitated the recovery of STAT1 phosphorylation in this macrophages; suggesting a modulation in the activity of STAT1 induced by the infection with *T. crassiceps* or its excretory/secretory molecules. This is the first report showing that a helminth infection or helminth-derived products are able to inhibit IFN- γ signaling in macrophages by blocking STAT1 phosphorylation. Importantly, peripheral blood mononuclear (PBMC) from healthy individuals exposed *in vitro* to TcES were also susceptible to the TcES-induced down-regulation of STAT1 phosphorylation, indicating that the regulatory effect of TcES is not unique to natural host.

Afterward the role of STAT1 *in vivo* during *T. crassiceps* infection was determined. The data found indicate that the role of STAT1 is far more complex than what is known, as STAT1^{-/-} mice in a BALB/c genetic background were challenged with 10 *T. crassiceps* metacestodes, displayed a greater resistance to infection than WT mice, developing up to 50% less parasite burden despite having a diminished Th1 immune response, as determined by the levels of specific antibodies in circulation. Another important observation was that chronic infection with *T. crassiceps* failed to induce a completely alternative profile in M ϕ from STAT1^{-/-} mice. Which means that while peritoneal M ϕ obtained from STAT1^{-/-} mice did express genes associated with alternative activation, such as FIZZ1 and Ym1, they did not express membrane proteins associated with the alternate profile such as PD-L1, PD-L2 and MMR, suggesting a direct or indirect participation of STAT1 in alternative macrophages polarization. In addition to the differences found in the M ϕ , STAT1^{-/-} mice showed different myeloid cell recruitment compared with WT mice in the very early stages of infection. While in WT mice, *T. crassiceps* induced a significantly monocytic Ly6C⁺ recruitment in the peritoneum, in STAT1^{-/-} mice these cells were almost absent, while the Ly6G⁺ cells (granulocytes) were significantly recruited. The difference in the recruitment of innate immune cells may be responsible of the reduced susceptibility observed in STAT1^{-/-} mice. Possibly Ly6C⁺ cells, generally regarded as inflammatory monocytes, may give rise to aaM ϕ , and in the absence of these cells, resistance to *T. crassiceps* is increased. Our data suggest that STAT1 is not only important in the development of the Th1 response and classical activation of macrophages, but its participation in other immunological processes is an issue that remains to be fully understood, especially in helminth infections.

GENERALIDADES

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR HELMINTOS.

Los helmintos parásitos son un grupo de organismos multicelulares capaces de vivir por décadas dentro de su hospedero humano (Maizels and Yazdanbakhsh 2003). Presentan gran importancia clínica ya que afectan a más de dos billones de personas alrededor del mundo, y son responsables de importantes problemas de salud y morbilidad (Maizels and Yazdanbakhsh 2003). Estos parásitos presentan diferentes características morfológicas entre los diversos grupos que lo conforman que son los cestodos o gusanos planos, gusanos cilíndricos o nematodos y los tremátodos (Loverde et al. 2002).

A pesar de tratarse de un grupo heterogéneo, éstos parásitos comparten características importantes como la modulación que ejercen sobre el sistema inmune de sus hospederos, dirigiéndolo a un estado permisivo (Maizels et al. 2004). Gracias a la inmunomodulación, los parásitos helmintos logran permanecer más tiempo en sus hospederos. Esto se relaciona con la polarización de la respuesta inmune (RI) hacia un perfil Th2, que se ha caracterizado por presentar altas concentraciones de citocinas como IL-4, IL-13, IL-5 y anticuerpos de los isotipos IgE, IgG1 e IgG4 (Pearce and Reiner 1995).

Sin embargo, esta polarización hacia el perfil Th2 trae entre sus consecuencias un estado hipo-responsivo en los linfocitos que se ha observado de manera consistente y que se manifiesta por la reducción en la respuesta proliferativa frente a estímulos con antígenos relacionados o no relacionados al parásito o a estímulos policlonales (King et al. 1992). La inhibición de la RI se evidencia por la presencia de poblaciones celulares supresoras como las células T reguladoras (Tregs) y macrófagos alternativamente activados (aaM ϕ). La presencia de estas poblaciones y el papel que desempeñan no son las mismas en todas las infecciones por helmintos ya que los aaM ϕ se han visto involucrados en la resolución de la infección por *Nippostrongylus brasiliensis*, mientras que en la infección por *Taenia crassiceps* se han relacionado con el establecimiento del parásito (Reyes and Terrazas 2007; Urban et al. 1998). Adicionalmente, se ha descrito que las células Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) pueden ser benéficas para el hospedero y el parásito en las infecciones con *Brugia malayi*, *Schistosoma mansoni* o *Litomosoides sigmodontis* (Gillan and Devaney 2005; Taylor et al. 2009; Wilson et al. 2007).

Los mecanismos involucrados en la polarización de la respuesta inmune en las infecciones parasitarias no han sido esclarecidos por completo., Sin embargo, se sabe que algunos

antígenos de los helmintos, como el ES-62 (una glicoproteína secretada por *Acanthocheilonema viteae*), pueden inducir modificaciones en células de la RI innata, como células dendríticas y macrófagos, para activar a los linfocitos T dirigiéndolos hacia un perfil Th2 (Goodridge et al. 2004) y alterando los patrones de secreción de citocinas en células presentadoras de antígeno (APC). Lo anterior se demostró mediante la exposición previa de macrófagos peritoneales con ES62, que trajo como consecuencia un estado hiporresponsivo al lipopolisacárido (LPS), evitando la producción de IL-12, IL-6 y TNF α por parte de estas células (Goodridge et al. 2001). Los carbohidratos presentes en los antígenos solubles de *Taenia crassiceps* también han demostrado poseer efectos moduladores dirigiendo la RI hacia un perfil Th2, mientras que el antígeno excretado/secretado (TcES) de alto peso molecular es capaz de disminuir en la células dendríticas la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40, así como citocinas proinflamatorias en respuesta a LPS (Terrazas et al. 2010b).

MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR *Taenia crassiceps*.

Taenia crassiceps es un cestodo que de forma natural infecta cánidos como zorros (rojos y árticos), lobos y perros como hospederos definitivos (Loos-Frank 2000), mientras que su etapa larvaria (metacéstodo) es infectiva para roedores como ratones y marmotas (Brojer et al. 2002; Everhart et al. 2004). En los hospederos intermediarios, los metacéstodos se pueden encontrar en tejido subcutáneo, cavidades pleural y peritoneal (Shea et al. 1973) e inclusive en otros tejidos (Brojer et al. 2002; Delvalle 1989). En el ciclo de vida de *T. crassiceps*, el gusano adulto se aloja en el intestino de los hospederos definitivos (cánidos), de donde son liberados en las heces los huevos infectivos que posteriormente son ingeridos por roedores (hospederos intermediarios). En los roedores, los huevos infectivos atraviesan el epitelio intestinal, y se alojan en tejido donde se diferencian a su estado larvario o cisticerco. Los roedores infectados son ingeridos nuevamente por cánidos con lo que se cierra el ciclo. Los cisticercos (metacéstodos) pueden reproducirse a través de reproducción asexual mediante gemación. Experimentalmente, los cisticercos se recolectan y se inyectan a la cavidad peritoneal de ratones con lo que se puede mantener el parásito mediante estos pases en el laboratorio (Culbreth et al. 1972; Esch and Smyth 1976).

Debido a sus similitudes con *T. solium* y a su fácil mantenimiento en el laboratorio, *T. crassiceps* se ha utilizado como modelo de infección experimental para emular la infección de

humanos, y de manera importante ha servido para comprender diferentes fenómenos de inmunorregulación. Dentro de los aspectos que se han observado sobre la infección con *T. crassiceps* está el fenómeno de susceptibilidad asociada al sexo, donde las hembras son más susceptibles que los machos, lo que indica una participación importante de las hormonas sexuales como mediadores de resistencia y susceptibilidad (Morales-Montor et al. 2008). En cuanto a la modulación que ejerce sobre el sistema inmune se ha observado que en la etapa aguda de la infección se genera un ambiente tipo Th1 que se caracteriza por una importante producción de IFN- γ , mientras que cuando la infección llega a una etapa crónica, se observa una disminución de la respuesta Th1 y paralelamente se observa un incremento exponencial en el número de parásitos y se desarrolla una respuesta Th2, la cual se caracteriza por una alta producción de IL-4, IL-13, IL-5 y de prostaglandina E2 (PGE2) por lo que se ha relacionado a la respuesta Th2 como favorecedora en el establecimiento y desarrollo del parásito (Terrazas et al. 1998; Terrazas et al. 1999). En cuanto al perfil de anticuerpos que son inducidos por esta infección, también se ha encontrado una modulación similar, ya que en la etapa aguda se encuentran niveles altos de IgG2a y en la infección crónica el isotipo de anticuerpos en circulación cambia preferentemente a IgG1 e IgE (Rodríguez-Sosa et al. 2003). Los cambios entre las etapas aguda y crónica también son evidentes en cuanto a poblaciones celulares se refiere ya que como se ha mencionado anteriormente, en las primeras semanas de infección los macrófagos muestran una activación clásica mientras que en la infección crónica se han encontrado macrófagos que sobreexpresan moléculas como CCR5 y CD23, así como niveles altos de IL-10 y presentan expresión de genes que se asocian con un perfil de activación alternativa como Arginasa-1, Fizz1 y Ym1. Se ha demostrado que los aaM ϕ tienen la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos CD90⁺ previamente activados con anti CD3, mediante las moléculas PD-L1 y PD-L2 (Rodríguez-Sosa et al. 2002b; Terrazas et al. 2005). La asociación entre los caM ϕ con la respuesta Th1 y los aaM ϕ con la respuesta Th2 se ve apoyada por estudios hechos en ratones deficientes en las moléculas STAT4 y STAT6, que son factores de transcripción asociados a respuestas Th1 y Th2 respectivamente, donde se ha observado que la falta de respuesta Th1 y la consecuente facilitación de Th2 favorece el establecimiento del parásito, mientras que la ausencia de STAT6 se relaciona con el control de la infección (Rodríguez-Sosa et al. 2002a; Rodríguez-Sosa et al. 2004).

Otras células que se inducen por la infección con *T. crassiceps* son las células mieloides supresoras CD11b⁺/Gr1⁺. Las células son reclutadas en la cavidad peritoneal en ratones

desde las primeras horas de infección y tienen la capacidad de inhibir de manera adoptiva la capacidad de células T vírgenes de proliferar *in vitro* mediante un mecanismo contacto dependiente. Adicionalmente, Gómez-García y cols. demostraron que la inoculación en cavidad peritoneal del antígeno excretado/secretado de *T. crassiceps* (TcES) recluta esta misma población celular. Este efecto es dependiente de los carbohidratos presentes en el Ag, ya que al eliminar los azúcares utilizando metaperyodato de sodio se perdía esta función (Gomez-Garcia et al. 2005).

Las características mencionadas en los párrafos previos indican una actividad inmunosupresora de *T. crassiceps* y esta inmunosupresión tiene consecuencias importantes frente a futuras infecciones, como se observó con una posterior infección con *Leishmania major* y *Leishmania mexicana*, donde la infección previa con *T. crassiceps* favorecía un incremento en la carga parasitaria y en la severidad de las lesiones. Es muy importante mencionar que la infección previa con el helminto no indujo una inhibición en la producción de IFN- γ en ninguna de estas co-infecciones, sin embargo, los niveles de IL-12 sí se encontraron disminuidos a pesar de que los macrófagos presentaban incluso un incremento en la expresión del IFN- γ R, lo que se pudo asociar a una disminución del mensajero para la iNOS. También cabe resaltar que estos macrófagos expresaron marcadores de activación alternativa (Ym1, Arg-1 y MMR) (Rodriguez-Sosa et al. 2006). De modo que la presencia de estos aaM ϕ puede asociarse con un incremento en la susceptibilidad frente a una segunda infección con protozoarios y sugiere que estas células (tanto clásicos como alternativos) tienen en realidad un papel muy importante en la respuesta inmune que aún no termina de esclarecerse.

CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS (MDSC) Y MONOCITOS PRO Y ANTI INFLAMATORIOS

En procesos inflamatorios agudos, una de las poblaciones celulares que se reclutan rápidamente son las células mieloides CD11b⁺Gr-1⁺, a las que se les atribuye la capacidad de participar en la disminución de procesos inflamatorios (Beattie et al. 2000; Carlson et al. 1998). Estas células reciben el nombre de células mieloides supresoras (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC). Se trata de una población heterogénea que se puede llegar a diferenciar a granulocitos maduros, macrófagos y células dendríticas (Ostrand-Rosenberg and

Sinha 2009). Fueron descritas a finales de la década de los 80's en estudios realizados en pacientes con cáncer (Young et al. 1987). Algunos estudios indican que hasta un tercio de esta población puede diferenciarse en macrófagos maduros y células dendríticas tanto *in vivo* como *in vitro* ante la presencia de las citocinas adecuadas (Bronte et al. 2000; Li et al. 2004)

La actividad inmunosupresora de las células $\text{Cd11b}^+\text{Gr1}^+$ reside principalmente en su capacidad de inhibir la respuesta de células T (Gabrilovich and Nagaraj 2009) sin embargo, estas células también participan en la modulación de la respuesta inmune innata mediando la producción de citocinas en los $\text{M}\phi$ (Sinha et al. 2007). Las MDSC de ratones se caracterizan por la expresión del antígeno de diferenciación de células de linaje mielóide Gr1 y CD11b (también llamado αM -Integrina) (Kusmartsev et al. 2004) y llegan a comprender entre el 20-30% de las células de la médula ósea. Por otro lado, su presencia en bazo se limita a un 2-4% de las células y se encuentran ausentes en los nodos linfáticos. En humanos estas células se han definido comúnmente como $\text{CD14}^-\text{CD11b}^+$ y más estrictamente se ha observado que expresan el marcador mielóide común CD33 y que carecen de marcadores de células mieloides maduras y de HLA-DR (Almand et al. 2001; Ochoa et al. 2007).

En el ratón, las MDSC se pueden dividir según su expresión de Gr1 debido a que Gr1 presenta dos epítomos, Ly6G y Ly6C los cuales son codificados por genes diferentes. La identificación de estos epítomos permite la diferenciación de dos subpoblaciones de MDSC: las de fenotipo granulocítico $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+\text{Ly6C}^{\text{low}}$ y las de fenotipo monocítico $\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^-\text{Ly6C}^{\text{high}}$ (Hestdal et al. 1991; Youn et al. 2008). Estas dos subpoblaciones se han relacionado con diferentes funciones tanto en cáncer como en enfermedades infecciosas y autoinmunes (Dietlin et al. 2007; Movahedi et al. 2008; Zhu et al. 2007). A pesar de algunas similitudes, estas dos poblaciones utilizan diferentes mecanismos para suprimir diversas funciones en las células T. Otra diferencia entre ambos grupos celulares es que únicamente el subgrupo de MDSC monocíticas posee la capacidad de diferenciarse hacia células dendríticas maduras y macrófagos, como se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* (Youn et al. 2008).

Ly6G es expresado por neutrófilos (Fleming et al. 1993). Estas células tienen función fagocítica y son reclutadas rápidamente frente a un daño tisular o infección, donde participan generando y liberando intermediarios reactivos de oxígeno y enzimas proteolíticas, afectando así a diversos patógenos (Segal 2005). Por otro lado, Ly6C puede encontrarse en la membrana de los monocitos junto con CCR2 (C-C chemokine receptor 2). Los monocitos

migran desde médula ósea al sitio de daño o infección en respuesta a CCL2 (C-C chemokine ligand 2), y se han visto involucrados en la respuesta inmune contra microorganismos patógenos (Serbina et al. 2008). Algunos trabajos relacionan a los monocitos Ly6C^{high}CCR2⁺ activados como promotores de respuestas inmunes proinflamatorias. En el hígado, los monocitos Ly6C^{high}CCR2⁺ dan lugar a células dendríticas productoras de TNF α e iNOS y macrófagos proinflamatorios (Shi and Pamer 2011). Esto lo corroboran algunos modelos de hepatotoxicidad donde ratones CCR2^{-/-} muestran protección frente al daño hepático lo que relaciona a los monocitos Ly6C^{high}CCR2⁺ con la participación en la destrucción de tejidos (Baeck et al. 2012; Bosschaerts et al. 2010; Dambach et al. 2002). En el absceso hepático amebiano se ha observado una importante participación de monocitos Ly6C^{high} relacionados con la destrucción de tejido y altos niveles de producción de TNF α (Helk et al. 2013).

Sin embargo, los monocitos Ly6C⁺ no se han relacionado únicamente con la inducción de una respuesta inmune proinflamatoria. Por el contrario, en el caso del modelo de daño en espina dorsal por contusión, se ha reportado un infiltrado de origen mieloide que da lugar a M ϕ tanto de activación clásica como alternativa (Kigerl et al. 2009; Pineau et al. 2010). Este modelo ocasiona un proceso inflamatorio agudo que se ve atenuado en un corto tiempo (Fleming et al. 2006; Sroga et al. 2003). La inflamación aguda es mediada por un incremento de citocinas como TNF α , IL-6 e IL-1 β dentro de las primeras horas después del daño lo que es seguido por un retorno rápido y espontáneo a los niveles normales de estas citocinas (Kumamaru et al. 2012). En este modelo, la depleción total de células CD11b⁺Ly6C⁺ mediante la administración de un anticuerpo anti-Gr1 antes de la inducción del daño en médula espinal trae como consecuencia la exacerbación del edema tisular, permeabilidad vascular y hemorragia, mientras que el trasplante intraespinal al sitio de lesión de MDSC CD11b⁺Ly6C⁺ generadas *ex vivo* redujo significativamente la inflamación y promovió la reparación tisular (Saiwai et al. 2013). De manera que hablar de las funciones de las células CD11b⁺Gr1⁺ así como de sus subpoblaciones es aun complicado. Por un lado, se trata de una población mixta en donde cada subpoblación presenta diferentes características, por el otro lado, ya que se trata de células en estado inmaduro, dependiendo el modelo en que se estudien podrían presentar diversas funciones o diferenciarse a distintas poblaciones celulares en respuesta a los diferentes ambientes a que se vean sometidas.

LOS MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células del sistema fagocítico mononuclear que presentan fenotipos heterogéneos que se atribuyen a diferenciación celular, una amplia distribución en tejido y a diversos estímulos tanto endógenos como exógenos (Gordon 2003). Su desarrollo empieza en la médula ósea (célula madre → unidad formadora de colonias de granulocito-macrófago o GM-CFU → monoblasto → promonocito → monocito, 2-3 días) donde estímulos como multi-CSF, IL-3, GM-CSF y M-CSF (CSF-1) dan lugar a la producción de 5×10^9 monocitos diariamente que son liberados al torrente sanguíneo y que posteriormente se situarán en diferentes tejidos donde, según el microambiente, se diferenciarán en los diferentes tipos de macrófagos (Ma et al. 2003). Dependiendo del tejido donde estos se sitúen reciben diferentes nombres, como las células de Langerhans en la piel, las células de Kupffer en el hígado, osteoblastos en huesos, la microglía en el sistema nervioso central, entre otros (Gordon 2003).

Entre las funciones de los macrófagos están la preservación de la homeostasis mediante la “limpieza” de células apoptóticas, el reciclaje de componentes eritocitarios y como células efectoras del sistema inmunitario (Mosser and Edwards 2008), ya que tienen la capacidad de reconocer un gran número de organismos patógenos debido a la expresión de receptores para PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) como son los TLRs (receptores tipo Toll), receptores tipo lectina, receptores Scavenger (basurero), entre otros, que pueden participar en el proceso de fagocitosis, la cual es una de las principales funciones de los macrófagos (Gordon and Martinez 2010).

La activación de los macrófagos anteriormente se concebía como la estimulación de estas células principalmente por $\text{IFN-}\gamma$ lo que daba lugar a expresión de iNOS y la consecuente producción de NO y citocinas como IL-12 (Dalton et al. 1993), es decir, la activación clásica de los macrófagos (Figura 1). Este tipo de activación empezó a estudiarse en la década de los 60's por el grupo de Mackaness (Mackaness 1964), quienes observaron que las infecciones por *Mycobacterium bovis* y *Listeria monocytogenes* incrementaban la actividad antimicrobiana de los macrófagos. Sin embargo, no es esta la única forma de activación de macrófagos, como se demostró en 1992 por el grupo de Gordon, quienes describieron que la IL-4 no solo antagoniza los efectos de $\text{IFN-}\gamma$ si no que es capaz de incrementar los niveles y la actividad

del receptor de manosa (MMR) en macrófagos peritoneales de ratón *in vitro*, con lo que se demostró que los macrófagos pueden ser activados alternativamente (Stein et al. 1992).

Características de los caM ϕ y aaM ϕ

Cuando los macrófagos son estimulados por citocinas como IFN- γ y TNF- α o productos bacterianos como LPS, se da lugar a la activación clásica de los macrófagos, que conlleva a la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23 y TNF- α además de otros mediadores de inflamación como NO a partir de iNOS y ROS en estas células. La activación clásica del macrófago trae como consecuencia el incremento de su actividad microbicida principalmente a patógenos intracelulares y su eficiencia para eliminar células tumorales (Figura 1) (Murray and Cohn 1980; Vila-del Sol et al. 2007), Algunas de las citocinas inducidas en este estado de activación están relacionadas con el desarrollo y expansión de las células Th17, las cuales producen IL-17, una citocina que se ha relacionado con la promoción de patologías autoinmunes (Langrish et al. 2005; Veldhoen et al. 2006).

En la polarización hacia el perfil clásico y en la inducción de la expresión de los genes que darán lugar a moléculas proinflamatorias participan factores de transcripción como STAT1 (el cual se activa en respuesta a IFN- γ), NF κ B y las MAPKs (mitogen activated protein kinases) los cuales se activan en respuesta a ligandos de TLRs y a TNF α (O'Shea and Murray 2008); de tal modo que algunos patógenos, como *Leishmania donovani*, han llegado a desarrollar mecanismos para inhibir la actividad de estos factores de transcripción con lo que logran disminuir la actividad microbicida de los macrófagos (Bertholet et al. 2003).

Como se mencionó anteriormente, no solo los estímulos proinflamatorios son capaces de activar a los macrófagos, ya que citocinas como IL-4 e IL-13 inducen un perfil alternativo (Figura 1) donde los macrófagos expresan niveles altos de MMR y de moléculas de tipo MHC-II, así como de Arginasa1 (enzima antagónica de iNOS, presente en caM ϕ) la cual es responsable de metabolizar la L-arginina dando lugar a prolinas y poliaminas, que se han relacionado con regeneración tisular (Kreider et al. 2007). La activación alternativa es contraria a la clásica, y no solo en el metabolismo de arginina; se ha reportado una disminución en los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-12 e IL-1 β como consecuencia de la estimulación con IL-4 en los aaM ϕ , que se relaciona con la disminución en su capacidad

para eliminar patógenos intracelulares (Edwards et al. 2006). Otra característica de los aaM ϕ , es que producen una gran cantidad de quitinasas como Ym1 y Fizz1 (Raes et al. 2002). Por otro lado, ya que tanto IL-4 como IL-13 son importantes en la polarización de los macrófagos hacia el perfil alternativo, y los receptores para estas citocinas comparten IL-4R α , se ha involucrado a STAT6 en este proceso de polarización (Heller et al. 2008).

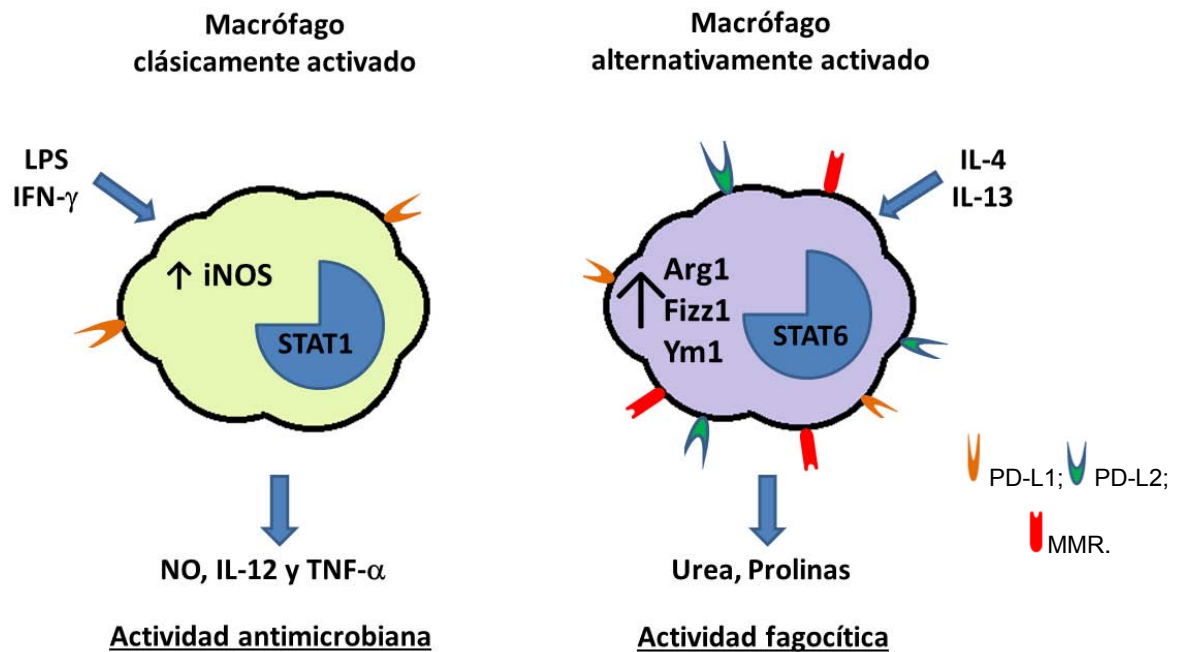


Figura 1. Diferencias en la activación clásica y alternativa de los macrófagos.

Los macrófagos clásicamente activados (caM ϕ) son aquellos activados por citocinas como IFN- γ y TNF- α o productos bacterianos como LPS, lo que conlleva a la producción de citocinas proinflamatorias y mediadores de inflamación por parte de estas células así como el consecuente incremento de su actividad microbicida principalmente a patógenos intracelulares debido al incremento en la producción de óxido nítrico. Por otro lado, los macrófagos alternativamente activados (aaM ϕ) son aquellos inducidos por el estímulo con IL-4 e IL-13. Se caracterizan por la sobreexpresión de la enzima Arg1 y moléculas de membrana como PDL-2 además de que participan en la reparación tisular y en infecciones por helmintos.

Los aaM ϕ están presentes de manera fisiológica en el organismo, donde participan en la homeostasis y reparación tisular. Sin embargo también se han asociado a procesos patológicos como alergias, fibrosis y, de manera importante en este trabajo, a infecciones parasitarias con helmintos, donde ha sido de interés estudiar la presencia de esta población

de células debido a la polarización hacia un perfil Th2 que ejercen estos parásitos en sus hospederos (Gordon and Martinez 2010).

LAS PROTEÍNAS DE LA VÍA JAK/STAT

Existen muchos receptores que al unirse a su ligando envían señales al núcleo mediante una cascada de señalización que da como resultado la transcripción de genes. En el sistema inmunológico una de las principales vías de señalización es la vía JAK/STAT, que participa en la señalización de un gran número de citocinas (Darnell et al. 1994). Las proteínas de la familia STAT actúan como factores de transcripción, que deben ser activados “río arriba” por unas cinasas específicas, las proteínas de la familia JAK, posterior a la unión de una citocina a su receptor, lo que induce una dimerización rápida ya que las proteínas STAT se presentan de manera constitutiva en el citoplasma (Becerra-Diaz et al. 2011).

La familia JAK

La familia JAK “Janus cinasa”, es un grupo de proteínas que deben su nombre a la homología que presentan dos de sus dominios (cinasa y pseudocinasa) con el dios romano de dos cabezas, Janus (Wilks et al. 1991). Esta familia de proteínas con actividad tirosin-cinasa está compuesta por 4 elementos: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2 y poseen un tamaño superior a 1000 aminoácidos de longitud, y un peso que oscila entre los 120 y 130 KDa (Kisseleva et al. 2002). Estas cinasas se empezaron a identificar en la década de los 90's a partir del descubrimiento de Tyk2 (Firmach-Kraft et al. 1990). Estas proteínas participan en la señalización de citocinas que se unen a receptores sin actividad cinasa, de modo que las JAKs, que se encuentran asociadas constitutivamente con el dominio proximal de la membrana rico en prolina, llamado frecuentemente box1/box2, son las responsables de la fosforilación necesaria para iniciar la señalización (Ihle 2001).

Estructuralmente las JAKs están conformadas por siete regiones que van de JH1 a JH7 (Figura 2), siendo la región JH1 aquella en la que recae la actividad cinasa mientras que JH2 es el dominio pseudocinasa. El dominio pseudocinasa distingue a las proteínas JAK de otras proteíncinasas además de que parece ser necesario para la correcta actividad catalítica de

JH1 (Yeh et al. 2000), ya que, por ejemplo, la delección del dominio pseudocinasa en JAK2 trae como consecuencia su hiperactivación mientras que las regiones JH3-JH7 se han asociado en la interacción con el receptor de citocina (Ihle 2001). En cuanto al dominio cinasa JH1, éste incluye tirosinas conservadas que constituyen un componente crítico en el “loop de activación”; Y1038/Y1039 en JAK1, Y1007/Y1008 en JAK2, Y980/Y981 en JAK3 y Y1054/Y1055 en Tyk2 (Leonard and O’Shea 1998).

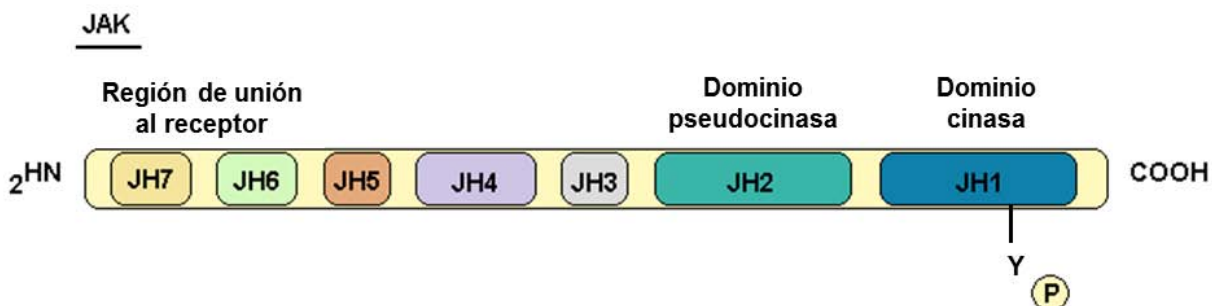


Figura 2. Estructura de las proteínas JAK

Las proteínas JAK (Janus cinasa) son tirosin-cinasas que se encuentran unidas a la región citoplasmática de diversos receptores, principalmente de citocinas. Están constituidas por 7 dominios que van de JH1 a JH7 siendo el dominio JH1 el que posee la actividad cinasa. Son las responsables de la activación (fosforilación) de las proteínas STATs.

Las JAK cinasas, ya sea de un tipo o en combinación de dos distintas, se han visto involucradas en la señalización de un número importante de citocinas, como se muestra a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. La familia JAK y su participación en la señalización de diversas moléculas.

Citocina o factor	
JAK1	IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-4, IL-13, IL-6, IL-11, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-10, CT-1
JAK2	IL-3, IL-12, IL-13, IL-6, IL-11, IFN- γ , CT-1, hormona de crecimiento, Prolactina, Eritropoyetina
JAK3	IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-4
Tyk2	IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, CT-1, IFN- α , IFN- β , IL-10

La familia STAT

Las proteínas STAT se empezaron a describir a mediados de los años 90's, y ahora se sabe que se trata de una familia constituida por 7 miembros. Los primeros STATs descritos fueron STAT1 y 2 por Darnell y cols. utilizando técnicas de purificación de factores unidos a genes estimulados por IFN- γ , y posteriormente se describieron los restantes miembros de esta familia STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6 (Darnell et al. 1994; Hou et al. 1995; Liu et al. 1995; Quelle et al. 1995; Yamamoto et al. 1994; Zhong et al. 1994). Las STATs son proteínas de menor tamaño que las JAKs y su tamaño varía entre los 750 y 850 aminoácidos. Estructuralmente presentan 5 dominios (Figura 3), 4 de los cuales se encuentran ampliamente conservados entre los miembros de esta familia, que son, partiendo del extremo amino terminal, el dominio de dimerización, el dominio coiled-coiled, el dominio de unión a ADN, y el dominio SH2; mientras que en el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio de transactivación que muestra más divergencias y es el que contribuye a la especificidad de cada STAT (Kisseleva et al. 2002).

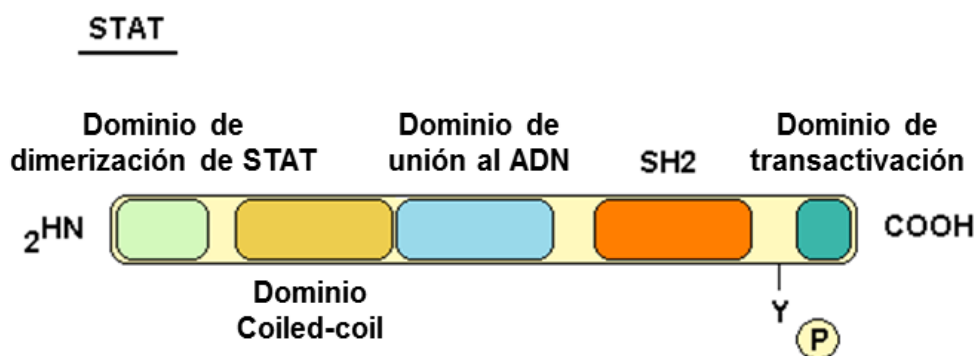


Figura 3. Estructura de las proteínas STAT

Las moléculas STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) son proteínas citoplasmáticas que participan en la señalización de un gran número de citocinas. Estructuralmente se encuentran constituidas por 5 dominios: de dimerización, coiled-coil, de unión a ADN, SH2 y dominio de transactivación. Este último es el que muestra más divergencias y el que contribuye a la especificidad de cada STAT.

El dominio de dimerización está conformado por 8 hélices que conforman una estructura similar a un gancho, la cual favorece la formación de dímeros de STAT (Vinkemeier et al. 1996), el dominio coiled-coil consiste de 4 α -hélices que proporcionan una estructura que

favorece las interacciones proteína-proteína, y en el caso de STAT1 y STAT3 se ha observado que este dominio forma una protuberancia lateral de aproximadamente 80 Å que propicia una superficie hidrofílica que se presenta disponible para formar uniones específicas con otras proteínas helicoidales (Becker et al. 1998; Chen et al. 1998). Entre las proteínas que pueden interactuar con este dominio se encuentran p48/IRF9, el factor de transcripción c-jun y la proteína de interacción de N-myc (Nmi) (Horvath et al. 1996; Zhang et al. 1999; Zhu et al. 1999). En cuanto al dominio de unión al ADN, éste posee un tamaño aproximado de 170 aminoácidos. En la unión del dímero activado de STAT y el ADN participan pocos residuos en contacto directo con el ADN, mientras que las interacciones fosfotirosina-dominio SH2 de los componentes del dímero de STAT forman una estructura similar a una abrazadera que ayuda en esta unión (Chen et al. 1998). Las secuencias de ADN que son reconocidas por los STATs son el motivo ISRE (Interferon-Stimulated Response Elements) con la secuencia AGTTTNCNTTCC y el motivo GAS (Gamma-activated sequence) cuya secuencia corresponde a TTCNNNGAA; únicamente STAT6 se une a un motivo diferente que es TTCNNNGAA. El dominio más conservado de estas proteínas es el dominio SH2; está formado por aproximadamente 100 aminoácidos. Este dominio sirve para la unión de la proteína STAT al receptor de citocina fosforilado y para la activación de la STAT mediada por la fosforilación de determinado residuo conservado de tirosina (Schindler 2002).

Al igual que las proteínas JAK, las diferentes STATs participan en la señalización de un gran número de citocinas ya sea formando homo o heterodímeros (Tabla 2).

Tabla 2. Participación de la familia STAT en la señalización de diversas moléculas.

Citocina o factor	
STAT1	IL-2, IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-27
STAT2	IFN- α , IFN- β
STAT3	LIF, IL-10, IL-6, IL-27, Hormona de crecimiento
STAT4	IL-12
STAT5a/b	Prolactina, Hormona de crecimiento, Trombopoyetina
STAT6	IL-4, IL-13

SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA JAK/STAT

De manera general la vía JAK/STAT inicia con la unión del ligando al receptor de citocina, lo cual induce una dimerización de las cadenas del receptor con lo que se favorece la transactivación de las proteínas JAK. Una vez activadas las JAK, estas proteínas pueden fosforilar un residuo tirosina en la región citoplasmática del receptor que servirá de sitio de unión para las proteínas STAT. Una vez ancladas al receptor, las proteínas STAT son fosforiladas en un residuo tirosina determinado y posteriormente pueden disociarse del receptor de citocina para dimerizarse y poder translocarse al núcleo donde el dímero se une a secuencias GAS (gamma activated site) (Schindler and Strehlow 2000).

STAT1 y JAK1/2 en respuesta a IFN- γ .

JAK1 y JAK2 son tirosin-quinasas que participan, entre otras cosas, en la señalización de los receptores de citocinas de clase II al que pertenece el IFN- γ R (Schindler and Strehlow 2000) mientras que STAT1 es el factor de transcripción que se activa en respuesta a IFN- γ .

La señalización inducida por IFN- γ en los macrófagos ocurre de la siguiente forma: el IFN- γ es reconocido por el IFN- γ R el cual está constituido por 2 cadenas α y 2 cadenas β las cuales tienen unidas a las Janus cinasas 1 y 2 respectivamente. La unión del ligando al receptor induce la oligomerización de las cadenas del receptor con la consecuente transactivación entre ellas así como la fosforilación del receptor en su dominio citoplásmico en el residuo de tirosina 440 en la cadena α , el cual funciona como sitio de anclaje para el dominio SH2 de STAT1 latente en el citoplasma. Una vez que STAT1 se une al receptor de IFN- γ activado, este factor de transcripción es fosforilado por las JAK en un residuo tirosina 701, lo que favorece su homodimerización. El homodímero activado de STAT1 puede ahora translocarse al núcleo e iniciar la transcripción de genes al unirse a secuencias GAS en su región promotora (Figura 4) (Gough et al. 2008).

STAT1 puede además sufrir una fosforilación en su residuo serina 727 independiente de las JAK la cual no participa en la formación del homodímero, la translocación al núcleo ni la unión al ADN. Sin embargo, sí participa en la función de STAT1 ya que la transcripción mediada por esta molécula y la actividad antiviral mediada por IFN- γ se ven marcadamente atenuadas en

su ausencia (Decker and Kovarik 2000; Varinou et al. 2003; Wen et al. 1995). Aún no está del todo esclarecido cuales son las cinasas responsables de la fosforilación del residuo de serina de las STATs; mientras CaM cinasa II y la PKC γ son algunas candidatas para algunos investigadores (Deb et al. 2003; Nair et al. 2002), la vía de p38 MAPKs es la propuesta por otros (Kovarik et al. 1999) y más recientemente, CDK8 se analiza como la responsable de este fenómeno (Staab et al. 2013).

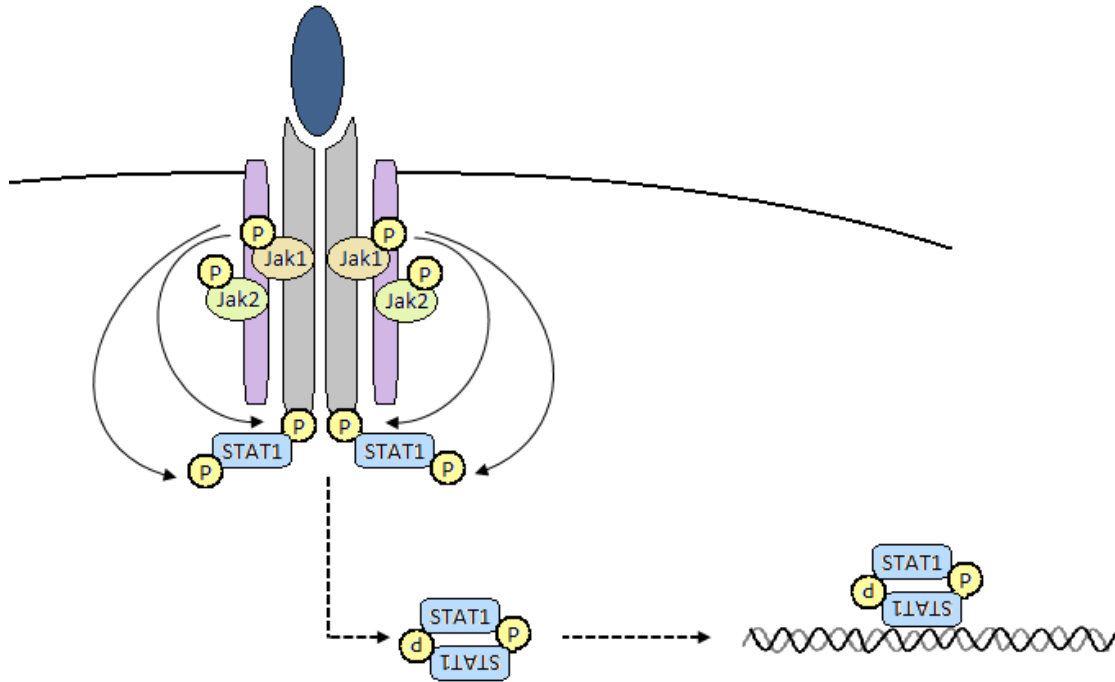


Figura 4. Vía JAK/STAT en respuesta a IFN- γ

La señalización del IFN- γ involucra al receptor para esta citocina presente en la membrana de sus células blanco, así como la participación de las JAKs 1 y 2, las cuales se encuentran ancladas a la región citoplasmática de dicho receptor y son las responsables de la fosforilación de STAT1 permitiendo su homodimerización. El homodímero fosforilado de STAT1 es el factor de transcripción responsable de la expresión de genes inducidos por IFN- γ .

MECANISMOS REGULADORES DE LA VÍA JAK/STAT

La vía de señalización JAK/STAT participa en la señalización inducida por un gran número de citocinas, lo que significa que tiene un papel importante en el control de la respuesta inmune. Una vez activada, son necesarios diversos mecanismos que ayuden a regular su funcionamiento ya que una señalización desregulada puede traer en consecuencia diversas patologías. Entre estos mecanismos debemos mencionar las siguientes moléculas que actúan a diferentes niveles de la vía JAK/STAT con el fin de asegurar una correcta modulación en la actividad de esta cascada de señalización.

Regulación mediada por proteínas SOCS

Las proteínas SOCS (suppressor of cytokine signaling) son una familia compuesta por 8 miembros que se denominan SOCS1-7 y CIS (cytokine-inducible SH2 domain protein) (Nicola et al. 1999). La característica principal de estas proteínas consiste en la presencia en su estructura de un dominio SH2 flanqueado por un dominio amino terminal y por el dominio SOCS Box (Kile et al. 2002). Estas proteínas se encuentran de manera general expresadas en niveles bajos de forma constitutiva en células no estimuladas y son rápidamente inducidas por el estímulo con citocinas, con lo que se inhibe la vía JAK/STAT mediante un clásico loop de retroalimentación negativa (Greenhalgh and Hilton 2001). Las diferentes SOCS presentan mecanismos diferentes de inhibición sobre la vía JAK/STAT.

SOCS1 se une directamente a las JAKs fosforiladas en tirosina mediante su dominio SH2, lo que da como resultado la inhibición de la actividad de la proteína JAK, mientras que para que SOCS3 ejerza su función reguladora sobre las JAKs, se requiere su unión al receptor de citocinas activado; CIS por otro lado, regula esta vía de señalización al competir con la STAT por el sitio de unión al receptor de citocina (Shuai and Liu 2003). Otro mecanismo por el cual SOCS1 puede regular la vía JAK/STAT es mediante la marcación de estas proteínas para su degradación por el proteosoma. Esto lo logra ya que su dominio SOCS Box puede unirse a componentes del complejo ubiquitina E3 ligasa con lo que SOCS1 realiza este marcaje para su degradación.

Regulación mediada por proteín-tirosin fosfatasas SHP-1 y SHP-2

Se sabe que las JAK pueden ser reguladas por proteín-tirosin fosfatasas (PTP) tales como SHP-1, SHP-2 o TCPTP, entre otras. SHP 1 y 2 contienen en su estructura un dominio SH2 (Neel 1993), el cual es un dominio formado por cerca de 100 residuos que es capaz de unirse a residuos de tirosinas fosforiladas con cierta especificidad (Liu et al. 2006). Sin embargo, mientras SHP-1 se expresa principalmente en células hematopoyéticas y la regulación mediada por esta proteína se relaciona principalmente con la defosforilación de JAK2, SHP-2 es ubicua y su mecanismo regulador se asocia a la regulación negativa de JAK1 (Klingmuller et al. 1995; You et al. 1999).

Regulación de la vía JAK/STAT por proteínas PIAS

Las proteínas PIAS (Protein inhibitor of activated STAT) también llamadas GBP (Gu-binding protein), conforman una familia constituida por 4 miembros, PIAS1, PIAS3, PIASX y PIASY (Shuai 2000). Estudios donde realizaron co-inmunoprecipitaciones han demostrado especificidad de PIAS por moléculas de la familia STAT, donde observan que posterior a la estimulación por citocinas, PIAS1, 3 y X interactúan con STAT1,3 y 4 respectivamente (Arora et al. 2003; Chung et al. 1997; Liu et al. 1998). PIASY también se ha observado en asociación con STAT1 (Liu et al. 2001).

Un punto relevante en el mecanismo de regulación de las proteínas PIAS es que su interacción con las proteínas STATs es dependiente de la activación por citocinas. Esto se debe a que PIAS1 se une a dímeros de STAT1 pero no lo hace a su forma monomérica (Liao et al. 2000). Esta interacción de proteínas PIAS con STAT ha demostrado inhibir la activación de genes mediante diferentes mecanismos; PIAS1 y 3 pueden inhibir la unión de STAT1 y 3 al ADN respectivamente (Chung et al. 1997; Liu et al. 1998) mientras que PIASX y Y inhiben la transcripción mediada por STAT4 y 1 sin afectar su unión al ADN (Arora et al. 2003; Liu et al. 2001).

ALTERACIONES DE LA VÍA STAT1-JAK1/2 EN INFECCIONES CON PARÁSITOS

Dado que la vía de señalización STAT1 JAK1/2 participa de manera muy importante en la activación de la respuesta inmune, diversos parásitos han desarrollado mecanismos de modulación de la activación de esta vía con la finalidad de propiciar así su establecimiento, mantenimiento o reproducción en el hospedero. Las evidencias que se tienen vienen de estudios con protozoarios intracelulares tales como *Leishmania donovani*, *L. major* y *Toxoplasma gondii*.

Leishmania donovani. Es el agente causal de la leishmaniasis visceral la cual es una infección potencialmente fatal y epidémica de algunas regiones de India, Sudán y Brasil (Alexander and Russell 1992). Es un parásito intracelular obligado que infecta a macrófagos y por tanto ha desarrollado diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Por ejemplo, los promastigotes de *L. donovani* inhiben la producción de IL-12, un importante inductor de IFN- γ , en macrófagos derivados de médula ósea. El IFN- γ es la principal citocina involucrada en la inducción de la actividad leishmanicida en los macrófagos (Belosevic et al. 1989; Carrera et al. 1996; Murray et al. 1982). También se ha observado que la infección de este parásito en fagocitos mononucleares inhibe la expresión de los genes del MHC-II en respuesta a IFN- γ (Reiner et al. 1988), de igual manera interfiere en los mecanismos de señalización inducidos por IFN- γ tales como la fosforilación de JAK1 y 2 y de STAT1 α (Nandan and Reiner 1995) e inclusive de eventos más tempranos como la fosforilación de la cadena alfa del receptor de IFN- γ en respuesta al reconocimiento de su ligando tan solo 24 horas después de la infección (Ray et al. 2000).

Conociendo que *L. donovani* es capaz de inhibir la señalización de IFN- γ , otros investigadores han hecho esfuerzos para esclarecer qué mecanismos se involucran en dicha regulación y han encontrado que la infección con este protozoario induce en los macrófagos humanos la expresión de RNAm de SOCS3, que a su vez se relacionó con una pobre activación de STAT1 frente a la infección (Bertholet et al. 2003). También se ha demostrado que esta infección induce la expresión de la fosfatasa SHP-1 en macrófagos, lo que correlaciona con la disminución de la fosforilación de JAK2 inducida por IFN- γ (Blanchette et al. 1999). Sin embargo, la inhibición de la vía JAK/STAT por *L. donovani* no solo involucra procesos de desfosforilación, ya que también se ha observado que es capaz de inducir la degradación vía

proteosoma de STAT1 α con la participación de PKC α en macrófagos B10R (Forget et al. 2005).

***Leishmania major* y *Leishmania mexicana*.** Al igual que *L. donovani*, estas dos especies son parásitos intracelulares que infectan macrófagos y donde el IFN- γ participa de manera importante en el control de la infección (Belosevic et al. 1989; Murray 1982). Estos parásitos también han desarrollado mecanismos de evasión del sistema inmune para favorecer su supervivencia en el hospedero. Entre los mecanismos que se han descrito se sabe que tanto *L. mexicana* como *L. major* pueden suprimir la expresión de las subunidades α y β del receptor de IFN- γ (IFN- γ R α y β) en macrófagos de líneas celulares como J774A.1 y RAW264.7. También se ha descrito que como resultado de estas infecciones se reducen en estas células los niveles totales de las proteínas JAK1 y JAK2 y se regula negativamente la fosforilación de estas Janus cinasas y de STAT1 en respuesta a IFN- γ . Además de lo mencionado anteriormente, *L. mexicana* demostró que induce una mayor fosforilación de la isoforma STAT1 β en respuesta a IFN- γ , la cual se asocia con la modulación negativa de IFN- γ (Bhardwaj et al. 2005).

***Toxoplasma gondii*.** Este protozoario se encuentra ampliamente distribuido y afecta a humanos y a diversas especies de animales. Su importancia radica en que a pesar de poder permanecer años en latencia, la toxoplasmosis aparece en condiciones de inmunodeficiencia o padecimientos congénitos (Moncada and Montoya 2012; Navia et al. 1986). En pacientes inmunocompetentes este parásito induce una respuesta efectora Th1 con presencia de citocinas como IL-12 e IFN- γ (Denkers and Gazzinelli 1998), que debe de ser regulada a través de IL-10 para evitar patologías asociadas con procesos inflamatorios (Gazzinelli et al. 1996), sin embargo, en la ausencia de estas citocinas proinflamatorias, la infección por *T. gondii* es letal (Gazzinelli et al. 1994; Scharon-Kersten et al. 1996).

Dado que IFN- γ promueve la expresión de genes importantes en la eliminación de esta infección, *T. gondii* ha desarrollado mecanismos por los cuales logra modular negativamente la señalización por esta citocina, como se ha demostrado por experimentos con macrófagos RAW264.7 infectados *in vitro* con taquizoitos de *T. gondii*, donde se observó que se inhibía la fosforilación en tirosina 701 de STAT1 con la consiguiente disminución de la transcripción de diversos genes y la producción de óxido nítrico. Esta falta de activación de STAT1 se le atribuyó a la expresión de SOCS1 inducida por el parásito y se corroboró con la infección de

macrófagos SOCS1^{-/-}, donde los efectos inhibitorios de *T. gondii* sobre la señalización de IFN- γ fueron mucho menores (Zimmermann et al. 2006). Sin embargo, como se puede observar, estos estudios se realizaron con parásitos protozoarios, mientras que la participación de esta vía de señalización en infecciones por helmintos es un tema que ha sido escasamente abordado.

INFECCIONES PARASITARIAS EN ANIMALES DEFICIENTES DE STAT1

Sabiendo que la respuesta Th1 participa en el control de diversas infecciones parasitarias, y con el conocimiento de que STAT1 es un factor importante en la polarización hacia esta respuesta, se ha trabajado con infecciones por parásitos en ratones deficientes de esta molécula, donde se ha observado que dependiendo del agente infeccioso y del fondo genético de la cepa de ratones utilizada, STAT1 puede participar de diferentes formas mediando la resistencia o susceptibilidad a la infección.

La deficiencia de STAT1 en la infección por *L. donovani* y *L. major*. Como se mencionó anteriormente, *L. donovani* y *L. major* han desarrollado mecanismos para inhibir la vía de señalización de IFN- γ con lo que propician su establecimiento en el hospedero.

En el caso de la infección por *L. donovani*, se observó que ratones STAT1^{-/-} de fondo genético BALB/c mostraron un impedimento del desarrollo de una respuesta Th1 comparado con sus controles silvestres, sin embargo, a pesar de que esta respuesta se ha asociado al control de la carga parasitaria, los ratones deficientes de este factor de transcripción desarrollaron un menor número de parásitos por lo que fueron más resistentes a la infección, además de que desarrollaron una menor inmunopatología (Rosas et al. 2006).

Por otro lado, la deficiencia de esta misma molécula en ratones de fondo genético C57BL/6 infectados con *L. major*, demuestra nuevamente que STAT1 es importante en el desarrollo de una adecuada respuesta Th1 ya que, frente a este parásito, los ratones STAT1^{-/-} presentaron un déficit en su producción de IFN- γ e IL-12, además de que mostraron niveles mayores de IL-4, citocina asociada con un perfil Th2. A diferencia de lo que se observó en la infección con *L. donovani*, los ratones deficientes de STAT1 fueron más susceptibles a la infección con *L.*

major, desarrollando lesiones de mayor tamaño y una mayor carga parasitaria que los controles STAT1^{+/+} (Rosas et al. 2003).

En resumen, STAT1 participa de manera diferente frente a distintas infecciones, por otro lado, estas diferencias también podrían relacionarse a los diferentes fondos genéticos de los hospederos.

La deficiencia de STAT1 en la infección por *Toxoplasma gondii*. De manera similar a *Leishmania*, *Toxoplasma gondii* necesita para su establecimiento en el hospedero la modulación del sistema inmune, de manera particular, logra regular negativamente la señalización mediada por IFN- γ . Con el fin de entender mejor este fenómeno se han realizado estudios utilizando ratones deficientes de STAT1 y se ha observado que a diferencia de lo que sucede en la infección por *Leishmania*, la ausencia de esta proteína en ratones SvEv no es determinante en el desarrollo de la respuesta Th1 frente a *T. gondii*, lo que se observa al presentarse niveles de IL-12 e IFN- γ similares a los encontrados en los ratones STAT1^{+/+} con la misma infección. Sin embargo, la ausencia de esta proteína favoreció la muerte de todos los ratones alrededor del día 11, mientras que en los ratones WT no hubo fallecimientos. Esto es debido, entre otras cosas, a que alrededor del 50% de las células peritoneales en los ratones STAT1^{-/-} fueron infectadas por el parásito mientras que el índice de células infectadas en los ratones WT solo alcanzó el 2%. A esta susceptibilidad observada en los ratones KO se le asocia la inhabilidad de regular positivamente la expresión de moléculas del MHC en los macrófagos y la baja producción de NO (Lieberman et al. 2004).

Si bien STAT1 puede ser determinante en el desarrollo de la respuesta Th1 frente a algunas infecciones, en otras su ausencia no parece afectar el desarrollo de esta respuesta. Por otro lado, mientras la ausencia de este factor de transcripción puede inducir una mayor susceptibilidad a un cierto parásito, curiosamente esta misma ausencia frente a otro agente infeccioso puede significar un incremento substancial en la resistencia y disminución de la patología.

Como puede apreciarse, la participación de STAT1 en respuesta a patógenos depende del agente infeccioso, y los estudios antes mencionados se han realizado utilizando infecciones con protozoarios. Frente a helmintos parásitos, la participación de STAT1 aún se encuentra pobremente descrita a pesar de que se conoce que la respuesta Th1 participa de manera

importante en el control de ciertas infecciones. Por lo tanto, es importante estudiar el papel que tiene esta proteína en la infección por *T. crassiceps*, para poder así comprender mejor la modulación que ejercen los helmintos en sus hospederos.

JUSTIFICACIÓN

El factor de transcripción STAT1 es importante en el desarrollo de la respuesta Th1 y en la activación clásica de los macrófagos. La infección intraperitoneal con *Taenia crassiceps* polariza la respuesta inmune de sus hospederos desde un perfil Th1 caracterizado por una baja carga parasitaria y la presencia de macrófagos clásicamente activados, hacia uno Th2, con lo que logra un ambiente que facilita su establecimiento así como el surgimiento de macrófagos alternativamente activados los cuales son hipo-responsivos a IFN- γ .

Debido que STAT1 es importante en el desarrollo de la respuesta Th1 asociada al control de la infección, es importante estudiar la participación de la activación de STAT1 durante el curso de la infección así como evaluar el desarrollo de la respuesta inmune y su relación con la resistencia frente a *T. crassiceps* en ausencia de este factor de transcripción.

HIPÓTESIS

La activación de la molécula STAT1 está implicada en la resistencia a la infección con *Taenia crassiceps*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de STAT1 en la infección por *T. crassiceps*.

Objetivos particulares

- Determinar si la activación de la molécula STAT1 frente a IFN- γ en macrófagos peritoneales presenta diferencias entre la cepa susceptible BALB/c y la cepa resistente C57BL/6 en la infección con *T. crassiceps*.
- Identificar si la infección con *T. crassiceps* induce alteraciones en la activación de STAT1 en respuesta a IFN- γ en esplenocitos de ratones BALB/c.
- Analizar si la infección crónica por *T. crassiceps* induce la expresión de moléculas inhibitorias de la activación de STAT1.
- Determinar si el TcES posee la misma capacidad de modulación que la infección en esplenocitos y macrófagos peritoneales de ratones BALB/c.
- Determinar si el TcES puede inducir en PBMC de humanos una activación disminuida de STAT1 frente a IFN- γ .
- Estudiar si la ausencia de STAT1 en ratones BALB/c facilita una mayor resistencia o susceptibilidad a la infección con *T. crassiceps*.
- Establecer la presencia o ausencia de aaM ϕ en la fase crónica de infección en ratones STAT1 KO.
- Explorar el papel de los M ϕ STAT1^{+/+} y STAT1^{-/-} en la resistencia a la infección por *T. crassiceps*, a través de transferencias in vivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones. Se utilizaron ratones hembras y machos de 6 a 8 semanas de edad de las cepas BALB/c, C57BL/6 y STAT1^{-/-} de fondo genético BALB/c y se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos. Los procedimientos de cuidado y manejo de los animales se realizaron conforme a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 titulada "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio" y fueron aprobados por el comité local de bioética. Los ratones se sacrificaron utilizando una cámara de CO₂.

Infección. Los ratones fueron inoculados con 10 metacéstodos de *Taenia crassiceps* cepa ORF vía i.p. obtenidos bajo condiciones asépticas de la cavidad peritoneal de hembras BALB/c de entre 6 y 10 semanas de infección.

Obtención de TcES. Se colectaron los metacéstodos de *T. crassiceps* de la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/c de 10 semanas de infección y se mantuvieron en Solución Salina Fisiológica (SSF) estéril por 24 horas a 37°C después de las cuales se recolectó el sobrenadante, se centrifugó por 10 minutos a 2795 g y se descartó la pastilla. Las proteínas fueron concentradas utilizando tubos Amicon Ultra Filters con un corte de membrana de 50 KDa (Millipore). Se determinó la concentración de proteína utilizando el reactivo de Bradford comercial, se le adicionó inhibidor de proteasas y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Obtención de suero. Se obtuvo muestra de sangre de ratones BALB/c y STAT1 KO a las 4 y 8 semanas de infección y de ratones no infectados por punción cardiaca. Se obtuvieron los sueros por centrifugación (2000 rpm/10 minutos). El suero se almacenó a -20°C hasta su uso.

Anticuerpos y citocinas recombinantes. Se utilizaron Ab primarios Anti-β-Actina, anti-SOCS3 (BioLegend), anti-SHP-1 (Sigma), anti-STAT1, anti-STAT1-P (BD BioScience) a una dilución 1:500 y anti STAT6-P (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:200. Los Ab secundarios utilizados fueron HRP Donkey anti Rabbit IgG, HRP Goat anti mouse IgG

(BioLegend) y HRP anti goat (Santa Cruz Biotechnology). El IFN- γ y la IL-4 recombinantes murinos así como IFN- γ recombinante humano se obtuvieron de PeproTech. Para citometría de flujo se utilizaron anticuerpos anti IFN- γ R α , anti IFN- γ R β , anti F4/80, anti MHC-II, anti MMR, anti PD-L1, anti PD-L2, anti CD11b, anti Ly6C, anti Ly6G (BioLegend) y anti CCR2 (R&D Systems).

Obtención de células de exudado peritoneal (PECs). Se obtuvieron células del peritoneo mediante lavado peritoneal con SSF. Se ajustaron a 5×10^6 células/mL por conteo por exclusión con azul de Tripano y se sembraron 5 millones de células por pozo en placas de 6 pozos (Costar). Se dejaron adherir por 2 horas a 37°C y 5% CO₂, se removieron las células no adherentes mediante lavados con DMEM. Las PECs adherentes fueron en su mayoría macrófagos, como se corroboró por citometría de flujo (>90% F4/80⁺MHC-II⁺).

Obtención de células de bazo. Se removieron los bazos de los ratones de los diferentes grupos en condiciones estériles y se les realizó una perfusión con SSF, se recolectaron las células en suspensión y se centrifugaron a 450 g x 10 minutos. Se resuspendieron en solución de Boyle por 10 minutos para lisar eritrocitos y se contaron por exclusión de azul de Tripano. Se ajustaron a 5×10^6 células/mL en medio.

Obtención de PBMC. Se obtuvieron 10mL de sangre periférica de donadoras sanas y se mezclaron con 20mL de SSF. Un volumen de 8mL de sangre diluida fue adicionado a 3mL de Ficoll y se centrifugó a 450 g por 30 minutos para separar las fases. Se colectó la fase intermedia que contenía las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Estas células se lavaron dos veces con SSF y se contaron mediante exclusión con azul de Tripano en cámara de Neubauer. Se ajustaron a 7×10^6 células y se sembraron en cajas Petri.

Obtención de sobrenadantes de cultivo y determinación de NO. Se obtuvieron PECs como se mencionó anteriormente, se sembraron 5×10^6 células por pozo, después de dos horas de incubación se lavaron las células no adherentes y las adherentes se estimularon o no con IFN- γ (20 ng/mL) por 24 horas después de las cuales se recolectaron los

sobrenadantes y se congelaron a -70°C hasta su uso. La determinación de óxido nítrico se realizó mediante la reacción de Griess (Miranda et al. 2001).

Estimulación de células y obtención de proteínas. Veinticuatro horas después de lavar las células no adherentes, los macrófagos y esplenocitos se estimularon con $\text{IFN-}\gamma$ (20 ng/mL, PeproTech) por 20 minutos, posteriormente se lisaron con amortiguador de lisis frío (20mM Tris-HCl pH=8, 137mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Tritón X-100, 10% glicerol e inhibidor de proteasas 1%). Los lisados se centrifugaron, se colectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford. Las proteínas se almacenaron a -70°C hasta su uso. Células de animales no infectados y PBMC de humano se incubaron o no con TcES (50 $\mu\text{g/mL}$) por 3 días previos a la estimulación con $\text{IFN-}\gamma$ (20ng/mL, PeproTech) por 20 minutos. Las proteínas se extrajeron como se mencionó anteriormente.

Células del bazo, macrófagos peritoneales y PBMC humanas (5×10^6 de todas las células) también fueron tratados previamente con ortovanadato de sodio $20\mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich) por 45 minutos previos a la estimulación con $\text{IFN-}\gamma$ + ortovanadato por 20 minutos. Después de este tiempo las proteínas se extrajeron como se indicó anteriormente.

Western Blot. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE (40 ug por carril) utilizando geles de acrilamida al 10%, posteriormente se realizó una transferencia electroforética a membranas de PVDF (Immobilon-P MILLIPORE). Las membranas fueron bloqueadas (leche baja en grasa al 5% en PBS) por 2 horas a 37°C . Después se incubaron en agitación con anticuerpos primarios (1:500-1000) toda la noche seguido de 3 lavados de 10 minutos con PBS-T 0.05%. La detección se realizó mediante la incubación con Ab secundarios (1:2000) acoplados con HRP por dos horas. Se volvieron a lavar las membranas y se realizó el revelado utilizando el sistema de detección ECL de Amersham.

ELISA para determinación de anticuerpos específicos en suero. Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Nunc, Polysorp) con 10 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno soluble total de *Taenia crassiceps* toda la noche a 4°C . Se lavaron las placas 5 veces con PBS-T al 0.05% (solución de lavado). Se realizó el bloqueo con PBS-BSA al 1%. Se lavaron las placas 2 veces. Se colocaron los

sueros de ratones BALB/c y STAT KO de ratones controles y de 4 y 8 semanas de infección a una dilución 1:25 y posteriores diluciones dobles. Se dejaron incubar toda la noche y se lavaron 5 veces. Se adicionaron los anticuerpos anti IgG1 y anti IgG2a (1:500 a 1:1000) contra ratón (Zymed) ambos acoplados a biotina estreptavidina. Después de otros 5 lavados se realizó el revelado adicionando ABTS/H₂O₂ como sustrato. Las placas fueron leídas a 405 nm. Los valores se expresan como densidad óptica.

Citometría de flujo. Se obtuvieron células de peritoneo y esplenocitos y se colocaron 1x10⁶ células en tubos para análisis de citometría (BD Falcon). Una vez en los tubos de FACS se centrifugaron para concentrarlas y se resuspendieron en 50 µL de amortiguador de FACS con anti-CD16/32 (BioLegend, San Diego, CA, USA) para evitar uniones inespecíficas y se incubaron por 15 minutos a 4°C, posteriormente se les agregaron los Ab marcados con fluorocromos anti-F4/80, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-MMR, anti-CD11b, anti-Ly6C, anti-Ly6G (todos de BioLegend) y anti-CCR2 (R&D Systems) y se incubaron por 30 min a 4° C. Las células se lavaron 2 veces con 1 mL de amortiguador de FACS (conteniendo 1% FBS y 0.5% of azida de sodio en PBS) y se centrifugaron a 450 g x 10 minutos. El análisis de las células se realizó utilizando el citómetro FACSCalibur y el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Los datos se analizaron posteriormente utilizando el programa Cyflogic versión 1.2.1.

PCR (genotipo) y RT-PCR. El genotipo de los ratones STAT1^{-/-} se realizó utilizando DNA obtenido mediante digestión de 1cm de cola de ratón por incubación con proteinasa K y extracción con cloroformo. Se realizó la extracción de RNA total de macrófagos peritoneales (2x10⁶ células) utilizando 1 mL Trizol (Invitrogen) seguido de una extracción con cloroformo. Se cuantificó el RNA total y se tomó 1µg para su conversión a cDNA utilizando el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Tanto de DNA (genotipo) como de cDNA se utilizó 1µg para los ensayos de PCR utilizando un termociclador Corbett Research (Australia) y el kit Amplificasa kit (BioTechMol). Se amplificaron los genes STAT1 (genotipo), GAPDH, Fizz1, Ym1, PD-L1, TNF α , Arg1 e iNOS. El programa utilizado para la amplificación de los genes contenía una desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, la temperatura de alineamiento indicada por 30 segundos y un último paso de 72° C por 30 segundos. Los productos de la amplificación se cargaron con 6x DNA loading Dye (Thermo Scientific) en geles de agarosa (1.5%) con Midori green Advance (NIPPON

Genetics EUROPE GmbH). Las secuencias de primers utilizados y las temperaturas de alineamiento se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados para determinar marcadores de activación alternativa de macrófagos, citocinas y STAT1.

Gen	Secuencia	TA (°C)	Prod.	Referencia
GAPDH	F - CTC ATg ACC ACA gTC CAT gC	56	201	Renshaw et al. (2002)
	R - CAC ATT ggg ggT Agg AAC AC			
Fizz1	F - ggT CCC AgT gCA TAT ggA TgA gAC CAT Ag	65	290	Nair et al. (2003)
	R - CAC CTC TTC ACT CgA ggg ACA gTT ggC AgC			
Ym-1	F - TCA CAg gTC Tgg CAA TTC TTC Tg	56	436	Nair et al. (2003)
	R - TTT gTC CTT Agg Agg gCT TCC TC			
TNF-a	F - ggC Agg TCT ACT TTg gAg TCA TTg C	59	307	Ulett et al. (2000)
	R - ACA TTC gAg gCT CCA gTg AAT TCg			
iNOS	F - CTg gAg gAg CTC CTg CCT CATg	62	449	Yoshida et al. (2000)
	R - gCA gCA TCC CCT CTg ATg gTg			
Arg-1	F - CAg AAg AAT ggA AgA gTC Ag	54	250	Nair et al. (2003)
	R - CAg ATA TgC Agg gAg TCA CC			
PDL-1	F - ggT Cgg ACA TgT TTA TgT g	56	269	-
	R - TCA CAC TTg TgA ggA AAg g			

TA: Temperatura de alineamiento F: forward primer; R: reverse primer.

Ensayo de proliferación. Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Costar) con α CD3 (2 μ g/mL). Se obtuvieron células de bazo de ratones no infectados, se cuantificaron y se marcaron con CFSE. Se sembraron 100 000 células por pozo y se dejaron activar por 2-3 horas después de las cuales se les agregaron diferentes diluciones de células totales del exudado peritoneal de ratones BALB/c y STAT1^{-/-} de 2 días de infección y no infectados. Después de 3 días de co-cultivo, se recolectaron los sobrenadantes y la expresión de CFSE en los linfocitos se analizó por citometría de flujo.

Cytospin. Se obtuvieron células de exudado peritoneal de ratones BALB/c y STAT1^{-/-} de 8 semanas de infección. Se contaron por exclusión con azul de Tripano y se centrifugaron 400

mil células a 28 g sobre portaobjetos para su sedimentación. Las laminillas ser tiñeron con colorante de Wright. Se observaron al microscopio y se contaron los linfocitos, neutrófilos y macrófagos encontrados.

Transferencia de células. Después de 4 semanas de infección, se obtuvieron células de exudado peritoneal de ratones STAT1^{-/-}, estas se sembraron y se dejaron adherir por 2 horas después de las cuales se lavaron las células no adherentes y las adherentes se despegaron con una solución de EDTA. Después de despegarlas, los macrófagos se contaron y se transfirieron 3×10^6 células i.p. a ratones BALB/c a los que previamente se les depletaron los macrófagos residentes de peritoneo mediante la inyección i.p. de liposomas con clodronato (2 mg).

RESULTADOS Y PUBLICACIONES OBTENIDAS

La infección por *Taenia crassiceps* y sus productos de excreción/secreción inhiben la activación de STAT1 en respuesta a IFN- γ .

Esta parte del trabajo doctoral se encuentra publicada en:

Becerra-Díaz M, Terrazas LI. (2014). *Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ . Int J Parasitol. 2014 May 14.

En este trabajo se buscó determinar si la infección con *T. crassiceps* o sus productos de excreción/secreción (TcES) modulan negativamente la respuesta a IFN- γ tanto en células inmunes murinas como humanas mediante la disminución de su capacidad de fosforilar a STAT1. **Las figuras que se mencionan en los siguientes párrafos se encuentran en el artículo citado previamente y ubicado en la página 43.**

La infección crónica con *T. crassiceps* disminuye la fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ en macrófagos peritoneales de ratones de la cepa susceptible BALB/c mientras que en ratones C57BL/6, resistentes a esta infección, no se observa este efecto.

Es conocido que la cepa BALB/c es altamente susceptible a la cisticercosis causada por *T. crassiceps* mientras que los ratones de la cepa C57BL/6 son resistentes, también es sabido que en ambas cepas las hembras son más susceptibles que los machos por lo que desarrollan una mayor carga parasitaria (Sciutto et al. 1991). Otra característica de esta infección es que induce en su etapa crónica la presencia de aaM ϕ los cuales son hiporresponsivos al estímulo con IFN- γ a pesar de expresar niveles elevados del receptor para esta citocina (Rodríguez-Sosa et al. 2006).

Con la finalidad de identificar una posible causa de la disminución en la respuesta a IFN- γ evaluamos el estado de activación de STAT1, factor de transcripción involucrado en la

respuesta a esta citocina, en los macrófagos tanto de la cepa susceptible BALB/c como de la cepa resistente C57BL/6 así como su asociación con la carga parasitaria, a las 8 semanas de infección. Como era esperado, después de la infección con 10 metacístodos i.p. los ratones C57BL/6 resolvieron casi en su totalidad la infección mientras que los ratones BALB/c fueron susceptibles a ésta siendo las hembras las que albergaron un mayor número de parásitos (Fig. 1A). Cuando se analizó en las células peritoneales de estos ratones la capacidad de fosforilar STAT1 al ser estimuladas con IFN- γ se encontró que tanto hembras como machos BALB/c infectados presentaban una menor fosforilación de STAT1 que las células de ratones no infectados (Fig. 1B). Por el contrario, en los macrófagos de los ratones C57BL/6 infectados encontramos una mayor fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ que en las células de los ratones no infectados (Fig. 1C).

Este fenómeno se observó en la etapa crónica de la infección, donde existe una gran carga parasitaria y la respuesta inmune se encuentra polarizada hacia un perfil Th2, mientras que al analizar lo que pasaba en los macrófagos obtenidos durante la infección aguda (2 semanas) cuando el número de parásitos es menor (Fig. 2A) se encontró que tanto las células de hembras como machos respondieron a través de una mayor fosforilación de STAT1 al ser estimulados con IFN- γ comparados con macrófagos de ratones no infectados (Fig. 2B y 2C) .

La disminución de la fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ en los aaM ϕ no es consecuencia de un decremento en la expresión de la proteína STAT1 total ni a una disminución de la expresión de las cadenas del receptor para esta citocina.

La disminución en la activación de STAT1 observada anteriormente podría tener diferentes causas, por un lado, la infección podría regular negativamente la producción de la proteína STAT1, lo que podría tener como consecuencia menores niveles de proteína STAT1 fosforilada. Por otro lado, esta misma infección podría causar en los macrófagos una menor expresión de las cadenas del receptor de IFN- γ con lo que la respuesta a esta citocina se vería disminuida.

Al analizar mediante WB los niveles de la proteína STAT1 total en células peritoneales tanto de ratones infectados como de no infectados encontramos que la infección no indujo cambios significativos en la expresión de esta proteína (Fig. 3D) mientras que favoreció un incremento

importante de la expresión de las cadenas α y β del receptor para IFN- γ como se demostró mediante el análisis por citometría de flujo (Fig. 3A) con lo que se descartan estos posibles mecanismos como responsables de la disminución en la fosforilación de STAT1. También se realizaron una curva de concentración de IFN- γ y una de tiempo de estimulación para determinar si en estos macrófagos de ratones infectados (8 semanas) un incremento en el tiempo de estimulación o de dosis de la citocina podrían favorecer la fosforilación hacia un nivel similar a las condiciones controles sin embargo, en ningún caso la fosforilación se vio restablecida y se demostró que las condiciones en que se estaban llevando a cabo los experimentos eran las óptimas (Fig. 3B y 3C).

La infección crónica con *T. crassiceps* no altera la capacidad de los macrófagos de fosforilar a STAT6.

Otra posible causa de la disminución en la fosforilación de STAT1 podría deberse a que la infección crónica con *T. crassiceps* generara una alteración generalizada de la vía JAK/STAT. Para evaluar esta posibilidad, macrófagos del mismo grupo de animales crónicamente infectados fueron estimulados con IL-4. Se encontró que éstos macrófagos tuvieron la capacidad de fosforilar fuertemente a la proteína STAT6 en respuesta a IL-4 (Fig. 3E), siendo inclusive mayor a la fosforilación observada en las células de ratones no infectados. Estos datos sugieren que la deficiencia en la fosforilación de STAT1 observada en los macrófagos de ratones infectados es específica y no corresponde a un defecto general de la vía JAK/STAT.

La infección crónica con *T. crassiceps* induce en los macrófagos peritoneales la sobreexpresión de las moléculas supresoras SHP-1 y SOCS3, mientras que el uso de un inhibidor de fosfatasas ayuda a restablecer la fosforilación de STAT1.

Con el propósito de explorar las posibles moléculas que pudieran estar involucradas en la fosforilación alterada de STAT1 en los macrófagos de ratones infectados crónicamente con *T. crassiceps*, se decidió analizar por WB la expresión de las proteínas SOCS3 y SHP-1 las cuales pueden actuar como moduladores negativos de la activación de STAT1 (Christophi et al. 2009; Kundu et al. 2013; Stoiber et al. 1999). Como se muestra en la figura 4A, la infección

crónica indujo una sobreexpresión significativa de SOCS3 independiente al estímulo con IFN- γ , la cual se mantuvo constante en las células estimuladas con IFN- γ . Por otro lado, la expresión de la fosfatasa SHP-1, la cual es capaz de remover un grupo fosfato de residuos tirosina ya sea en el receptor de citocina activado o en diversas proteínas STAT fosforiladas (Neel 1993), se observó incrementada también por la infección con *T. crassiceps*, sin embargo, la estimulación con IFN- γ condujo a una disminución de esta proteína (Fig. 4B).

Para esclarecer la participación de la fosfatasa SHP-1 como mecanismo regulador de la activación de STAT1, se utilizó el inhibidor de fosfatasas ortovanadato de sodio, con el cual se logró restablecer la fosforilación de STAT1 en macrófagos estimulados con IFN- γ , al mismo tiempo que disminuyeron los niveles de expresión de la fosfatasa SHP-1. Además de restablecerse la fosforilación de STAT1, cuando el estímulo de IFN- γ se mantuvo por 24 horas fue también recuperada la producción de óxido nítrico en aquellas células incubadas previamente con el inhibidor de fosfatasa (Fig. 4B y 4C). Estos resultados involucran a SHP-1 como responsable de la regulación negativa de la fosforilación de STAT1 mientras que descartan a SOCS3 en este fenómeno ya que el restablecimiento de la fosforilación de STAT1 se logró pese a la presencia constante de esta proteína (Fig. 4D).

Al igual que los macrófagos peritoneales, los esplenocitos de los ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps* presentan una disminución en la fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ .

Para identificar si el efecto modulador de *T. crassiceps* podía afectar a otras poblaciones celulares además de los macrófagos peritoneales, se analizó la fosforilación de STAT1 en esplenocitos totales de animales infectados (8 semanas) y no infectados (controles), los cuales no se encuentran en contacto directo con el sitio de infección. De manera similar a lo ocurrido con los macrófagos peritoneales, la infección crónica con este helminto indujo una disminución en la capacidad de los esplenocitos de fosforilar STAT1 al ser estimulados con IFN- γ en comparación con esplenocitos de ratones no infectados (Fig. 6A). Además del déficit en la fosforilación de STAT1, la infección crónica con *T. crassiceps* también provocó un incremento en la expresión de la proteína SOCS3 en los esplenocitos (Fig. 6B) y, de manera similar a lo ocurrido en macrófagos, la incubación previa de los esplenocitos con el inhibidor

de fosfatasa indujo un incremento en los niveles de fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ , aunque no de manera significativa (Fig. 6C).

Los productos de excreción/secreción de *T. crassiceps* (TcES) emulan la modulación negativa causada por la infección crónica con este parásito en macrófagos peritoneales de ratón.

Dado que los esplenocitos de ratones infectados sufrieron un decremento en su habilidad para fosforilar STAT1 en respuesta a IFN- γ aun cuando no se encuentran en contacto directo con los parásitos y a la evidencia que existe sobre el efecto modulador los antígenos de *T. crassiceps* (TcES), los cuales han demostrado ser capaces de inhibir la respuesta de células dendríticas derivadas de médula ósea y de células dendríticas derivadas de humanos frente a diversos ligandos de TLRs (Terrazas et al. 2013; Terrazas et al. 2010a; Terrazas et al. 2011). Se buscó evaluar la capacidad de TcES de emular la inducción de la disminución sobre la fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ causada por la infección crónica, simultáneamente, se evaluó esta misma propiedad al incubar las células con el antígeno soluble total de *T. crassiceps* (TcSol) y en presencia de metacéstodos (en contacto directo o a través de un sistema de transwells). Después de mantener estos estímulos por 3 días se encontró que el TcES (50 μ g/mL) logró producir un efecto similar a la infección crónica ya que los macrófagos peritoneales sometidos a este estímulo presentaron una disminución en su capacidad de activar a STAT1 (Fig. 5A) así como un incremento en la expresión de SOCS3 (Fig. 5B) y de SHP-1 (Fig. 5C).

El TcES es capaz de modular negativamente la respuesta a IFN- γ en células mononucleares derivadas de sangre periférica de pacientes humanos.

Una vez determinada la capacidad del TcES para inducir *in vitro* la disminución de la fosforilación de STAT1 en macrófagos peritoneales murinos (Fig. 5A), se analizó si este fenómeno era reproducible en células humanas. Para este fin se extrajo sangre periférica de donadores sanos y por gradiente de Ficoll se obtuvieron células mononucleares (PBMC). Estas se incubaron por 3 días con TcES (50 μ g/mL) y posteriormente se estimularon con IFN- γ para el análisis de STAT1-P.

Similar a lo observado en macrófagos y esplenocitos murinos, las PBMC de donadores humanos previamente expuestas a TcES presentaron una fosforilación disminuida de STAT1 frente al estímulo con IFN- γ en comparación con las células que no estuvieron en contacto con TcES (Fig. 7A). Por otro, lado el uso de ortovanadato de sodio también facilitó la recuperación de la fosforilación de STAT1 en las células incubadas con TcES (Fig. 7B), lo que indica que los antígenos liberados por *T. crassiceps* podrían estar induciendo la producción de fosfatasas como un mecanismo de regulación negativa de la respuesta a IFN- γ en células humanas.



Taenia crassiceps infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ



Mireya Becerra-Díaz, Luis I. Terrazas*

Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores (FES)-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. De los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México 54090, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 February 2014

Received in revised form 21 March 2014

Accepted 25 March 2014

Available online 14 May 2014

Keywords:

IFN- γ

Helminths

Alternatively activated macrophages

STAT1

SOCS3

SHP-1

Immunomodulation

Excreted/secreted molecules

ABSTRACT

It is well understood that helminth infections modulate the immune responses of their hosts but the mechanisms involved in this modulation are not fully known. Macrophages and dendritic cells appear to be consistently affected during this type of infection and are common target cells for helminth-derived molecules. In this report, we show that macrophages obtained from chronically *Taenia crassiceps*-infected mice displayed an impaired response to recombinant murine IFN- γ , but not to recombinant murine IL-4, as measured based on the phosphorylation of STAT1 and STAT6, respectively. These macrophages expressed high levels of SOCS3. However, the inhibition of phosphatase activity by orthovanadate restored the IFN- γ response of these macrophages by increasing STAT1 phosphorylation without affecting SOCS3 expression. Therefore, we aimed to identify the phosphatases associated with IFN- γ signaling inhibition and found that macrophages from *T. crassiceps*-infected mice displayed enhanced SHP-1 expression. Interestingly, the exposure of naïve macrophages to *T. crassiceps* excreted/secreted products similarly interfered with IFN- γ -induced STAT1 phosphorylation. Moreover, macrophages exposed to *T. crassiceps* excreted/secreted products expressed high levels of SOCS3 as well as SHP-1. Strikingly, human peripheral blood mononuclear cells that were exposed to *T. crassiceps* excreted/secreted products in vitro also displayed impaired STAT1 phosphorylation in response to IFN- γ ; again, phosphatase inhibition abrogated the *T. crassiceps* excreted/secreted product-altered IFN- γ signaling. These data demonstrate a new mechanism by which helminth infection and the products derived during this infection target intracellular pathways to block the response to inflammatory cytokines such as IFN- γ in both murine and human cells.

© 2014 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Helminths are a diverse group of multicellular organisms with the interesting ability to modulate the host immune system, triggering a permissive environment in their hosts that allows them to survive. Helminth infections also impair immunity against other unrelated infections and may affect vaccine efficacy (Sabin et al., 1996; Cooper et al., 2001; Elias et al., 2001; Kamal et al., 2001; Maizels and Yazdanbakhsh, 2003; Le Hesran et al., 2004; Nookala et al., 2004; Sokhna et al., 2004; Hartgers and Yazdanbakhsh, 2006; Walson and John-Stewart, 2007). The mechanisms through which helminth parasites achieve this immunomodulatory effect are not fully understood, but it is well known that they have developed successful and sophisticated mechanisms to maintain a regulatory environment that favors both parasite persistence

and host tissue without collateral damage (Pearce and Reiner, 1995; Maizels et al., 2004). Importantly, the immunomodulatory mechanisms used by helminths are not only limited to live infection, as different helminth-derived antigens have been demonstrated to modulate immune processes in vivo and in vitro (Okano et al., 1999; van der Kleij et al., 2002; Harnett et al., 2004; Oshiro et al., 2005; Steinfeldt et al., 2009; Terrazas et al., 2011).

Taenia crassiceps is a helminth parasite that naturally infects canines in its adult stage and rodents in its larval stage. It has been intensely used in the study of host–parasite interactions in cysticercosis (Terrazas, 2008). As the infection progresses, the immune response elicited by this parasite is polarized towards strong Th2-type responses (Villa and Kuhn, 1996; Terrazas et al., 1998). Another feature of this infection is the recruitment of macrophages that display an impaired response to inflammatory stimuli such as lipopolysaccharide (LPS) and IFN- γ (Rodríguez-Sosa et al., 2002). Interestingly, a few other helminthic infections, such

* Corresponding author.

E-mail address: literrazas@campusiztacala.unam.mx (L.I. Terrazas).

as with *Toxocara*, *Fasciola* and *Brugia*, have also been reported to down-regulate the macrophage response to inflammatory stimuli (Taylor et al., 1996, 2000; Kuroda et al., 2001; Donnelly et al., 2005), but the mechanisms involved in this regulation remain unknown. However, the mechanisms of several intracellular pathogens, such as *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana*, *Toxoplasma gondii* and *Francisella tularensis*, have been described to involve the down-regulation of IFN- γ signaling, which is crucial for the success of these pathogens (Luder et al., 2001; Bhardwaj et al., 2005; Zimmermann et al., 2006; Matte and Descoteaux, 2010; Nallaparaju et al., 2011). In contrast, immunomodulation related to IFN- γ signaling remains poorly understood in helminth infections.

IFN- γ is one of the most important endogenous mediators of immunity to intracellular pathogens and inflammation (Khan and Moretto, 1999; Taylor et al., 2007; Herbst et al., 2011). IFN- γ also plays a key role in classical macrophage activation and T helper 1 (Th1) cell responses, phenomena that are seriously affected during helminth infections (Rodríguez-Sosa et al., 2002; Smeltz et al., 2002; Martínez et al., 2008). Canonical IFN- γ signaling pathway activation is well understood. IFN- γ binds to its cognate receptors, IFN- γ R α and IFN- γ R β , leading to the activation of Janus kinases (JAKs), which phosphorylate the receptor IFN- γ R α as well as a specific set of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) proteins on tyrosine (Schindler and Strehlow, 2000; Gough et al., 2008). Phosphorylated STAT1 homodimers (pSTAT1) translocate to the nucleus where they induce the expression of target genes such as IL12 and inducible nitric oxide synthase (iNOS), among others. Thus, phosphorylation crucially regulates the downstream effects of STAT1. These IFN- γ -induced responses are tightly regulated by other intracellular proteins, mainly suppressor of cytokine signaling (SOCS) (Greenhalgh and Hilton, 2001; Federici et al., 2002; Madonna et al., 2008) and protein tyrosine phosphatases (PTPs), which are enzymes that remove phosphate groups from tyrosine residues on proteins (Neel, 1993; Klingmüller et al., 1995; Liu et al., 2006).

The mechanisms by which *T. crassiceps* and other helminths induce hypo-responsiveness to IFN- γ remain unknown. Therefore, to gain insight into the mechanisms involved in helminth-macrophage immunomodulation, we analyzed the macrophage response to IFN- γ in the presence and absence of *T. crassiceps* infection or in vitro exposure to *T. crassiceps* excreted/secreted products (TcES).

2. Materials and methods

2.1. Mice

Six- to 8-week-old BALB/c and C57BL/6 mice of both sexes were purchased from Harlan Laboratories (México) and maintained in a pathogen-free environment at the Facultad de Estudios Superiores (FES) – Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) animal facility according to the Faculty Animal Care and Use Committee and government guidelines (official Mexican regulation NOM-062-ZOO-1999), which are in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (USA). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the FES-Iztacala (UNAM). The mice were sacrificed using a CO₂ chamber and all efforts were made to minimize pain.

2.2. Parasites, infection and TcES molecules

Metacystodes of *T. crassiceps* (ORF strain) were harvested under sterile conditions from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 6–10 weeks of infection. The cysticerci were washed four times in physiological saline solution and used for infection. Mice

were infected with an ip injection of 10 small non-budding cysticerci of *T. crassiceps* suspended in 0.3 mL of saline solution. The infected mice were sacrificed at weeks 2 and 8 p.i., and the parasites were harvested from their peritoneal cavity and counted. To obtain TcES, metacystodes were maintained in culture in physiological saline solution at 37 °C without serum for 24 h. The TcES was recovered from the supernatant and centrifuged for 10 min at 2795 g. Next, the proteins were concentrated using an Amicon Ultra Filter with a 50 kDa-cutoff membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). The high-molecular-weight molecules were collected, the protein concentration was determined using a commercially available Bradford assay, and the sample was treated with protease inhibitors and stored at –70 °C until further use.

2.3. Cell preparations and culture conditions

Peritoneal exudate cells (PECs) were obtained from the peritoneal cavity of uninfected mice and mice infected with *T. crassiceps* for 2 and 8 weeks. The cells were washed twice with physiological saline solution and the red blood cells were lysed by resuspending the cells in Boyle's solution (0.17 M Tris and 0.16 M ammonium chloride). Following two washes, the viable cells were counted by trypan blue exclusion with a Neubauer hemocytometer. The PECs were adjusted to 5×10^6 cells/mL in RPMI medium supplemented with 10% FBS, 100 units of penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine, 25 mM HEPES and 1% non-essential amino acids (all from Gibco, Grand Island, NY, USA) and cultured in six-well plates (Costar, USA). After 2 h at 37 °C and 5% CO₂, the non-adherent cells were removed by washing with warm supplemented RPMI medium. Adherent cells reached >90% of macrophage purity according to flow cytometry using double F4/80⁺ MHC-II⁺ markers (Biolegend, USA).

The spleen was removed under sterile conditions from naïve and infected mice. Single-cell suspensions were prepared by gently teasing apart the spleen in supplemented RPMI. The cells were centrifuged and the erythrocytes were lysed by resuspending the cells in Boyle's solution. Following two washes, the viable cells were counted by trypan blue exclusion with a Neubauer hemocytometer. The splenocytes were adjusted to 5×10^6 cells/mL in supplemented RPMI.

We obtained 10 mL of peripheral blood from healthy female human donors (signed informed consent was obtained from all participants) and mixed it with 20 mL of saline. A volume of 8 mL of the diluted blood was then mixed with 3 mL of Ficoll and centrifuged at 448g for 30 min to separate the phases. The intermediate phase, which contained the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), was collected. These cells were washed twice with saline and the viable cells were counted by trypan blue exclusion with a Neubauer hemocytometer. The PBMCs were adjusted to 5×10^6 cells/mL in supplemented RPMI. The cells were seeded and stimulated with recombinant human (rh) IFN- γ for 20 min. Phosphatase inhibition was performed by adding 20 μ M sodium orthovanadate (Sigma Aldrich, USA) 45 min before the cells were stimulated with IFN- γ . Cells were lysed and processed for Western blot assays.

2.4. Cell stimulation and protein extraction

Twenty-four hours after removing the non-adherent cells, the adherent cells (>90% F4/80⁺/MHC-II⁺) were stimulated by the addition of recombinant murine (rm) IFN- γ (20 ng/mL) or rm IL-4 (5 ng/mL) (PeproTech, Mexico) for 20 min. The cells were lysed with cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol and 1% protease inhibitor cocktail) and centrifuged, and the supernatants were collected. Phosphatase inhibition with orthovanadate was performed by

adding 20 μ M sodium orthovanadate (Sigma Aldrich) 45 min before the cells were stimulated with IFN- γ for 20 min. Proteins were obtained as in Section 2.2. The protein concentration was determined using a commercially available Bradford assay, and the samples were treated with protease inhibitors and stored at -70°C until further use. Some cultures were stimulated with IFN- γ for 24 h and supernatants were collected to measure nitric oxide (NO) production using the Greiss method. Splenocytes were similarly stimulated and processed.

For the *in vitro* TcES exposure, we obtained PECs from non-infected mice. Twenty-four hours after removing the non-adherent cells, the adherent cells were stimulated with 50 μ g/mL of TcES for 3 days or 25 μ g/mL of *T. crassiceps* soluble antigens (TcSol). Alternatively, 20 metacystodes were placed over the cells or 20 metacystodes were added to a transwell system, and the cells were incubated for 3 days. After this time, the cells were washed and then stimulated with IFN- γ for 20 min. Proteins were obtained and quantified as described above.

2.5. Western blot assays

Whole-cell lysates were separated by SDS-PAGE (40 μ g of protein was loaded in each well) using 10% acrylamide mini-gels, followed by electrophoretic transference to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore, USA). The membranes were blocked with 5% fat-free milk in PBS for 2 h and incubated with primary antibody overnight. The detection step was performed with peroxidase-coupled anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG (BioLegend, 1:2,000) or anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA) for 2 h. The primary antibodies recognized phospho-STAT1 Y701 (BD Biosciences/Pharmingen, USA), total STAT1 (BD Biosciences/Pharmingen), Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (SHP1) (Sigma-Aldrich), β -actin (Biolegend), SOCS3 (Biolegend) and phospho-STAT6 Y641 (Santa Cruz Biotechnology). All primary antibodies were diluted 1:500 in 1% fat-free milk in PBS. The blots were developed using an ECL detection system according to the manufacturer's instructions (Amersham, USA). The blots shown are representative of three separate experiments.

2.6. Statistical analysis

Where multiple group comparisons were made, data were analyzed using one-way ANOVA. For comparisons between two groups, the Student's *t* test was used. In all tests, $P < 0.05$ was deemed significant (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

3. Results

3.1. IFN- γ induced STAT1 phosphorylation is attenuated in macrophages from *T. crassiceps*-infected mice

Previous reports by our laboratory and others have shown that macrophages obtained from hosts with helminth infections are highly refractory to inflammatory stimuli, such as LPS and IFN- γ (Kuroda et al., 2001; Rodríguez-Sosa et al., 2002; Mylonas et al., 2009), but the effects of helminth infection on IFN- γ signaling have not yet been characterized. To gain insight into the mechanism involved in this modulation, we compared the macrophage response to IFN- γ in two different strains of mice, which are known to be susceptible or resistant to *T. crassiceps* infection (Reyes et al., 2009). Thus, macrophages obtained from *T. crassiceps*-infected BALB/c mice (susceptible strain), *T. crassiceps*-infected C57BL/6 mice (resistant strain) and their respective uninfected controls were similarly exposed to rm IFN- γ for 20 min. As shown in

Fig. 1A, the BALB/c mice harbored significantly higher numbers of parasites compared with the C57BL/6 mice; most of these mice cleared the infection. In line with their higher susceptibility, peritoneal macrophages from the *T. crassiceps*-infected BALB/c mice displayed a significantly reduced level of STAT1 phosphorylation (Fig. 1B). In sharp contrast, macrophages from the *T. crassiceps*-infected C57BL/6 mice displayed strong STAT1 phosphorylation (Fig. 1C). These data were confirmed by densitometry analysis of three different experiments.

Next, we evaluated whether this defect in STAT1 phosphorylation was solely due to the presence of the parasite. Macrophages from acute (2 weeks) *T. crassiceps*-infected BALB/c mice were exposed to rm IFN- γ . Interestingly, when only a few parasites were found in the peritoneal cavity, i.e., in the mice with acute *T. crassiceps* infection, the macrophages displayed significantly stronger STAT1 activation than did macrophages from uninfected mice (Fig. 2A and B).

3.2. *Taenia crassiceps* infection does not alter IFN- γ R expression, the total STAT1 level or STAT6 phosphorylation

To determine whether the inhibition of STAT1 activation is associated with a defect in IFN- γ R expression or a requirement of *T. crassiceps*-infected mouse-derived macrophages for a higher IFN- γ concentration or more time to respond, we evaluated the expression of IFN- γ R on macrophages from infected mice as well as their responses with different IFN- γ doses and incubation times. Interestingly, the macrophages from the *T. crassiceps*-infected mice expressed high levels of IFN- γ R α and IFN- γ R β (Fig. 3A). These macrophages did not respond to a high concentration of rm IFN- γ (Fig. 3B), and their response was not improved by longer incubation with this stimulus (Fig. 3C). Another possibility for the poor STAT1 phosphorylation observed in macrophages from heavily infected mice is that these macrophages had inadequate levels of total STAT1 protein. However, there were no differences in the expression levels of total STAT1 protein between macrophages from uninfected and *T. crassiceps*-infected mice (Fig. 3D). Moreover, to demonstrate that this effect on STAT1 activation was specific and not due to a more global and unspecific inhibition of other STATs, the same macrophages were exposed to rm IL-4 for 20 min. As shown in Fig. 3E, the macrophages from the *T. crassiceps*-infected mice displayed stronger STAT6 phosphorylation than the uninfected controls.

3.3. *Taenia crassiceps* infection induces the expression of SOCS3 and SHP-1 in peritoneal macrophages

We next examined whether the inability of the *T. crassiceps*-infected mice-derived macrophages results from the differential expression of intracellular molecules that are associated with impaired STAT1 phosphorylation. Thus, macrophages from uninfected and infected mice were analyzed for three molecules that are known to be associated with JAK-STAT signaling inactivation, including SOCS1, SOCS3 and the tyrosine phosphatase SHP-1, which acts as negative regulator of both innate and acquired immune cytokine signaling via STAT1 and NF- κ B (Stoiber et al., 1999; Nakagawa et al., 2002; Imai et al., 2003; Neznanov et al., 2004; Christophi et al., 2009; Strebosky et al., 2011; Kundu et al., 2013). To this end, peritoneal macrophages were incubated with or without IFN- γ and the levels of these proteins were determined by Western blot. As shown in Fig. 4A, a significant increase in SOCS3 expression was detected in the macrophages from the *T. crassiceps*-infected mice even under basal conditions, according to our densitometry analyses of three different experiments. In contrast, SOCS1 was not detected in either the naive or infected macrophages (data not shown). Strikingly, we found significantly

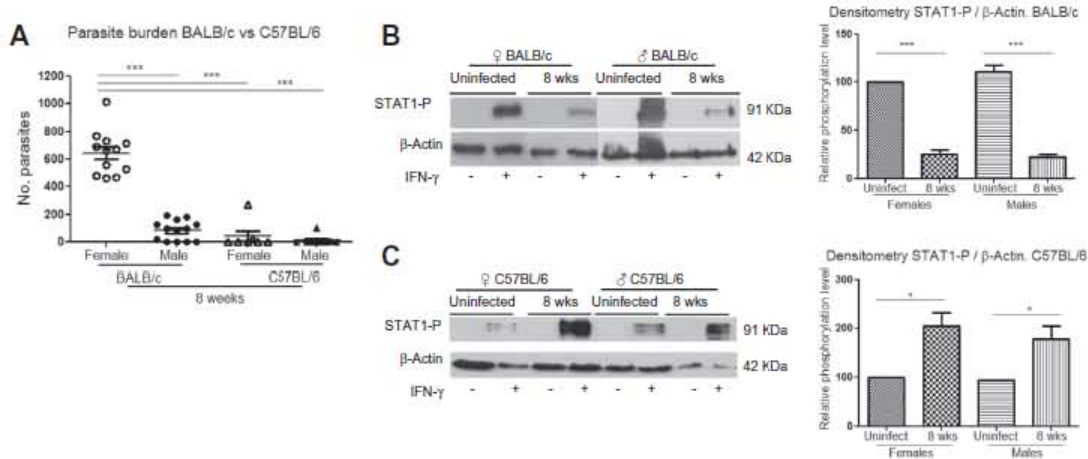


Fig. 1. Experimental *Taenia crassiceps* infection down-regulates the IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 in murine macrophages. Mice were i.p. infected with 10 metacystodes of *T. crassiceps* and 8 weeks later the parasite burden was recorded. Peritoneal macrophages were obtained and then stimulated with 20 ng/ml recombinant murine IFN- γ for 20 min. (A) Parasite burden at 8 weeks p.i. in female and male BALB/c and C57BL/6 mice. (B) Analysis of STAT1 phosphorylation in peritoneal macrophages from *T. crassiceps*-infected or uninfected BALB/c mice by Western blot and densitometry. β -Actin was used as a loading control. Densitometry analysis was performed by plotting the increase in STAT1 phosphorylation relative to the β -actin control. (C) Analysis of STAT1 phosphorylation in peritoneal macrophages from *T. crassiceps*-infected C57BL/6 mice by Western blot and densitometry. β -Actin was used as a loading control. The data in the graphs are combined from three independent experiments and are shown as the mean percentage increase in phosphorylation \pm S.E. $n =$ six mice; ns = not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

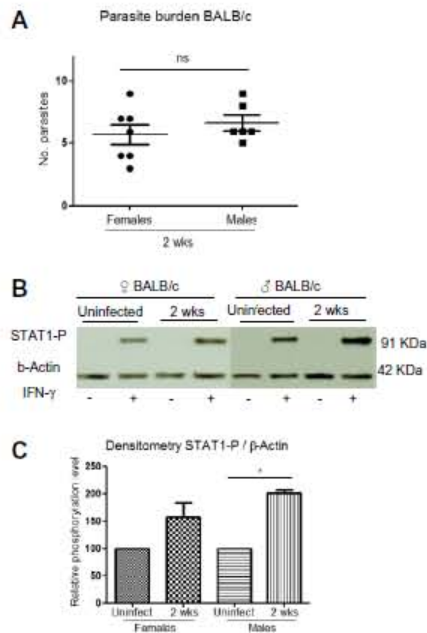


Fig. 2. Acute *Taenia crassiceps* infection significantly enhances STAT1 phosphorylation in murine peritoneal macrophages in response to IFN- γ . Mice were infected as stated in Fig. 1; peritoneal macrophages from males and females were obtained at 2 weeks p.i. and stimulated with 20 ng/ml of IFN- γ for 20 min. (A) Parasite burden of BALB/c mice 2 weeks after *T. crassiceps* infection. Analysis of STAT1 phosphorylation of peritoneal macrophages from *T. crassiceps*-infected BALB/c by Western blot (B) and densitometry (C). β -Actin was used as a loading control. The data in the graphs are combined from three independent experiments and are shown as the mean percentage increase \pm S.E. $n =$ six mice; ns = not significant; * $P < 0.05$.

enhanced expression of the phosphatase SHP-1 in the macrophages from the *T. crassiceps*-infected mice (Fig. 4B).

3.4. Phosphatase inhibition restores STAT1 phosphorylation in macrophages from *T. crassiceps*-infected mice

SHP-1 regulates the phosphorylation of several STATs by enzymatically removing the phosphate group from tyrosine residues on either activated cytokine receptors or downstream signaling molecules (Neel, 1993; Liu et al., 2006). Thus, we tested whether in vitro exposure to orthovanadate, a phosphatase inhibitor, restores STAT1 phosphorylation in macrophages from *T. crassiceps*-infected mice. As shown in Fig. 4C, the macrophages from the *T. crassiceps*-infected mice recovered their capacity to respond to IFN- γ when treated with orthovanadate by significantly increasing their level of STAT1 phosphorylation. Furthermore, this biological effect was in line with a recovery in NO production in macrophages from *T. crassiceps*-infected mice treated with orthovanadate and stimulated with IFN- γ (Fig. 4C). Interestingly, treatment with orthovanadate did not affect SOCS3 expression (Fig. 4D).

3.5. Naïve macrophages exposed to TcES down-modulate STAT1 phosphorylation

Similar to other helminth derivatives, the TcES molecules have been reported to impair the ability of mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) and human-derived dendritic cells (DCs) to respond to different Toll-like receptor (TLR) ligands, such as LPS, CpG and *T. gondii* antigen (Terrazas et al., 2010, 2011, 2013). However, whether TcES is able to modulate macrophage responses is unknown. To determine whether TcES modulates IFN- γ signaling, different approaches were utilized to evaluate whether naïve macrophages exposed to different sources of *T. crassiceps* antigens or in direct contact with the parasite display impaired STAT1 activation. Peritoneal naïve macrophages were cultured for 3 days in the presence of TcSol or TcES.

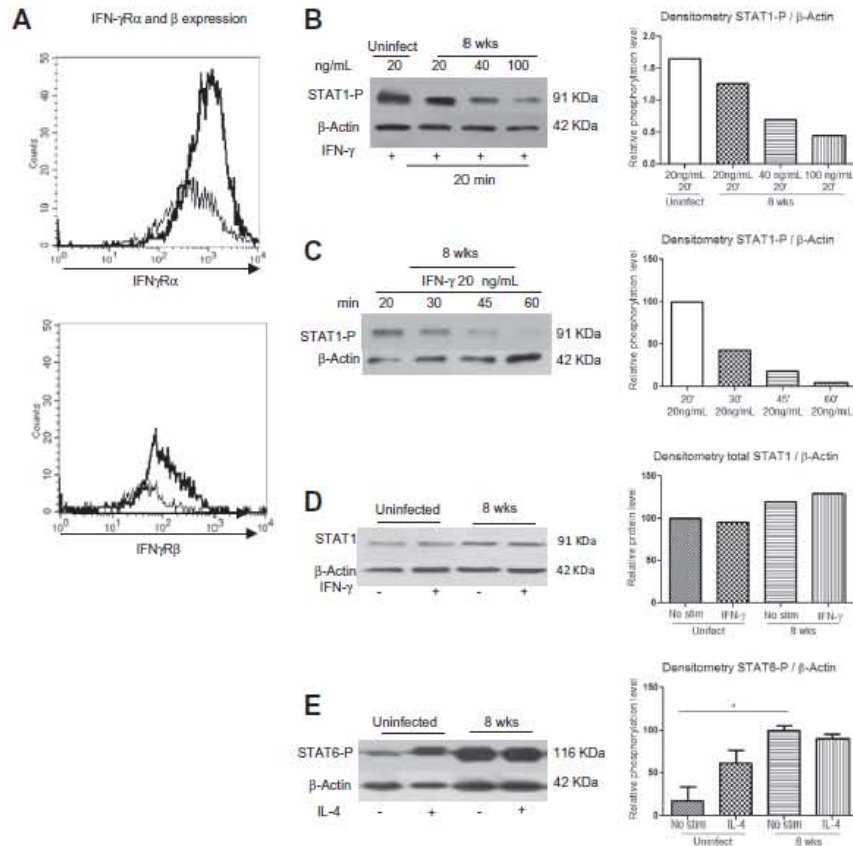


Fig. 3. Chronic *Taenia crassiceps* infection does not impair IFN- γ R α expression, total STAT1 levels nor STAT6 phosphorylation in mice. Macrophages from mice infected with *T. crassiceps* for 8 weeks and naïve controls were obtained and processed as stated in Fig. 1. (A) Flow cytometry analysis was performed for IFN- γ R α and IFN- γ R β expression on F4/80⁺ gated peritoneal cells; bold lines on the histograms correspond to macrophages from infected mice. (B) Macrophages from infected mice were stimulated with increasing doses of IFN- γ and their lysates were analyzed for STAT1 phosphorylation and β -actin by Western blot. (C) Peritoneal macrophages from *T. crassiceps*-infected mice were stimulated with 20 ng/mL of recombinant murine IFN- γ for 20, 30, 45 or 60 min. Their cell lysates were analyzed for STAT1 phosphorylation and β -actin by Western blot. (D) Peritoneal macrophages from uninfected or *T. crassiceps*-infected mice were analyzed for total STAT1 by Western blot. (E) Macrophages from uninfected mice or mice infected with *T. crassiceps* for 8 weeks were stimulated with 5 ng/mL of recombinant murine IL-4 for 20 min. Their cell lysates were analyzed for STAT6 phosphorylation and β -actin by Western blot. The data in the graphs are combined from three independent experiments and are shown as the mean percentage increase \pm S.E. $n =$ four mice; no stim, no stimulation; * $P < 0.05$.

Alternatively, these cells were cultured in the presence of live *T. crassiceps*, which was either in direct contact with the macrophages or in a transwell culture system. After this step, the media was removed and the macrophages were stimulated with rm IFN- γ in fresh medium. Strikingly, only naïve macrophages exposed to TcES displayed a significant defect in IFN- γ -mediated STAT1 phosphorylation (Fig. 5A). Furthermore, we performed assays to determine whether the macrophages exposed to TcES express a similar pattern of molecules as those observed in macrophages from *T. crassiceps*-infected mice. Interestingly, the macrophages exposed to TcES displayed increased expression of SOCS3 and SHP-1 (Fig. 5B and C).

3.6. *Taenia crassiceps* infection also down-regulates IFN- γ -mediated STAT1 phosphorylation in splenocytes

Next, we wanted to determine whether *T. crassiceps* infection modulates other cell populations that are not close to the site of infection. Thus, splenocytes from *T. crassiceps*-infected or naïve mice were stimulated with rm IFN- γ , and STAT1 phosphorylation

was evaluated. As expected, the splenocytes from the *T. crassiceps*-infected mice showed significantly lower levels of STAT1 phosphorylation (Fig. 6A). In line with our data on macrophages, the splenocytes from the infected mice also displayed increased expression of SOCS3 (Fig. 6B). Moreover, orthovanadate treatment in these cultures induced a trend to restore STAT1 phosphorylation in response to IFN- γ (Fig. 6C), however, this recovery did not reach statistical significance ($P = 0.09$).

3.7. Human PBMCs exposed to TcES display altered STAT1 phosphorylation in response to recombinant human IFN- γ

Finally, we examined whether our findings in the murine system could be translated to human cells. To this end, PBMCs from healthy individuals were exposed to TcES for 3 days. Interestingly, the human cells exposed to TcES displayed reduced STAT1 phosphorylation in response to IFN- γ (Fig. 7A). Furthermore, orthovanadate treatment of these cells significantly improved STAT1 phosphorylation (Fig. 7B).

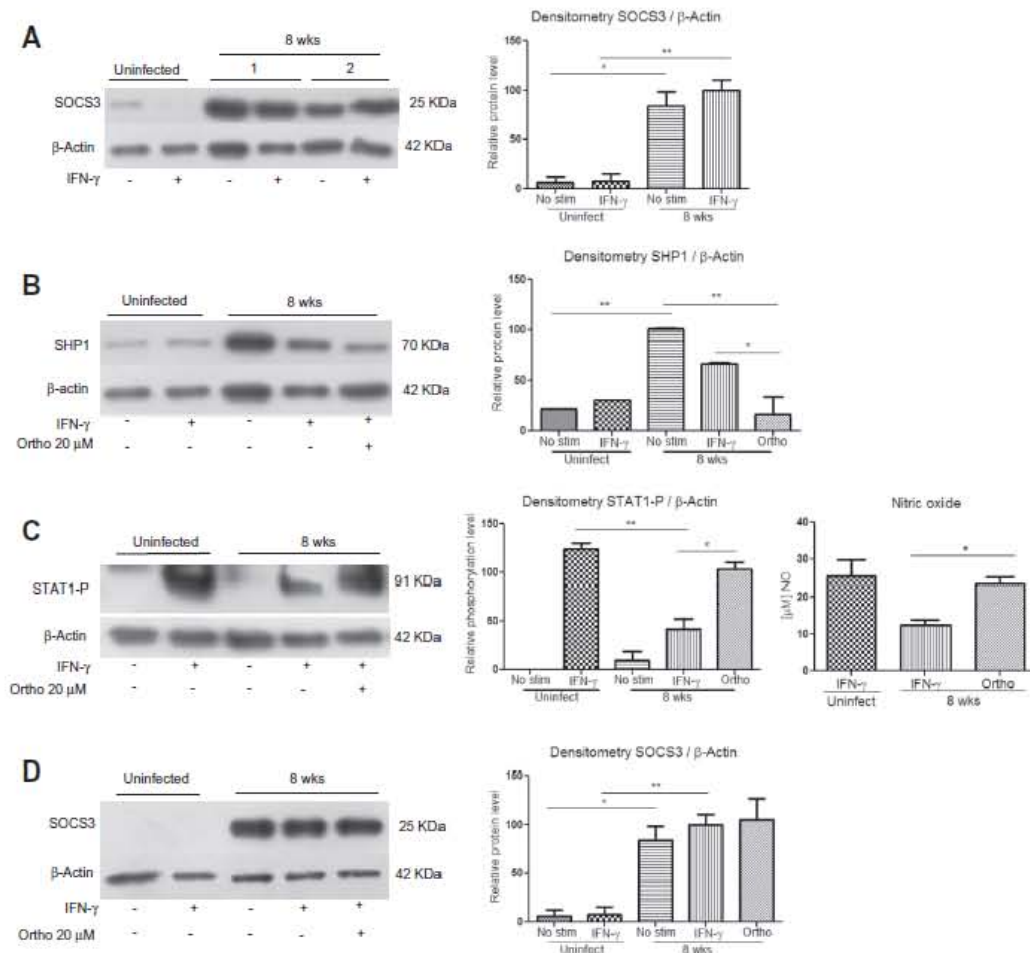


Fig. 4. *Taenita crassiceps* infection induces the expression of SOCS3 and SHP-1 in murine peritoneal macrophages, and orthovanadate (ortho) treatment restores STAT1 phosphorylation. Peritoneal macrophages from uninfected or *T. crassiceps*-infected mice were processed as described in Section 2.3, and Western blots were performed for SOCS3 (A, D) SHP-1 (B) and phosphorylated STAT1 (C). Supernatants from 24 h cultures were analyzed for nitric oxide detection (C). The densitometry analysis for each is shown next to the blot. The data in the graphs are combined from three independent experiments and are shown as the mean percentage increase \pm S.E. $n =$ six mice; no stim, no stimulation; * $P < 0.05$.

4. Discussion

Previous studies have demonstrated that different helminth parasites and their derived antigens are able to modulate immune responses in their hosts through a variety of pathways (Pearce and Reiner, 1995; Maizels et al., 2004). Although great efforts have been made to understand the mechanisms involved in this immunomodulation, most are not well understood or known. While the modulation of IFN- γ -mediated host immune responses has been reported for a number of different pathogens, such as viruses, bacteria and intracellular parasites (Ting et al., 1999; Baron and Davignon, 2008; Esquivel-Solis et al., 2009; Matte and Descoteaux, 2010; Senft et al., 2010; Nallaparaju et al., 2011; Schneider et al., 2013), this type of immunomodulation has not been extensively investigated during helminth infections. Nevertheless, there are several studies indicating that macrophages obtained from hosts with helminth infections are refractory to inflammatory stimuli such as LPS and IFN- γ (Kuroda et al., 2001;

Rodriguez-Sosa et al., 2002; Mylonas et al., 2009), but further details are not yet available.

Here, using *T. crassiceps* cysticercosis as a model of helminth infection, we studied its ability to inhibit a key signaling pathway, i.e., STAT1 phosphorylation, in response to IFN- γ . Our findings indicate a possible new mechanism for helminth immunoregulation, given that chronic infection with *T. crassiceps* reduced STAT1 phosphorylation in response to similar or even higher concentrations of rm IFN- γ than are required to produce a response in naïve and early *T. crassiceps*-infected mouse-derived peritoneal macrophages. These results demonstrate that helminth infection interferes with IFN- γ signaling in macrophages. Interestingly, in contrast with reports on protozoan parasites such as *Leishmania* (Ray et al., 2000), in our model we did not find decreased IFN- γ R α expression, an important signal transducing component of the IFN- γ R complex (Gough et al., 2008), indicating that other downstream components of this signaling pathway were altered. In fact, this effect was not due to a global inhibition of STAT activity, as macrophages

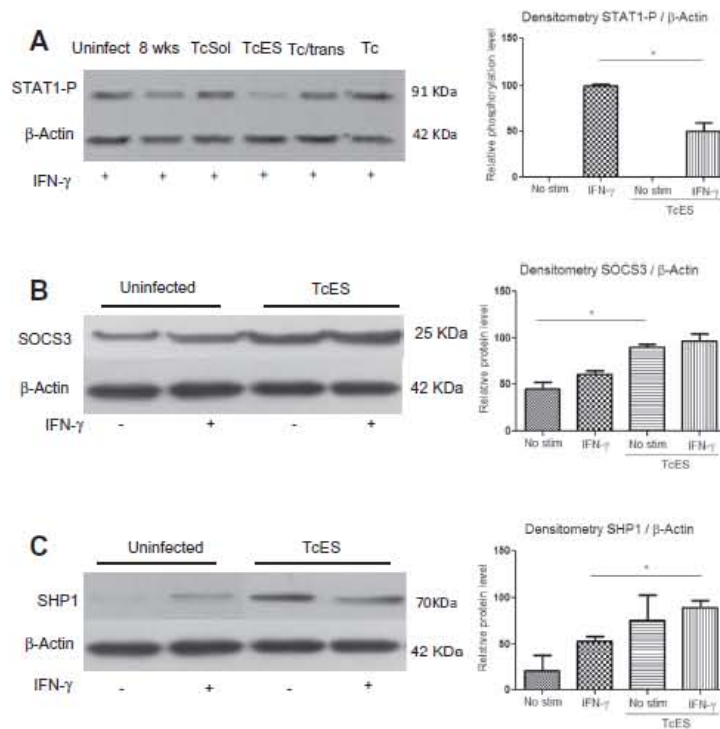


Fig 5. *Taenia crassiceps* excreted/secreted products inhibit STAT1 phosphorylation and induce SOCS3 and SHP1 expression in murine macrophages. Peritoneal macrophages were obtained from naïve mice and exposed to different conditions as stated in Section 2.3. (A) Western blot and densitometry analysis of phosphorylated STAT1 of macrophages exposed to *T. crassiceps* excreted/secreted and stimulated with IFN- γ . (B) SOCS3 expression and densitometry analysis in response to *T. crassiceps* excreted/secreted exposure. (C) SHP-1 expression and densitometry analysis in response to *T. crassiceps* excreted/secreted exposure. With the exception of A, the data in the graphs are combined from three independent experiments and are shown as the mean percentage increase \pm S.E. $n = 4$ mice; TcSol, *T. crassiceps* soluble antigens; Tc/trans, *T. crassiceps* and transwells; Tc, *T. crassiceps*; no stim, no stimulation; * $P < 0.05$.

from *T. crassiceps*-infected mice responded to IL-4 treatment with higher levels of STAT6 phosphorylation than macrophages from naïve mice, suggesting that a more complex mechanism is involved in this regulation. For instance, the main JAK target for SHP-1 has been demonstrated to be JAK2 (Jiao et al., 1996), which does not participate in IL-4 signaling or STAT6 phosphorylation, and this may explain why the phosphorylation of STAT1, but not STAT6, is inhibited (Gordon and Martínez, 2010; Kiu and Nicholson, 2012). Another possibility for the inhibition of STAT1 phosphorylation by *T. crassiceps* infection, already demonstrated for some intracellular pathogens, is the reduced expression of the total STAT1 protein (Bhardwaj et al., 2005). This possibility was ruled out because according to our Western blot assays, total STAT1 was unaltered during this helminth infection.

Two major classes of negative regulators of the JAK/STAT signaling pathway, SOCS and PTPs, were analyzed. We found that while SOCS1 was not detected in either naïve or infected macrophages, SOCS3 was remarkably induced even under basal conditions in macrophages from *T. crassiceps*-infected mice. Despite this finding, SOCS3 has not been shown to be involved in the inhibition of IFN- γ or STAT1 signaling (Bertholet et al., 2003). Thus, another putative inhibitor of this signal was sought. We analyzed the expression of SHP-1, a phosphatase that is mainly expressed in macrophages, DCs and various hematopoietic cells (Wu et al., 2003; Tsui et al., 2006). SHP-1 has been suggested to regulate macrophage activation. In fact, macrophages from mice lacking SHP-1 are hyper-responsive to inflammatory stimuli, indicating that SHP-1 may

negatively regulate macrophage activation (Yu et al., 2005). In the present study, Western blot analysis of SHP-1 in macrophages revealed a reciprocal expression pattern for SHP-1 and pSTAT1, such that higher constitutive levels of SHP-1 in macrophages from *T. crassiceps*-infected mice correlated with lower pSTAT1 levels compared with macrophages of uninfected mice. This marked expression of SHP-1 in macrophages close to the site of infection suggests a role for this phosphatase in the inhibition of STAT1-mediated IFN- γ signaling. To test this hypothesis, macrophages were cultured in the presence of the phosphatase inhibitor orthovanadate. Interestingly, macrophages exposed to orthovanadate maintained their SOCS3 expression but showed markedly diminished SHP-1 expression, which was associated with a significant recovery in STAT1 phosphorylation, indicating an important role for SHP-1 in negatively regulating macrophage activation during *T. crassiceps* infection and suggesting a SOCS3-independent mechanism. This is in line with previous reports demonstrating that SHP-1 is responsible for the negative regulation of many signaling pathways in all hematopoietic cell types by limiting the activation of the JAK/STAT pathways following cytokine receptor stimulation (Bach et al., 1997). Interestingly, this inhibitory mechanism has only been demonstrated in a few pathogens such as *Mycobacterium*, *Trypanosoma* and a virus, (Coller et al., 2003; Esquivel-Solis et al., 2009; Trilling et al., 2014). This list also includes the protozoan parasite *Leishmania*, as different researchers have demonstrated that PTPs in macrophages are activated very rapidly after exposure to *L. donovani* promastigotes and this correlates with

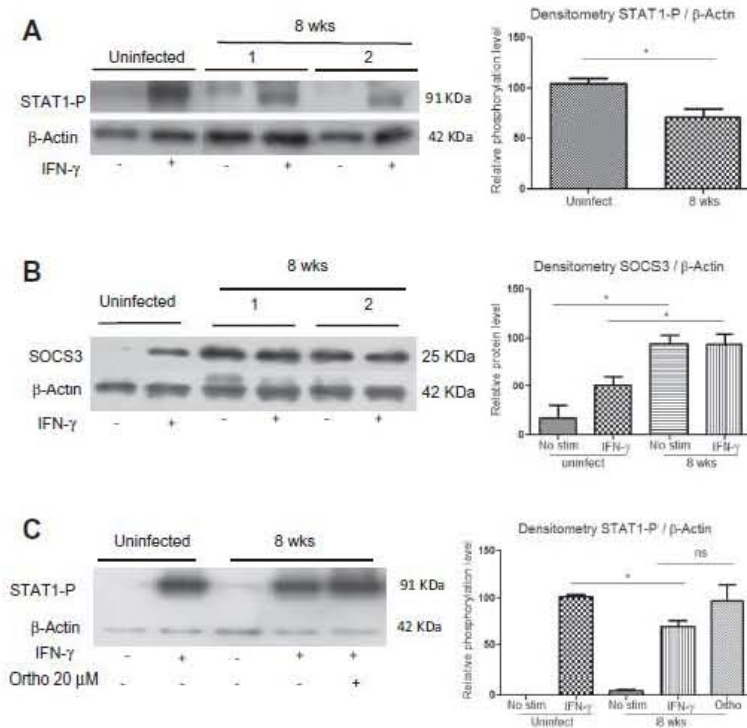


Fig. 6. *Taenia crassiceps* infection also impairs IFN- γ -mediated STAT1 phosphorylation in murine splenocytes. Splenocytes from uninfected or *T. crassiceps*-infected mice (8 weeks p.i.) were stimulated with 20 ng/mL of IFN- γ for 20 min and analyzed for (A) STAT1 phosphorylation, (B) SOCS3 expression, (C) Effect of phosphatase inhibition with orthovanadate (ortho) on STAT1 phosphorylation in splenocytes. The data in the graphs are combined from three independent experiments and are shown as the mean percentage increase \pm S.E. $n = 6$ mice; ns = not significant; no stim, no stimulation; * $P < 0.05$.

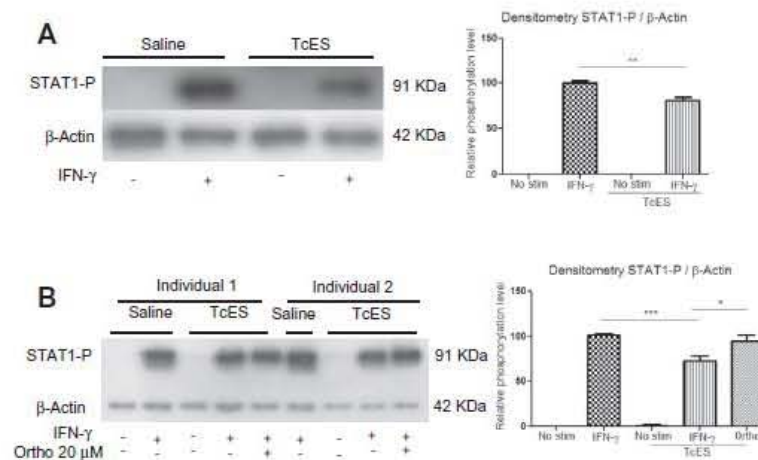


Fig. 7. Exposure of human peripheral blood mononuclear cells to *Taenia crassiceps* excreted/secreted products (TcES) alters STAT1 phosphorylation. Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were exposed to *T. crassiceps* excreted/secreted products for 3 days, washed and stimulated with recombinant human IFN- γ (20 ng/mL) for 20 min (A) in the presence or absence of 20 μ M orthovanadate (ortho) (B). The cell lysates were processed for Western blot analysis of STAT1 phosphorylation and β -actin. The data in the graphs are combined from two independent experiments and are shown as the mean percentage increase \pm S.E. $n = 9$ individuals for A and $n = 6$ individuals for B; no stim, no stimulation; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$.

the rapid, general tyrosine dephosphorylation of high-molecular-weight proteins (Gomez and Olivier, 2010). In leishmaniasis, SHP-1 is the most important component of this PTP activation

(Forget et al., 2006; Isnard et al., 2012). Moreover, a specific glycoprotein from *Leishmania* called GP53 activates PTPs in macrophages, including SHP-1, without the necessity of a complete

infection (Isnard et al., 2012). Thus, products derived from a unicellular parasite have been shown to directly modify the inflammatory capacity of the host cell.

Following this line of thought, we previously documented that TcES are able to modulate the activities of inflammatory DCs (Terrazas et al., 2010, 2013). Therefore, we decided to test whether TcES directly modifies the response of naïve macrophages to IFN- γ . We showed, for the first time, that a helminth-derived product is able to inhibit IFN- γ signaling in macrophages by blocking STAT1 phosphorylation after acute exposure to TcES. In this respect, it is noteworthy that TcES, similar to helminth infection, induced the expression of two JAK/STAT signaling blockers, SOCS3 and SHP-1. Furthermore, the addition of orthovanadate to the cell cultures greatly inhibited the effects of TcES on STAT1 phosphorylation without affecting SOCS3 expression, and importantly reestablished NO production; these findings are in line with previous reports on intracellular parasites (Blanchette et al., 2009). Together, these data suggest that helminth infections and their derived products may exploit phosphatases as negative regulators of signaling pathways during inflammatory stimulation. Moreover, SOCS3 may also participate in other regulatory activities during macrophage or DC stimulation when exposed to helminth antigens. Another possibility, that was not explored here, may be an increased expression of protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) which could also interfere with downstream pSTAT1 activities (Liao et al., 2000). To date, this is the first study demonstrating that a helminth infection and its excreted/secreted products attenuate STAT1-mediated signaling in macrophages; however, it is not clear whether other species of helminths also interfere with IFN- γ signaling in macrophages and whether a similar mechanism is used. Previous studies have demonstrated other types of modulation by helminths and their derived antigens, such as inhibition of DC maturation (Terrazas et al., 2010), blockade of receptors and resistance to LPS stimulation (Hubner et al., 2013), but mechanistically, only blockade of NF κ B activation mediated by c-Raf phosphorylation has been demonstrated to modulate DC maturation (Terrazas et al., 2013). Thus, our findings reveal a new point of view as to how helminth infections may exert their anti-inflammatory activity and how this may be related to their use as a treatment for autoimmune and inflammatory diseases.

Another interesting finding of the present study was that splenic cells were similarly affected in their ability to respond to IFN- γ by *T. crassiceps* infection. This finding suggests a wider modulatory activity for this infection. However, a more valuable observation was the fact that human PBMCs were also susceptible to the TcES-induced down-regulation of STAT1 phosphorylation. These results point to the possible translational application of these molecules in the near future. These remarkable findings are interesting because most of the studies examining PTP induction by intracellular infections or GP63 have been performed in transformed cell lines, while all of our data here were obtained with primary cell cultures.

Whether specific derived products of helminths have a role in modulating or triggering other cell signaling pathways is a field that should be explored. It is possible that helminth-derived molecules affect different cell populations and exert distinct effects. It is now clear that in addition to DC maturation and activity, helminths and their products can modulate the macrophage response to inflammatory stimuli (Jenkins and Allen, 2010), favor Th2 development (Allen and Maizels, 2011), and increase mast cell activity (Hepworth et al., 2012). However, their role in modulating neutrophil activity is unknown. Neutrophils are also a very important population in inflammatory diseases and controlling their activity may be another useful target for helminth-derived products. Here, we found that TcES are able to induce SHP-1 expression in macrophages, therefore, how TcES induce PTP activation is clearly the subject of another study.

In summary, this study provides novel observations describing the mechanisms underlying the helminth- and helminth-derived molecules-induced suppression of IFN- γ signaling, which is important for inflammatory responses. The development of a better understanding of the immunomodulation of these infections will help to guide new approaches to future therapeutic intervention strategies for inflammatory diseases. Furthermore, the functional consequences of SOCS3 induction by *T. crassiceps* infection or its products, as well as possibly other helminth infections, have not been addressed. Further studies detailing the effects of *Taenia* and other helminths on macrophage activity will also be of great interest.

Acknowledgements

This work was supported by the following grants: CONACYT 167799 and PAPIIT-UNAM IN213512. This study is part of the academic requirements for Mireya Becerra-Díaz to obtain her PhD degree in the Program Doctorado en Ciencias Biológicas at Universidad Nacional Autónoma de México, México. MBD holds a CONACYT fellowship. The authors would like to thank Leticia Flores and Tomas Villamar for their excellent support in the animal care facilities.

References

- Allen, J.E., Maizels, R.M., 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 375–388.
- Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R.D., 1997. The ifn gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563–591.
- Baron, M., Davignon, J.L., 2008. Inhibition of ifn-gamma-induced stat1 tyrosine phosphorylation by human cmv is mediated by shp2. *J. Immunol.* 181, 5530–5536.
- Berthelot, S., Dickensheets, H.L., Sheikh, F., Gam, A.A., Donnelly, R.P., Kenney, R.T., 2003. *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect. Immun.* 71, 2095–2101.
- Bhardwaj, N., Rosas, L.E., Lafuse, W.P., Satoskar, A.R., 2005. *Leishmania* inhibits stat1-mediated ifn-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative stat1beta by *Leishmania mexicana*. *Int. J. Parasitol.* 35, 75–82.
- Blanchette, J., Abu-Dayyeh, I., Hassani, K., Whitcombe, L., Olivier, M., 2009. Regulation of macrophage nitric oxide production by the protein tyrosine phosphatase src homology 2 domain phosphotyrosine phosphatase 1 (shp-1). *Immunology* 127, 123–133.
- Coller, S.P., Mansfield, J.M., Paulnock, D.M., 2003. Glycosylinositolphosphate soluble variant surface glycoprotein inhibits ifn-gamma-induced nitric oxide production via reduction in stat1 phosphorylation in african trypanosomiasis. *J. Immunol.* 171, 1466–1472.
- Coope, P.J., Chico, M., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Levine, M.M., Griffin, G.E., Nutman, T.B., 2001. Human infection with *Acanthamoeba lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin b subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine cvd 103-hgr. *Infect. Immun.* 69, 1574–1580.
- Christophi, G.P., Panos, M., Hudson, C.A., Christophi, R.L., Gruber, R.C., Mersich, A.T., Blystone, S.D., Jubelt, B., Massa, P.T., 2009. Macrophages of multiple sclerosis patients display deficient shp-1 expression and enhanced inflammatory phenotype. *Lab. Invest.* 89, 742–759.
- Donnelly, S., O'Neill, S.M., Sekiya, M., Mulcahy, G., Dalton, J.P., 2005. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect. Immun.* 73, 166–173.
- Elias, D., Wolday, D., Akuffo, H., Petros, B., Bronner, U., Britton, S., 2001. Effect of dorming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille calmette-guerin (bcg) vaccination. *Clin. Exp. Immunol.* 123, 219–225.
- Esquivel-Solis, H., Quinones-Falconi, F., Zarain-Herzberg, A., Amieva-Fernandez, R.L., Lopez-Vidal, Y., 2009. Impaired activation of stat1 and c-jun as a possible defect in macrophages of patients with active tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 158, 45–54.
- Federici, M., Giustizieri, M.L., Scarponi, C., Girolomoni, G., Albanesi, C., 2002. Impaired ifn-gamma-dependent inflammatory responses in human keratinocytes overexpressing the suppressor of cytokine signaling 1. *J. Immunol.* 169, 434–442.
- Forget, G., Gregory, D.J., Whitcombe, L.A., Olivier, M., 2006. Role of host protein tyrosine phosphatase shp-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect. Immun.* 74, 6272–6279.

- Gomez, M.A., Olivier, M., 2010. Proteases and phosphatases during *Leishmania*-macrophage interaction: paving the road for pathogenesis. *Virulence* 1, 314–318.
- Gordon, S., Martínez, F.O., 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunology* 32, 593–604.
- Gough, D.J., Levy, D.E., Johnstone, R.W., Clarke, C.J., 2008. Ifngamma signaling—does it mean jak-stat? *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 383–394.
- Greenhalgh, C.J., Hilton, D.J., 2001. Negative regulation of cytokine signaling. *J. Leukoc. Biol.* 70, 348–356.
- Harnett, W., McInnes, I.B., Harnett, M.M., 2004. Es-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential. *Immunol. Lett.* 94, 27–33.
- Hartgers, F.C., Yazdanbakhsh, M., 2006. Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. *Parasite Immunol.* 28, 497–506.
- Hepworth, M.R., Maurer, M., Hartmann, S., 2012. Regulation of type 2 immunity to helminths by mast cells. *Gut Microbes* 3, 476–481.
- Herbst, S., Schauble, U.E., Schneider, B.E., 2011. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS ONE* 6, e19105.
- Hübner, M.P., Layland, L.E., Hoerauf, A., 2013. Helminths and their implication in sepsis – a new branch of their immunomodulatory behaviour? *Pathog Dis* 69, 127–141.
- Imai, K., Kurita-Ochiai, T., Ochiai, K., 2003. *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin infection promotes socs induction and inhibits ifn-gamma-stimulated jak/stat signaling in J774 macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 173–180.
- Isnard, A., Shio, M.T., Olivier, M., 2012. Impact of *Leishmania* metalloprotease gp63 on macrophage signaling. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2, 72.
- Jenkins, S.J., Allen, J.E., 2010. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *J. Biomed. Biotechnol.* 202609.
- Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Platanius, L.C., Yi, T., 1996. Direct association with and dephosphorylation of jak2 kinase by the sh2-domain-containing protein tyrosine phosphatase shp-1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6985–6992.
- Kamal, S.M., Rasenack, J.W., Bianchi, L., Al Tawil, A., El Sayed Khalifa, K., Peter, T., Mansour, H., Ezzat, W., Koziel, M., 2001. Acute hepatitis c without and with schistosomiasis: correlation with hepatitis c-specific cd4(+) t-cell and cytokine response. *Gastroenterology* 121, 646–656.
- Khan, I.A., Moretto, M., 1999. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine encephalitozoon cuniculi infection. *Infect. Immun.* 67, 1887–1893.
- Kiu, H., Nicholson, S.E., 2012. Biology and significance of the jak/stat signalling pathways. *Growth Factors* 30, 88–106.
- Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G., Lodish, H.F., 1995. Specific recruitment of sh-ptp1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of jak2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80, 729–738.
- Kundu, K., Dutta, K., Nazmi, A., Basu, A., 2013. Japanese encephalitis virus infection modulates the expression of suppressors of cytokine signaling (socs) in macrophages: Implications for the hosts' innate immune response. *Cell. Immunol.* 285, 100–110.
- Kuroda, E., Yoshida, Y., En Shan, B., Yamashita, U., 2001. Suppression of macrophage interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha production in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasite Immunol.* 23, 305–311.
- Le Hesran, J.Y., Akiana, J., Ndiaye el, H.M., Dia, M., Senghor, P., Konate, L., 2004. Severe malaria attack is associated with high prevalence of *Ascaris lumbricoides* infection among children in rural senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 397–399.
- Liao, J., Fu, Y., Shuai, K., 2000. Distinct roles of the nh2- and cooh-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (stat) 1 (pias1) in cytokine-induced pias1-stat1 interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5267–5272.
- Liu, B.A., Jablonowski, K., Raina, M., Arce, M., Pawson, T., Nash, P.D., 2006. The human and mouse complement of sh2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. *Mol. Cell* 22, 851–868.
- Luder, C.G., Walter, W., Beuerle, B., Mauerer, M.J., Gross, U., 2001. *Toxoplasma gondii* down-regulates mhc class ii gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of stat1alpha. *Eur. J. Immunol.* 31, 1475–1484.
- Madonna, S., Scarponi, C., De Pita, O., Albanesi, C., 2008. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits ifn-gamma inflammatory signaling in human keratinocytes by sustaining erk1/2 activation. *FASEB J.* 22, 3287–3297.
- Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D., Allen, J.E., 2004. Helminth parasites—masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201, 89–116.
- Maizels, R.M., Yazdanbakhsh, M., 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 733–744.
- Martínez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453–461.
- Matte, C., Descoteaux, A., 2010. *Leishmania donovani* amastigotes impair gamma interferon-induced stat1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between stat1alpha and importin-alpha5. *Infect. Immun.* 78, 3736–3743.
- Mylonas, K.J., Nair, M.G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D., Allen, J.E., 2009. Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J. Immunol.* 182, 3084–3094.
- Nakagawa, R., Naka, T., Tsutsui, H., Fujimoto, M., Kimura, A., Abe, T., Seki, E., Sato, S., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., Yamanishi, K., Kawase, I., Nakanishi, K., Kishimoto, T., 2002. Socs-1 participates in negative regulation of lps responses. *Immunity* 17, 677–687.
- Nallaparaju, K.C., Yu, J.J., Rodriguez, S.A., Zogaj, X., Manam, S., Guentzel, M.N., Seshu, J., Murthy, A.K., Chambers, J.P., Klose, K.E., Arulanandam, B.P., 2011. Evasion of ifn-gamma signaling by *Francisella novicida* is dependent upon francisella outer membrane protein c. *PLoS ONE* 6 (3), e18201.
- Neel, B.G., 1993. Structure and function of sh2-domain containing tyrosine phosphatases. *Semin. Cell Biol.* 4, 419–432.
- Neznanov, N., Neznanova, L., Kondratov, R.V., O'Rourke, D.M., Ullrich, A., Gudkov, A.V., 2004. The ability of protein tyrosine phosphatase shp-1 to suppress nfkappa can be inhibited by dominant negative mutant of sirpalpha. *DNA Cell Biol.* 23, 175–182.
- Nookala, S., Srinivasan, S., Kaliraj, P., Narayanan, R.B., Nutman, T.B., 2004. Impairment of tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human lymphatic filariasis. *Infect. Immun.* 72, 2598–2604.
- Okano, M., Nishizaki, K., Abe, M., Wang, M.M., Yoshino, T., Satoskar, A.R., Masuda, Y., Haro Jr., D.A., 1999. Strain-dependent induction of allergic rhinitis without adjuvant in mice. *Allergy* 54, 593–601.
- Oshiro, T.M., Macedo, M.S., Macedo-Souares, M.F., 2005. Anti-inflammatory activity of pas-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm. Res.* 54, 17–21.
- Pearce, E.J., Reiner, S.L., 1995. Induction of th2 responses in infectious diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 497–504.
- Ray, M., Gam, A.A., Boykins, R.A., Kenney, R.T., 2000. Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.* 181, 1121–1128.
- Reyes, J.L., Terrazas, C.A., Vera-Arias, L., Terrazas, L.I., 2009. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Toenia crassiceps* infection. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1115–1127.
- Rodríguez-Sosa, M., Satoskar, A.R., Calderon, R., Gomez-García, L., Saavedra, R., Bojalil, R., Terrazas, L.I., 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of ccr5 with low interleukin-12 production and th2-biasing ability. *Infect. Immun.* 70, 3656–3664.
- Sabin, E.A., Araujo, M.L., Carvalho, E.M., Pearce, E.J., 1996. Impairment of tetanus toxin-specific th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.* 173, 269–272.
- Schindler, C., Strehlow, L., 2000. Cytokines and stat signaling. *Adv. Pharmacol.* 47, 113–174.
- Schneider, A.G., Abi Abdallah, D.S., Butcher, B.A., Denkers, E.Y., 2013. *Toxoplasma gondii* triggers phosphorylation and nuclear translocation of dendritic cell stat1 while simultaneously blocking ifngamma-induced stat1 transcriptional activity. *PLoS ONE* 8, e60215.
- Senft, A.P., Taylor, R.H., Lei, W., Campbell, S.A., Tipper, J.L., Martínez, M.J., Witt, T.L., Clay, C.C., Harrod, K.S., 2010. Respiratory syncytial virus impairs macrophage ifn-alpha/beta- and ifn-gamma-stimulated transcription by distinct mechanisms. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 404–414.
- Smeltz, R.B., Chen, J., Ehrhardt, R., Shevach, E.M., 2002. Role of ifn-gamma in th1 differentiation: ifn-gamma regulates il-18r alpha expression by preventing the negative effects of il-4 and by inducing/maintaining il-12 receptor beta 2 expression. *J. Immunol.* 168, 6165–6172.
- Sokhna, C., Le Hesran, J.Y., Mbaye, P.A., Akiana, J., Camara, P., Diop, M., Ly, A., Druilhe, P., 2004. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. *Malar. J.* 3, 43.
- Steinfelder, S., Andersen, J.F., Cannons, J.L., Feng, C.G., Joshi, M., Dwyer, D., Caspar, P., Schwartzberg, P.L., Sher, A., Jankovic, D., 2009. The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for th2 polarization is a t2 ribonuclease (omega-1). *J. Exp. Med.* 206, 1681–1690.
- Stoiber, D., Kovarik, P., Cohnen, S., Johnston, J.A., Steinlein, P., Decker, T., 1999. Lipopolysaccharide induces the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor ifn-gamma. *J. Immunol.* 163, 2640–2647.
- Strebosky, J., Walker, P., Lang, R., Dalpke, A.H., 2011. Suppressor of cytokine signaling 1 (socs1) limits nfkappa signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. *FASEB J.* 25, 862–874.
- Taylor, G.A., Feng, C.G., Sher, A., 2007. Control of ifn-gamma-mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-related gtpases (p47 gtpases). *Microbes Infect.* 9, 1644–1651.
- Taylor, M.J., Cross, H.F., Bilo, K., 2000. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic wolbachia bacteria. *J. Exp. Med.* 191, 1429–1436.
- Taylor, M.J., Cross, H.F., Mohammed, A.A., Trees, A.J., Bianco, A.E., 1996. Susceptibility of *Brugia malayi* and *Onchocerca flexilis* microfilariae to nitric oxide and hydrogen peroxide in cell-free culture and from ifn gamma-activated macrophages. *Parasitology* 112, 315–322.
- Terrazas, C.A., Alcantara-Hernandez, M., Bonifaz, L., Terrazas, L.I., Satoskar, A.R., 2013. Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on dcs to block the tr response and bias th2 polarization in a craf dependent pathway. *FASEB J.* 27, 4547–4560.
- Terrazas, C.A., Gomez-García, L., Terrazas, L.I., 2010a. Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased th2-biasing ability of dendritic cells exposed to taenia excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for stat6 signaling. *Int. J. Parasitol.* 40, 1051–1062.
- Terrazas, C.A., Sanchez-Munoz, F., Mejia-Dominguez, A.M., Amezcua-Guerra, L.M., Terrazas, L.I., Bojalil, R., Gomez-García, L., 2011. Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit lps inflammatory responses in human dendritic cells. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1391–1400.
- Terrazas, C.A., Terrazas, L.I., Gomez-García, L., 2010b. Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 357106.

- Terrazas, L.I., 2008. The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. *Curr. Top. Med. Chem.* 8, 383–392.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C., 1998. Shift from an early protective th1-type immune response to a late permissive th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84, 74–81.
- Ting, L.M., Kim, A.C., Cattamanchi, A., Ernst, J.D., 1999. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits ifn-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of stat1. *J. Immunol.* 163, 3898–3906.
- Trilling, M., Le, V.T., Rashidi-Alavijeh, J., Katschinski, B., Scheller, J., Rose-John, S., Androsiac, G.E., Jonjic, S., Poli, V., Pfeffer, K., Hengel, H., 2014. "Activated" stat proteins: A paradoxical consequence of inhibited jak-stat signaling in cytomegalovirus-infected cells. *J. Immunol.* 192, 447–458.
- Tsui, F.W., Martin, A., Wang, J., Tsui, H.W., 2006. Investigations into the regulation and function of the sh2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, shp-1. *Immunol. Res.* 35, 127–136.
- van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F., Kruije, Y.C., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., Tielens, A.G., Yazdanbakhsh, 2002. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.* 277, 48122–48129.
- Villa, O.F., Kuhn, R.E., 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of th1-associated phenomena. *Parasitology* 112, 561–570.
- Walson, J.L., John-Stewart, G., 2007. Treatment of helminth co-infection in individuals with hiv-1: A systematic review of the literature. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1, e102.
- Wu, C., Sun, M., Liu, L., Zhou, G.W., 2003. The function of the protein tyrosine phosphatase shp-1 in cancer. *Gene* 30, 1–12.
- Yu, W.M., Wang, S., Keegan, A.D., Williams, M.S., Qu, C.K., 2005. Abnormal th1 cell differentiation and ifn-gamma production in t lymphocytes from motheaten viable mice mutant for src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1. *J. Immunol.* 174, 1013–1019.
- Zimmermann, S., Murray, P.J., Heeg, K., Dalpke, A.H., 2006. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking ifn-gamma signaling. *J. Immunol.* 176, 1840–1847.

STAT1 es determinante en el desarrollo de macrófagos alternativamente activados y en el reclutamiento de células mieloides Ly6C⁺ y Ly6G⁺ durante la infección con el helminto *Taenia crassiceps*.

Becerra-Díaz M, Ledesma-Soto Y, Satoskar AR, Terrazas LI. (2014). Signal transducer and activator of transcription 1 is determinant in the alternative activation of macrophages and the recruitment of myeloid Ly6C⁺ and Ly6G⁺ cells in a helminth infection.

Dado que anteriormente se demostró que la fosforilación de STAT1 es importante en la respuesta inmune frente a *T. crassiceps* y que la infección crónica con este helminto logra regular negativamente la capacidad de macrófagos y células de bazo murinos para fosforilar STAT1 frente al estímulo con IFN- γ , en este trabajo quisimos analizar como la ausencia de esta molécula afecta el curso de esta infección, modificando la resistencia o susceptibilidad a la misma, así como el desarrollo de la respuesta inmune.

Los ratones STAT1^{-/-} desarrollan una menor carga parasitaria que los STAT1^{+/+}, lo que demuestra una mayor resistencia a la infección con *T. crassiceps* a pesar de tener afectada la capacidad de desarrollar una respuesta Th1.

Como se mencionó anteriormente, la infección crónica con *T. crassiceps* induce una disminución de la fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ en diversas células de ratones susceptibles BALB/c, lo que sugiere que la activación de este factor de transcripción es importante en la resistencia frente a la infección por este helminto.

Para analizar más detalladamente la participación de STAT1 en la respuesta inmune frente a *T. crassiceps* se infectaron ratones hembras y machos STAT1^{-/-} y STAT1^{+/+} (Fig. 1A) con fondo genético BALB/c. Después de 8 semanas de infección, los ratones se sacrificaron y se colectaron los cisticercos para su conteo. Los ratones deficientes en STAT1 desarrollaron una menor carga parasitaria que sus contrapartes STAT1^{+/+}, demostrando inesperadamente una mayor resistencia a la infección (Fig. 1B).

Anteriormente se ha relacionado a la respuesta Th1 con resistencia a esta infección (Terrazas et al. 1998), de tal manera se buscó determinar si la mayor resistencia presentada por los

ratones STAT1^{-/-} se podía relacionar con una respuesta Th1 incrementada. Para ello se realizó el análisis de anticuerpos específicos IgG1 (perfil Th2) e IgG2a (perfil Th1) contra *T. crassiceps* en muestras de suero de ratones STAT1^{-/-} y STAT1^{+/+} no infectados y de 8 semanas de infección. En estos experimentos se encontró que los ratones deficientes de STAT1 presentaron niveles similares de anticuerpos IgG1 relacionados con un perfil Th2 (Fig. 1C) pero su producción de anticuerpos específicos IgG2a, los cuales se relacionan con una respuesta de tipo Th1, fue significativamente menor que en los ratones STAT1^{+/+}.

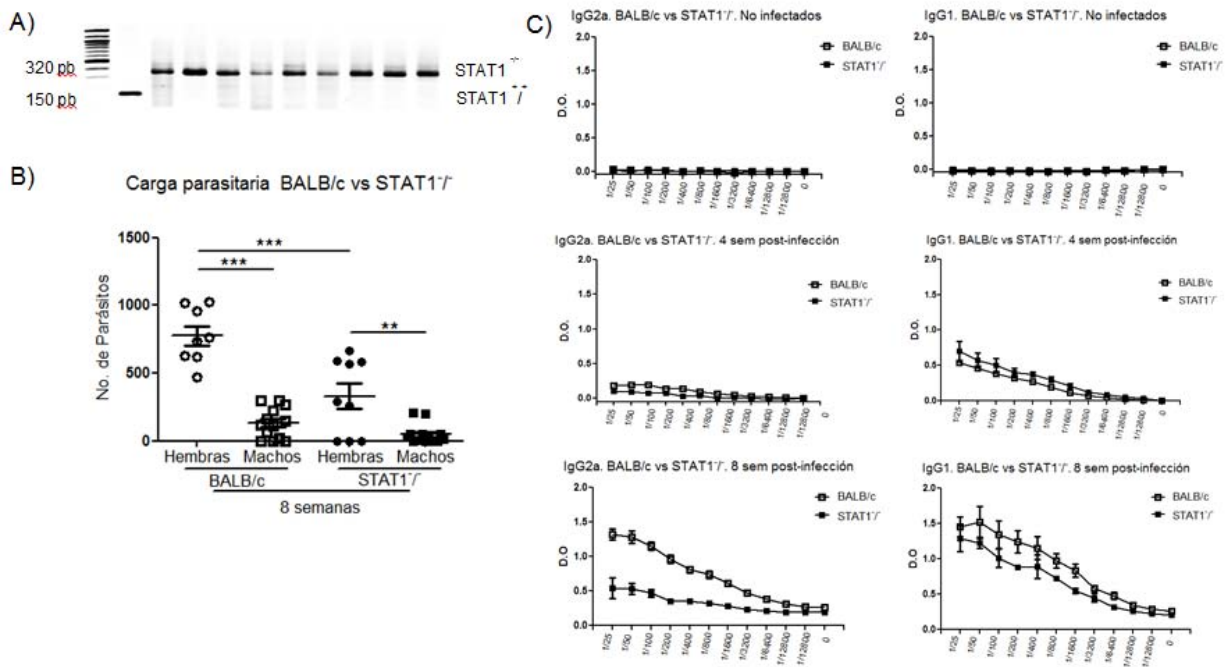


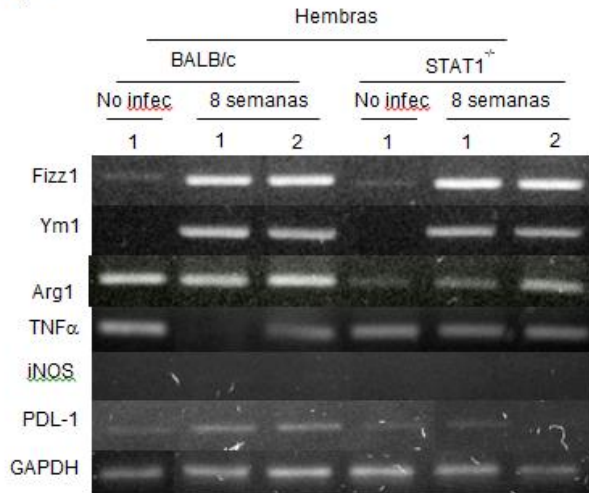
Figura 1. Los ratones STAT1^{-/-} son más resistentes a la infección con *T. crassiceps* que los ratones BALB/c STAT1^{+/+} a pesar de presentar una respuesta inmune Th1 disminuida. Se infectaron o no ratones BALB/c y STAT1^{-/-} con 10 metacístodos de *T. crassiceps* y 8 semanas después se realizó el conteo de la carga parasitaria. A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de ratones BALB/c STAT1^{+/+} and STAT1^{-/-} para genotipo. B) Carga parasitaria a las 8 semanas de infección de ratones hembras y machos BALB/c STAT1^{+/+} y STAT1^{-/-}. C) Se obtuvo suero de los diferentes grupos de ratones mediante centrifugación de sangre periférica. Análisis en suero de anticuerpos IgG2a e IgG1 totales contra el antígeno soluble de *T. crassiceps* por ELISA. Los datos en las gráficas son la combinación de tres experimentos diferentes y se muestran como el promedio del título de anticuerpos ± SE. n = ocho ratones; *P < 0.05; **P < 0.01.

Los macrófagos de ratones deficientes en STAT1 expresan marcadores de activación alternativa por RT-PCR pero no expresan proteínas de perfil alternativo asociadas a supresión celular.

Además de la respuesta Th2, otro factor relacionado con la susceptibilidad frente a *T. crassiceps* en los ratones BALB/c es la presencia de aaMφ (Rodríguez-Sosa et al. 2002b). Dado que los ratones STAT1^{-/-} mostraron una mayor resistencia a la infección, quisimos determinar si en estos ratones esta población de aaMφ se presentaba de manera similar a los ratones STAT1^{+/+}. Para esto se determinó la expresión de mRNAs que se han identificado como marcadores de perfil alternativo en macrófagos, además de la expresión de otros mRNA relacionados con un perfil clásico. Los macrófagos de ratones deficientes en STAT1 presentaron, al igual que los macrófagos de ratones WT, una sobreexpresión de Fizz1 y Ym1 a las 8 semanas de infección, sin embargo, presentaron una expresión basal menor de Arg1 que los STAT1^{+/+}. También se analizó la expresión del mRNA para TNFα, una citocina proinflamatoria, y se observó que la infección induce un decremento de su expresión en ratones STAT1^{+/+}, mientras que no se encontraron cambios en su expresión en los ratones STAT1^{-/-}. Por otro lado, no se encontró expresión de iNOS en ninguno de los diferentes grupos y, en cuanto a la expresión de PDL-1, los macrófagos de ratones STAT1^{-/-} infectados tuvieron una menor expresión que los macrófagos de ratones WT (Fig. 2A y 2B).

Se analizó también la presencia de proteínas de membrana en PECs de estos grupos de ratones por citometría de flujo. Aunque los macrófagos obtenidos de ratones deficientes de STAT1 presentaban una expresión similar en condiciones basales de PDL-2 y MMR, la infección crónica no logró inducir la misma sobreexpresión de estas proteínas que se detectó en los macrófagos de ratones WT (Fig. 3A y 3B), mientras que la expresión de PDL-1, una molécula cuya expresión depende en parte de la activación de STAT1 (Loke and Allison 2003) fue menor en condiciones basales en los ratones STAT1^{-/-} y a pesar de un ligero incremento por la infección, también en este tiempo su expresión fue menor que en los ratones WT (Fig. 3C).

A)



B)

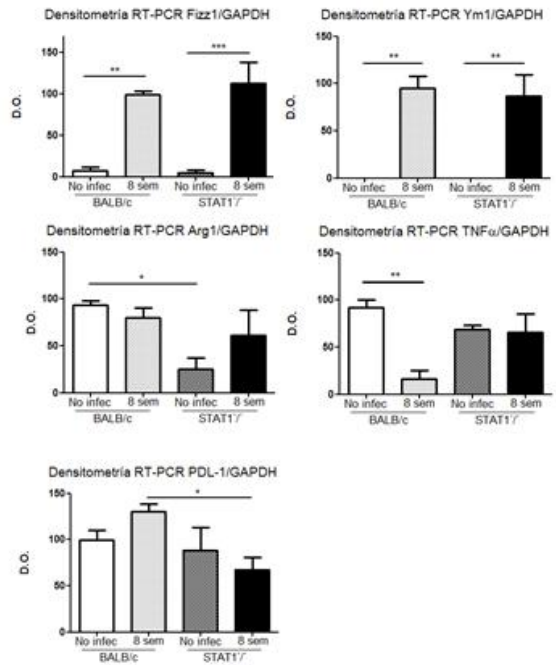


Figura 2. Los macrófagos peritoneales de ratones STAT1^{-/-} infectados i.p. con *T. crassiceps* expresan marcadores de mRNA de perfil alternativo. Se obtuvieron células de exudado peritoneal de ratones hembras BALB/c y STAT1^{-/-} y los macrófagos se purificaron por adherencia. Los macrófagos se procesaron para la extracción de RNA. El RNA se cuantificó y se utilizó para la transcripción reversa. Una vez obtenido el cDNA, se realizó PCR convencional como se describe en la metodología. A) Productos de RT-PCR de macrófagos de BALB/c y STAT1^{-/-} no infectados y con 8 semanas de infección. B) Descripción gráfica de la expresión relativa de los genes Fizz1, Ym1, TNF α , Arginasa1 y PDL-1. Los datos en las gráficas son la combinación de dos experimentos diferentes y se muestran como el promedio de los porcentajes de la expresión \pm S.E. n = seis ratones; *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001.

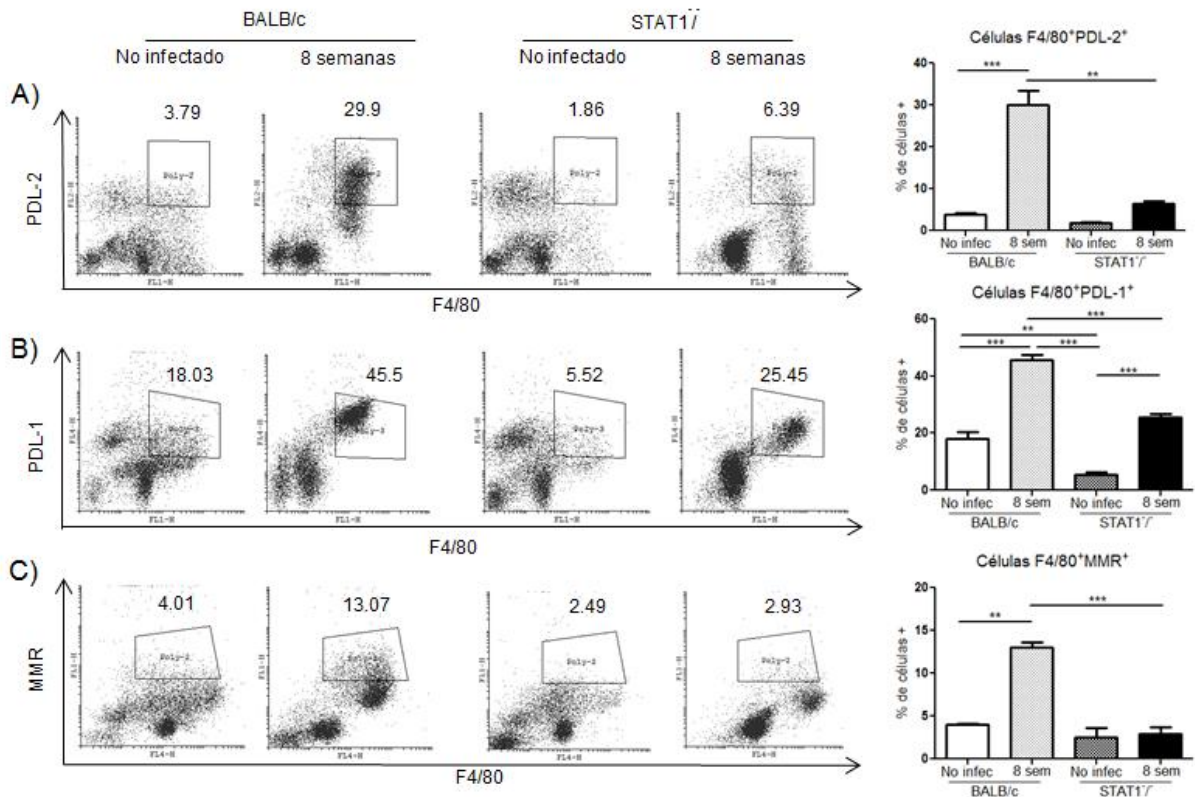


Figura 3. Macrófagos peritoneales de ratones STAT1^{-/-} crónicamente infectados i.p. con *T. crassiceps* no expresan moléculas de membrana asociadas con un fenotipo alternativo. PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-} se obtuvieron de ratones no infectados y con 8 semanas de infección y su expresión de proteínas de membrana asociadas con un perfil alternativo se analizó por citometría de flujo. A) Análisis de la expresión celular de PDL-2 y F4/80. B) Análisis de la expresión celular de PDL-1 y F4/80. C) Análisis de la expresión celular de MMR y F4/80. Las gráficas son representativas de tres experimentos diferentes \pm S.E. n = nueve ratones; *P < 0.05; **P < 0.01., ***P < 0.001

Los macrófagos provenientes de ratones deficientes en STAT1 se relacionan con resistencia a la infección con *T. crassiceps*.

Buscando evidencias que relacionaran a los macrófagos de ratones STAT1^{-/-} y su incapacidad para su activación alternativa en este modelo, con la resistencia que mostraron estos ratones frente a la infección, se analizó el efecto de la transferencia i.p. de macrófagos peritoneales provenientes de ratones STAT1^{-/-} con 4 semanas de infección hacia ratones WT. Dos días después de la transferencia, los ratones WT transferidos así como unos no transferidos fueron infectados con 10 metacístodos de *T. crassiceps* i.p., después de 4

semanas se sacrificaron para comparar la carga parasitaria. El conteo de parásitos demostró que los ratones transferidos presentaron una reducción significativa en el número de metacéstodos que los ratones que no habían recibido las células peritoneales de los ratones KO (Fig. 4).

No. de parásitos colectados en ratones BALB/c transferidos o no con M ϕ de ratones STAT1^{-/-}

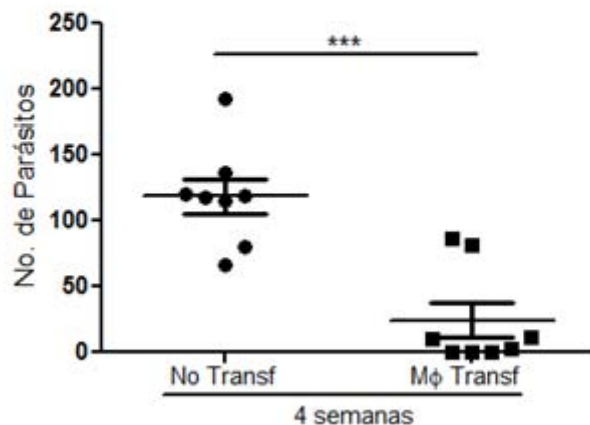


Figura 4. La transferencia adoptiva de macrófagos peritoneales obtenidos de ratones STAT1^{-/-} (4 semanas de infección) a ratones BALB/c confirió resistencia a la infección con *T. crassiceps*. Se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones STAT1^{-/-} infectados i.p. con *T. crassiceps* y se purificaron por adherencia, 3x10⁶ macrófagos fueron transferidos a ratones BALB/c previamente inyectados i.p. con clodronato. Un día después de la transferencia, se realizó la infección con 10 metacestodos de *T. crassiceps*. Después de 4 semanas de infección se evaluó la carga parasitaria. Los datos en la gráfica fueron obtenidos de dos experimentos diferentes y muestran el promedio de parásitos \pm SE. n = ocho ratones; *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < .001.

En ausencia de STAT1 se altera el reclutamiento de células en cavidad peritoneal durante la infección con *T. crassiceps*.

Dado que la citometría de flujo evidenció que los macrófagos reclutados en cavidad peritoneal de ratones deficientes en STAT1 no desarrollaban el perfil alternativo esperado durante la infección con *T. crassiceps*, quisimos observar la morfología de estas células, para lo cual se obtuvieron células de ratones WT y STAT1^{-/-} de 8 semanas de infección, se sometieron a cytopspin y se tiñeron con colorante de Wright. Se encontró que la morfología de estas células no correspondía a la esperada de un perfil alternativo (Fig. 5A), ya que mientras las células de

ratones STAT1^{+/+} fueron abundantes, presentaban un mayor tamaño y algunas eran binucleadas como se caracterizan los macrófagos alternativamente activados en infecciones por helmintos, las PECs de ratones STAT1^{-/-} reclutadas durante la infección fueron de menor tamaño y se presentaron en menor cantidad. Además de estas diferencias en las características morfológicas de los macrófagos, se pudo observar que en los ratones STAT1^{-/-} se reclutó un mayor porcentaje de células con morfología de neutrófilos y de linfocitos (Fig. 5B).

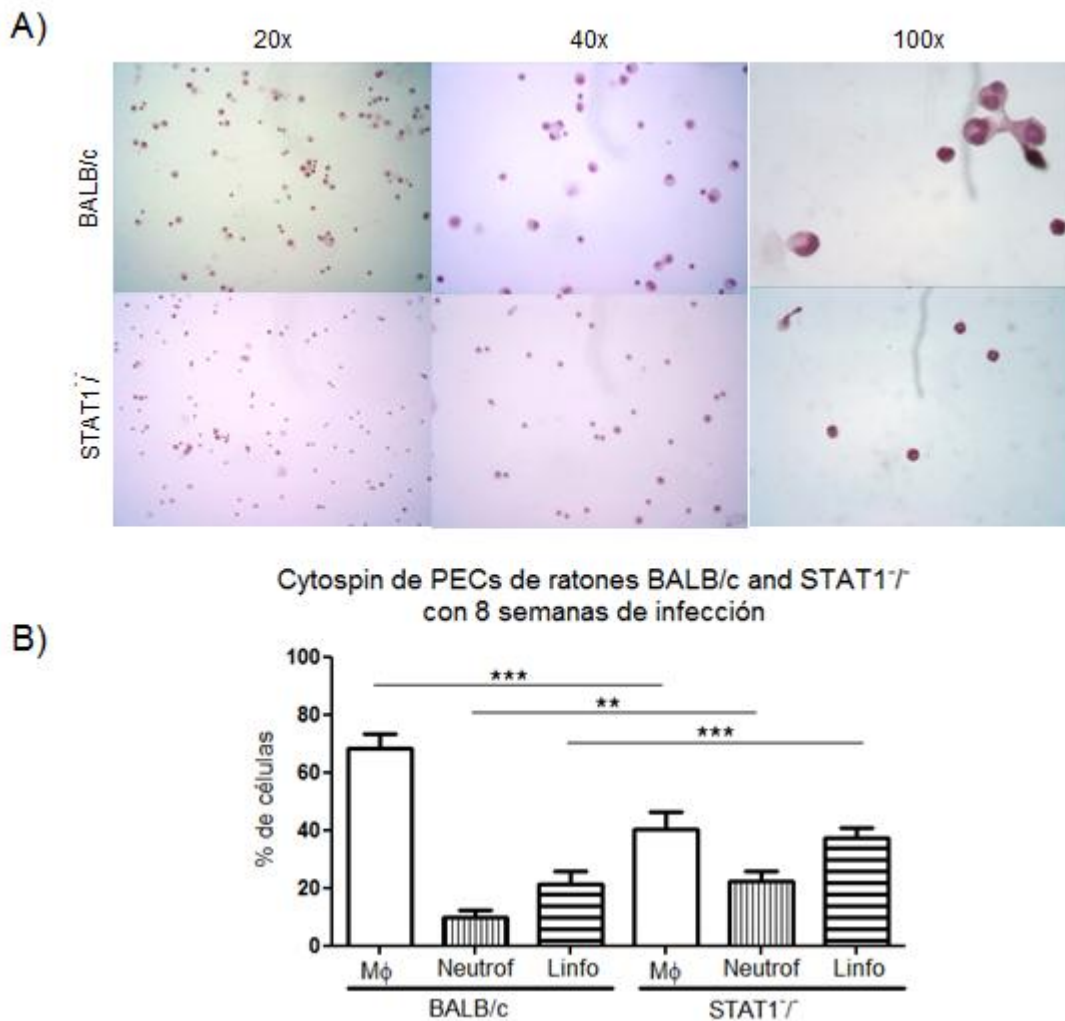


Figura 5. Los ratones STAT1^{-/-} desarrollaron un diferente patrón de reclutamiento celular durante la infección con *T. crassiceps*. Se obtuvieron PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-} (no infectados y con 8 semanas de infección) y se realizó el cytopsin. Las laminillas se tiñeron con colorante de Wright. A) Imágenes al microscopio de PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-} PECs teñidas con colorante de Wright. B) Análisis de los porcentajes de células contadas en las laminillas. Los datos en las gráficas son representativos de dos diferentes experimentos y se muestran como el promedio de los porcentajes obtenidos \pm S.E. n = seis ratones; *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.0001.

Diferente patrón de reclutamiento de células mieloides Ly6C⁺ (monocíticas) y Ly6G⁺ (neutrófilicas) a los dos días de infección entre ratones WT y STAT1^{-/-}.

Anteriormente se observó un mayor porcentaje de células neutrófilicas en el peritoneo de ratones STAT1^{-/-} infectados con *T. crassiceps* comparado con ratones WT. Dado que este tipo de células son rápidamente reclutadas en procesos infecciosos e inflamatorios agudos al igual que los monocitos, quisimos determinar posibles diferencias en el reclutamiento de estas poblaciones celulares a los 2 días de infección en estos dos grupos de ratones. Un análisis por citometría de flujo demostró que después de 2 días de infección, se presentaron diferencias importantes. Por un lado, los ratones deficientes en STAT1 no fueron capaces de reclutar células CD11b⁺Ly6C⁺, mientras que en los ratones WT, la infección con *T. crassiceps* indujo un reclutamiento importante de esta población celular (Fig. 6A), en cuanto a las células CD11b⁺Ly6G⁺, desde condiciones basales encontramos diferencias ya que los ratones deficientes de STAT1 presentaron una mayor proporción de células CD11b^{high}Ly6G^{high} y, aunque la infección indujo en ambos grupos de ratones un incremento de células Ly6G⁺, los ratones deficientes de STAT1 presentaron un mayor reclutamiento de células CD11b^{low}Ly6G^{low} que los ratones WT (Fig. 6B).

Estas diferencias no solo se observaron en la cavidad peritoneal, sino que en el bazo también se encontró que los ratones STAT1^{-/-} presentaron un menor número de células Ly6C⁺ comparados con los ratones WT a los dos días de infección (Fig. 6C) mientras que no se presentaron cambios importantes en la población de células Ly6G⁺ (Fig. 6D).

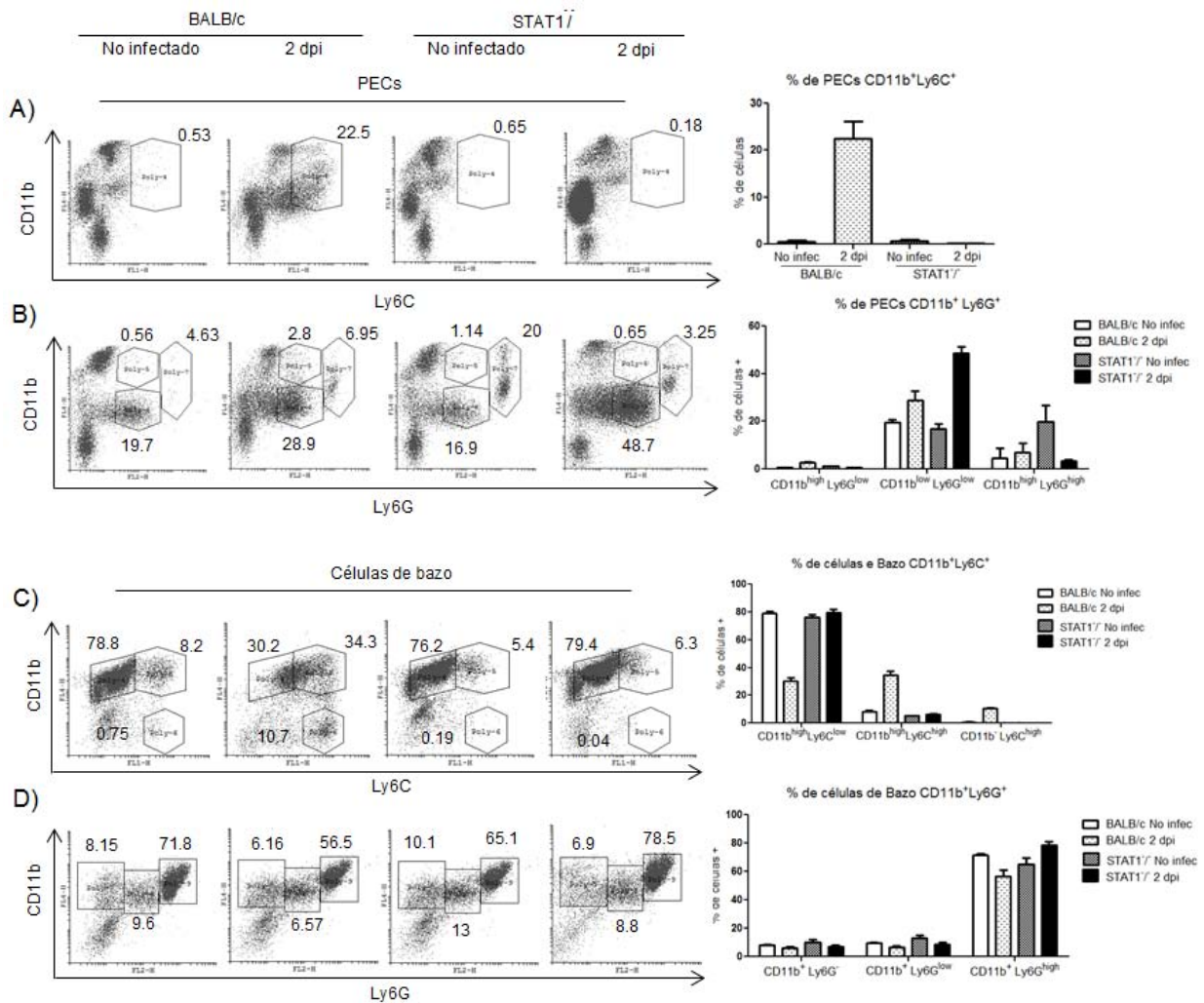


Figura 6. Los ratones deficientes de STAT1 presentaron un reclutamiento de células Ly6C⁺ afectado y de células Ly6G⁺ exacerbado, en la infección aguda con *T. crassiceps*. Se realizó una citometría de flujo de PECs y células de bazo de ratones BALB/c y STAT1^{-/-} no infectados y de 2 días de infección con *T. crassiceps*. A) Expresión de CD11b y Ly6C en PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-}. B) Expresión de CD11b y Ly6G en PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-}. C) Expresión de CD11b y Ly6C en células de bazo de ratones BALB/c y STAT1^{-/-}. D) Expresión de CD11b y Ly6G en células de bazo de ratones BALB/c y STAT1^{-/-}. Las gráficas muestran el promedio del porcentaje de dos diferentes experimentos ± S.E. n = seis ratones; *P < 0.05; **P < 0.01.

STAT1 es importante para la expresión de CCR2 y el reclutamiento de células Ly6C^{high}.

Los monocitos Ly6C⁺ necesitan la estimulación con CCL2 para su liberación de médula ósea, para reconocer a esta quimiocina es necesaria la expresión de su receptor CCR2 (Serbina et al. 2008). Además existe un reporte que sugiere que la expresión de CCR2 es parcialmente

dependiente de STAT1 (Hu et al. 2005). Por lo tanto, ya que en los ratones deficientes de este factor de transcripción no se reclutaron células CD11b⁺Ly6C⁺ a los dos días de infección, se buscó determinar si este fenómeno se podía relacionar con una pobre expresión de CCR2 en las células de ratones deficientes de STAT1. Para determinar lo anterior se analizó por citometría de flujo la expresión de CCR2 a los 2 dpi y se encontró que los ratones STAT1^{-/-} además de presentar una disminución en el reclutamiento de células Ly6C⁺ como ya se había observado, presentaron una ausencia prácticamente total de la población Ly6C^{high}CCR2⁺ (Fig. 8A) lo que indica la importancia de este receptor de quimiocinas para el reclutamiento de estas células. Por otro lado, las células Ly6G⁺ de ambos grupos de ratones no parecen necesitar de CCR2 para su reclutamiento a peritoneo (Fig. 8B). De manera que en la infección con *T. crassiceps*, STAT1 es fundamental para la expresión de CCR2 en los monocitos Ly6C⁺, los que se pueden relacionar con un efecto favorecedor del establecimiento del parásito, ya que en los ratones STAT1^{-/-} donde la presencia de esta población de monocitos se encontró abatida, el número de parásitos a un mismo tiempo de infección fue significativamente menor.

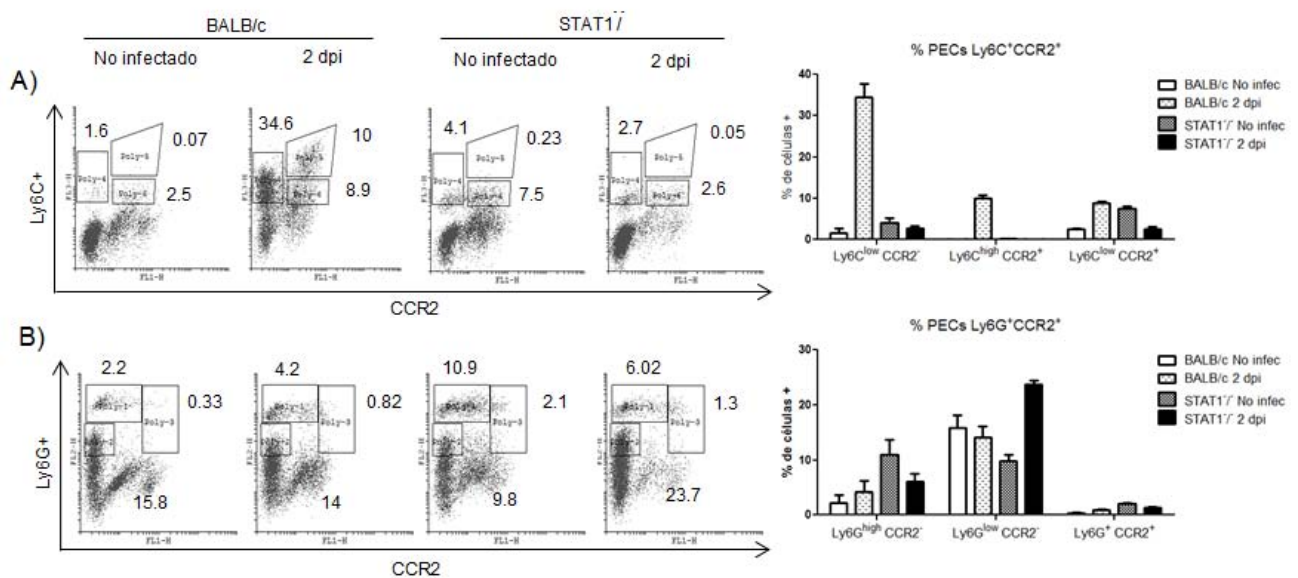


Figura 8. Ratones deficientes en STAT1 fallan en el reclutamiento de monocitos Ly6C⁺CCR2^{high}. Se realizó una citometría de flujo de PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-} no infectados y de infección aguda (2 días) con *T. crassiceps*. A) Expresión de CCR2 y Ly6C en PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-}. B) Expresión de CCR2 y Ly6G en PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-}. Las gráficas muestran la combinación de dos diferentes experimentos y los promedios de los porcentajes de células positivas ± S.E. n = seis ratones; *P < 0.05; **P < 0.01.

Las células mieloides reclutadas en ratones BALB/c y no en ratones STAT1^{-/-} inhiben la proliferación de linfocitos estimulados con α CD3.

Para determinar la relación entre las células Ly6C⁺, presentes en la cavidad peritoneal de los ratones WT y ausentes en los ratones STAT1^{-/-}, y la susceptibilidad a la infección con *T. crassiceps*, se analizó mediante co-cultivo la capacidad de supresión de las PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-} con 2 días de infección sobre la proliferación de linfocitos. Los linfocitos fueron obtenidos del bazo de ratones BALB/c no infectados, se tiñeron con CFSE y se sembraron en placas de cultivo sensibilizadas con α CD3 para inducir su proliferación.

Al realizar la citometría de flujo de las células de bazo marcadas con CFSE 3 días después del co-cultivo, se determinó que en ningún caso las PECs obtenidas de ratones no infectados afectaron la proliferación de los linfocitos. Sin embargo, en los linfocitos que estuvieron en contacto con PECs de ratones WT con 2 días de infección, la proliferación fue inhibida de manera importante, mientras que las PECs de ratones STAT1^{-/-} con 2 días de infección no indujeron supresión de la proliferación de los linfocitos estimulados con α CD3 (Fig. 9).

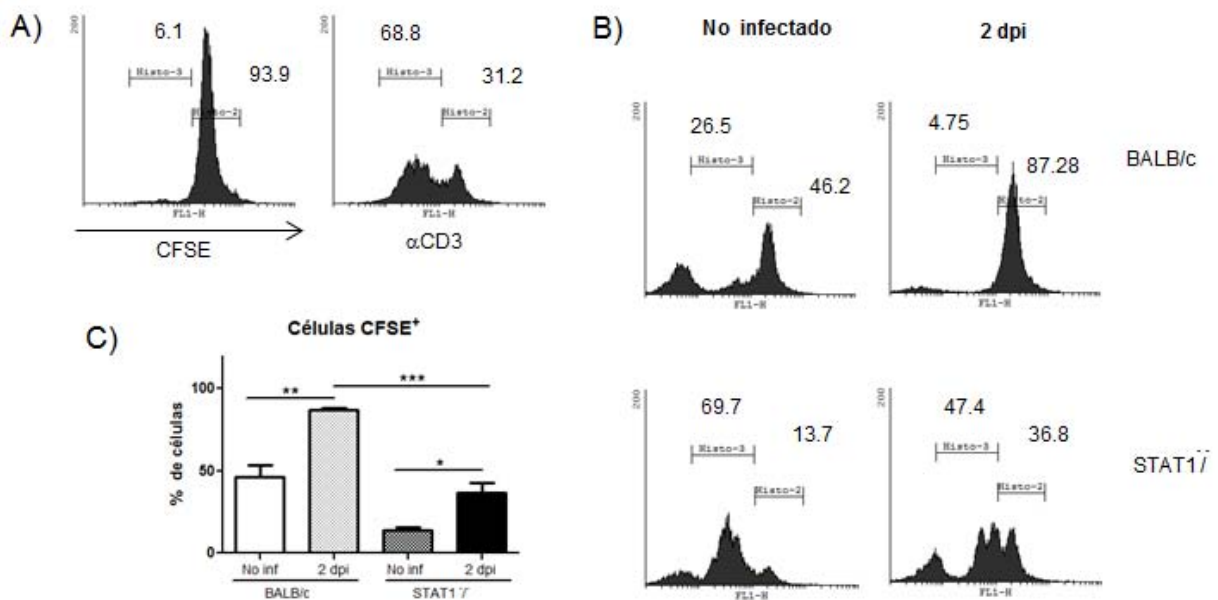


Figura 9. PECs de ratones STAT1^{-/-} con 2 días de infección no inhiben la proliferación de linfocitos inducida por α CD3. A) Linfocitos no estimulados y estimulados con α CD3 únicamente, teñidos con CFSE B) Linfocitos co-cultivados por tres días con PECs de ratones BALB/c y STAT1^{-/-} con dos días de infección con *T. crassiceps* o controles no infectados. C) Gráfica que muestra el promedio del porcentaje del ensayo de supresión con CFSE en dos experimentos independientes \pm S.E. n = seis ratones; *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.0001.

La capacidad de las PECs de ratones BALB/c con 2 días de infección para inhibir la proliferación de linfocitos estimulados con α CD3 puede deberse a la expresión de PDL-1 que se encontró en los monocitos Ly6C⁺ (Fig. 10A), recordando que esta población celular no fue reclutada en los ratones STAT1^{-/-}. Sin embargo, el número de células totales reclutadas hacia cavidad peritoneal en el los ratones WT y STAT1^{-/-} a los 2 días de infección fue similar (Fig. 7A), así como el número total de células Ly6G⁺ (Fig. 7C), sin embargo, el número total de células Ly6C⁺ reclutadas en peritoneo en los ratones STAT1^{-/-} a los dos días después de la infección fue insignificante mientras que un número importante de células de esta misma población fue reclutado en los ratones BALB/c (Fig. 7B). Lo que sugiere que la capacidad supresora de los monocitos Ly6C⁺ puede ser responsable, por lo menos parcialmente, de la mayor susceptibilidad a la infección con *T. crassiceps* encontrada en los ratones BALB/c WT con respecto a los STAT1^{-/-}.

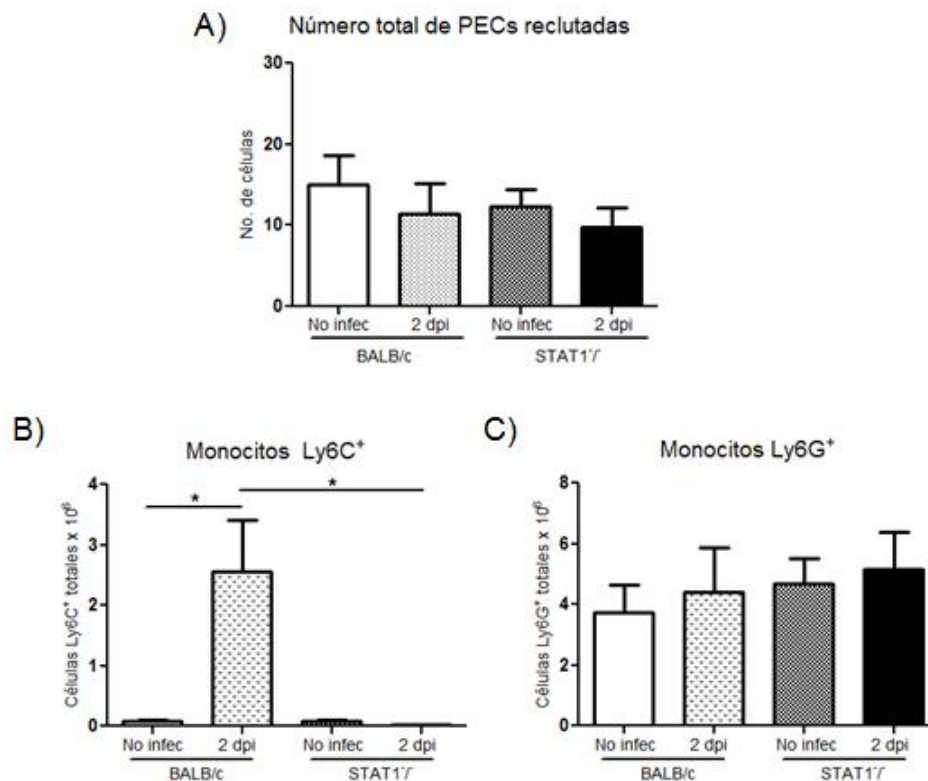


Figura 7. Los ratones deficientes en STAT1 reclutaron un número similar de PECs totales y de granulocitos Ly6G⁺ a los dos días post-infección que los ratones BALB/c, pero fallaron en el reclutamiento de monocitos Ly6C⁺. El análisis se realizó relacionando el número total de células y el % de células positivas a cada marcador determinado por citometría de flujo. A) Gráfica del total de PECs reclutadas en ratones BALB/c y STAT1^{-/-}. B) Gráfica del total de células Ly6C⁺ reclutadas en ratones BALB/c and STAT1^{-/-}. C) Gráfica del total de células Ly6G⁺ en ratones BALB/c y STAT1^{-/-}. Las gráficas muestran la combinación de dos diferentes experimentos \pm S.E. n = seis ratones; *P < 0.05; **P < 0.01.

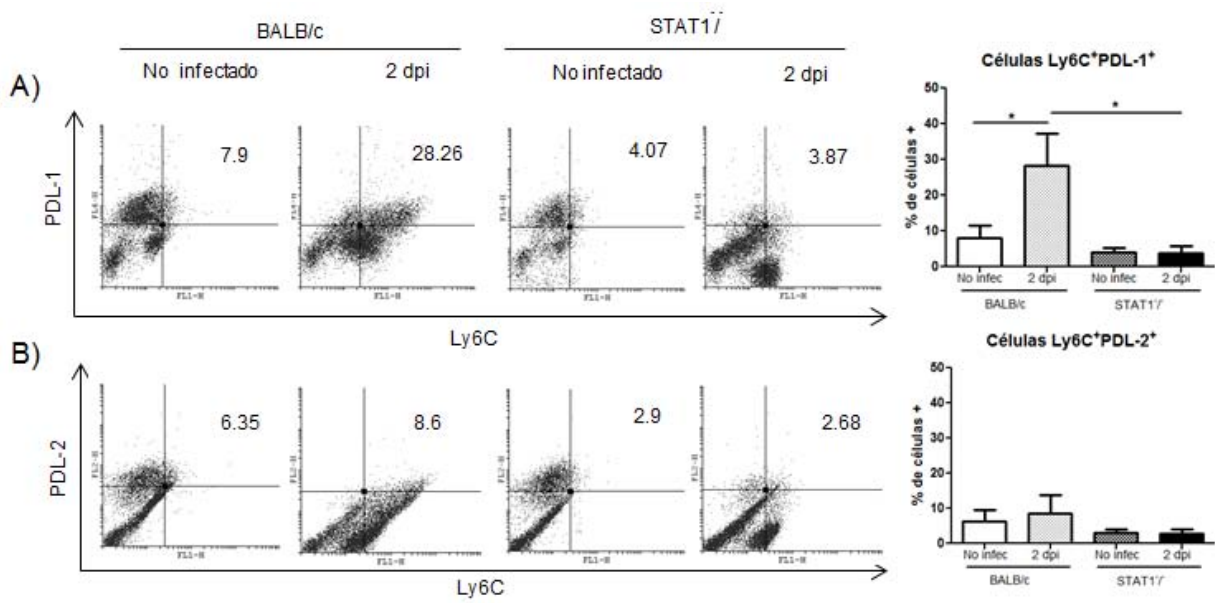


Figura 10. Las PECs Ly6C⁺ de ratones STAT1^{-/-} infectados con *T. crassiceps* no expresan PDL-1 a los 2 días post-infección. A) Análisis de la expresión de PDL-1 en PECs Ly6C⁺. B) Análisis de la expresión de PDL-2 en PECs Ly6C⁺. Los datos en las gráficas son la combinación de dos experimentos independientes y muestran el porcentaje promedio de la expresión ± S.E. n = seis ratones; *P < 0.05; **P < 0.01.

DISCUSIÓN GENERAL

STAT1 ha sido ampliamente estudiado como el factor de transcripción involucrado en la señalización del IFN- γ y por lo tanto en su participación en la activación clásica de los macrófagos (Dalton et al. 1993). Existe sin embargo, una población de macrófagos hipo-responsiva a esta citocina, los macrófagos alternativamente activados. Este tipo de células pueden encontrarse entre otras circunstancias, en infecciones parasitarias tales como *N. brasiliensis*, *B. malayi* y *S. mansoni* (Herbert et al. 2004; Loke et al. 2000; Urban et al. 1998), así como en la causada por el cestodo *T. crassiceps* (Rodríguez-Sosa et al. 2002b). Este parásito modula la respuesta inmune de su hospedero desde un perfil Th1 hacia un perfil Th2, donde se facilita su establecimiento incrementando el número de metacéstodos en peritoneo así como la aparición de los aaM ϕ . Dado que estos macrófagos no responden a IFN- γ se puede relacionar su presencia con una mayor susceptibilidad a esta infección.

Para tratar de determinar la causa del estado hipo-responsivo de los aaM ϕ frente a IFN- γ , se determinó el estado de activación de STAT1 mediante el análisis de su fosforilación por Western Blot, debido a que esta fosforilación es necesaria para la homodimerización de STAT1 y su función como factor de transcripción (Gough et al. 2008). Este ensayo se realizó utilizando PECs adherentes obtenidas de hembras y machos de la cepa susceptible BALB/c y de la cepa resistente C57BL/6. Como se observa en los resultados, la fosforilación de STAT1 correlaciona con la resistencia que presentan los diferentes grupos de ratones a la infección ya que el efecto de regulación negativa de la fosforilación de STAT1 se observa claramente en los macrófagos obtenidos de la cepa BALB/c, en la cual también encontramos un número importante de parásitos, mientras que los ratones C57BL/6 que casi en su totalidad resolvieron la infección, muestran en sus macrófagos peritoneales una fosforilación aun mayor de STAT1 en respuesta a la misma dosis de IFN- γ que en aquellos ratones no infectados. Este resultado sugiere que la fosforilación de STAT1 es importante en la resolución de la infección y que la disminución de esta respuesta es un mecanismo por el cual *T. crassiceps* logra inducir un estado favorecedor para su desarrollo. La regulación negativa de la fosforilación de STAT1 se ha descrito anteriormente en infecciones con parásitos protozoarios como un mecanismo que favorece la susceptibilidad a la infección (Bhardwaj et al. 2005; Nandan and Reiner 1995), sin embargo, no existen reportes que indiquen que las infecciones con helmintos puedan regular la activación de STAT1. Por otra parte, es importante señalar que la activación de STAT1 conlleva, entre otras cosas, a la producción de

NO por los macrófagos. La deficiente producción de NO por los aaM ϕ , se ha relacionado previamente con la susceptibilidad a la infección con *T. crassiceps* (Alonso-Trujillo et al. 2007). La regulación negativa de la fosforilación de STAT1 que favorece el decremento en la producción de NO puede ser un mecanismo utilizado por *T. crassiceps* para facilitar su establecimiento en el hospedero.

¿En qué momento se logra establecer esta modulación? era la siguiente pregunta. Dado que esta infección cursa por dos etapas, la aguda y la crónica, se decidió analizar la fosforilación de STAT1 en macrófagos obtenidos en la etapa aguda (2 semanas de infección) en los ratones BALB/c, donde se encontró un número limitado de parásitos aunado a una fosforilación de STAT1 mayor que en los macrófagos de ratones no infectados, lo que sugiere que esta modulación puede ser el resultado de una mayor exposición al parásito o a sus antígenos. Esta propuesta se sustenta en la evidencia de que en diversas infecciones, como la causada por *T. gondii*, se ha observado que la modulación de la fosforilación de STAT1 depende en parte del número de parásitos utilizados en la inducción de la infección y la inducción de la expresión de la molécula inhibitoria SOCS1, fue dependiente del tiempo post-infección (Zimmermann et al. 2006)

Este decremento en la fosforilación de STAT1 observado en los macrófagos de la fase crónica de la infección con *T. crassiceps* no es el resultado de una disminución en la expresión de ninguna de las cadenas del receptor de IFN- γ , como sucede en la infección con *Leishmania donovani*, donde también se observa una disminución en la señalización de IFN- γ , este fenómeno se ha asociado a una disminución en la expresión de IFN- γ R α (Ray et al. 2000). Tampoco se debe a una cinética desfasada ni a la necesidad de una mayor concentración del estímulo con IFN- γ como quedó demostrado al realizar curvas de tiempo de exposición y concentración de IFN- γ ; ni tampoco a una regulación negativa de la expresión de la proteína total de STAT1 como se ha observado en algunas infecciones por patógenos intracelulares (Bhardwaj et al. 2005). Es importante señalar también que este fenómeno no se trata de una inhibición general de las vías JAK/STAT ya que macrófagos de los mismos animales crónicamente infectados fueron capaces de fosforilar en mayor grado a STAT6 en respuesta a la estimulación con IL-4, que macrófagos de animales no infectados; todo lo anterior indica una regulación puntual de la infección con *T. crassiceps* y sus antígenos sobre la respuesta proinflamatoria frente a IFN- γ . Esta regulación puntual puede deberse a que, si bien se tiene evidencia de que existen mecanismos de modulación compartidos por las vías

de señalización de IFN- γ e IL-4, como SOCS1 (Losman et al. 1999; Song and Shuai 1998), la función de la fosfatasa SHP-1, cuya expresión se encontró inducida por *T. crassiceps* y sus antígenos, tiene como blanco a la cinasa JAK2 que se encuentra anclada a IFN- γ R β mientras que no participa en la señalización mediada por IL-4R α (Gordon and Martinez 2010; Kiu and Nicholson 2012). Lo anterior sugiere un mecanismo mediante el cual, *T. crassiceps* suprime a la respuesta inmune Th1 y a la activación clásica de los macrófagos al afectar la señalización de IFN- γ , lo que conlleva a favorecer la respuesta inmune Th2 y el surgimiento de macrófagos alternativos que pueden favorecer su establecimiento en el hospedero.

Sin embargo, el proceso infeccioso no es la única vía por lo cual *T. crassiceps* logra la regulación de la fosforilación de STAT1 ya que se comprobó que los productos de excreción/secreción (TcES) del parásito fueron capaces de emular este fenómeno, lo cual coincide con trabajos previos de nuestro grupo en los que recientemente se ha demostrado que la exposición a TcES puede regular algunas funciones proinflamatorias en células dendríticas (Terrazas et al. 2010a) así como favorecer la polarización hacia un perfil Th2 a antígenos no relacionados cuando estas células dendríticas eran usadas como APCs (Terrazas et al. 2013).

Por otra parte, la infección crónica con *T. crassiceps* indujo de manera importante la sobreexpresión de la molécula reguladora SOCS3 que no fue alterada por el estímulo con IFN- γ . Como es sabido, las proteínas SOCS pueden suprimir la señalización de citocinas al inhibir la vía JAK/STAT mediante un clásico loop de retroalimentación negativa (Greenhalgh and Hilton 2001). En particular, se ha relacionado a la proteína SOCS3 como posible regulador de la fosforilación de STAT1. En la infección con *L. donovani* se induce en macrófagos humanos la expresión de mRNA para SOCS3 lo cual correlaciona con una disminución en la fosforilación de STAT1 (Bertholet et al. 2003). Cabe señalar que la sobreexpresión de SOCS3 también se presentó en macrófagos expuestos *in vitro* a TcES, lo que sugiere que este fenómeno puede estar mediado directamente por antígenos parasitarios y no como un mecanismo de regulación de un proceso inflamatorio anterior.

También es sabido que la vía JAK/STAT posee otros mecanismos de regulación además de las proteínas SOCS que podrían estar participando en la regulación de la fosforilación de STAT1, tal como proteínas fosfatasas como SHP-1 que se expresa principalmente en macrófagos y células hematopoyéticas (Tsui et al. 2006; Wu et al. 2003) y de la cual se sabe

que su ausencia (en ratones deficientes de esta proteína) se relaciona con una respuesta exacerbada a estímulos proinflamatorios (Yu et al. 2005). Esta fosfatasa también es inducida en la infección con el parásito *L. donovani* (Blanchette et al. 1999). Dados los antecedentes, se identificó la presencia por WB de esta proteína y se encontró que tanto la infección crónica con *T. crassiceps*, como la exposición de macrófagos peritoneales a TcES indujeron una mayor expresión de la fosfatasa. Con la finalidad de descartar o sustentar la participación de SHP-1 como posible responsable de la disminuida fosforilación de STAT1, se adicionó ortovanadato de sodio (un inhibidor de fosfatasas) al cultivo de macrófagos de animales infectados y se encontró que se restableció la fosforilación al mismo tiempo que disminuyeron los niveles de SHP-1, lo que nos sugiere que esta fosfatasa puede ser la responsable de inhibir la respuesta frente a IFN- γ , más aún pudimos descartar a SOCS3 como responsable de este efecto ya que en estas mismas células donde se restableció la fosforilación de STAT1, los niveles de SOCS3 se mantuvieron elevados. Esto es interesante desde el punto en que la expresión de SHP-1 como mecanismo regulatorio se había descrito únicamente en infecciones con patógenos intracelulares como *Leishmania* y *Trypanosoma* (Blanchette et al. 1999; Coller et al. 2003) o en ensayos *in vitro* con antígenos como GP63 de *Leishmania* (Isnard et al. 2012) por lo que ahora surge la evidencia de que tanto los helmintos como sus antígenos pueden inducir la expresión de esta molécula como un mecanismo de regulación de la respuesta inmune en macrófagos.

De manera interesante los macrófagos peritoneales no fueron las únicas células cuya fosforilación de STAT1 estuvo afectada por la infección crónica con *T. crassiceps*, ya que al evaluar los niveles de STAT1-P en células de bazo encontramos que la infección también indujo en esta población una disminución en la fosforilación de este factor de transcripción y además una sobreexpresión de SOCS3. Sin embargo, la adición de ortovanadato de sodio no logró el restablecimiento de la fosforilación de STAT1 de una manera significativa. Esto puede deberse a que en el bazo, pese a que también se presentan macrófagos, los linfocitos son las células más abundantes y existen además otras poblaciones celulares lo que nos sugiere la participación de otros mecanismos regulatorios.

Sin embargo, ya que SOCS3 es fuertemente inducido por la infección con *T. crassiceps* a pesar de no participar en la regulación de la fosforilación de STAT1, aún es necesario esclarecer la función de esta proteína en el proceso infeccioso. Se sabe que la infección crónica con *T. crassiceps* induce la producción de altos niveles de IL-6 (Rodríguez-Sosa et al.

2002b) y que SOCS3 puede regular negativamente la señalización de esta citocina (Croker et al. 2003) por lo que SOCS3 puede tener un papel importante en la infección con *T. crassiceps*.

Un hallazgo importante que aporta esta investigación es el hecho de que el efecto modulador de la fosforilación de STAT1 inducido tanto por el proceso infeccioso como por la exposición a TcES sobre macrófagos y células de bazo murinos, también se logró emular en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores humanos. Estas células fueron susceptibles a la exposición a TcES lográndose disminuir su respuesta a IFN- γ y, similar a lo que ocurrió con los macrófagos murinos, la adición de ortovanadato de sodio facilitó el restablecimiento de la fosforilación de STAT1. Existen trabajos donde se ha evaluado la modulación que ejercen algunos antígenos parasitarios sobre células humanas *in vitro*, como la disminución de la producción de IFN- γ causada por la exposición de linfocitos al antígeno Sm29 de *Schistosoma* (Lima et al. 2013), sin embargo, este es el primer reporte en el que se estudia y propone un mecanismo molecular involucrado en esta regulación en infecciones por helmintos. Este fenómeno sugiere un posterior estudio para el uso terapéutico de TcES, en condiciones donde se requiera disminuir una respuesta inflamatoria.

El papel que juega STAT1 en la respuesta inmune es muy complejo y aún faltan cosas por esclarecer. Esto se pudo corroborar cuando, con la finalidad de seguir evaluando la participación de STAT1 en la infección con *T. crassiceps* se infectaron ratones deficientes en el gen de STAT1 en fondo genético BALB/c y se comparó la respuesta inmune que éstos desplegaron contra la desarrollada por ratones BALB/c STAT1^{+/+}. Inesperadamente encontramos que la ausencia del gen STAT1 confiere a los ratones de la cepa BALB/c una mayor resistencia a la infección ya que desarrollan hasta 50% menos carga parasitaria en un mismo tiempo de infección.

Tratando de identificar una causa del incremento en la resistencia a la infección con *T. crassiceps* que se encontró en los ratones STAT1^{-/-}, se determinó el tipo de respuesta inmune preferentemente desplegada en estos macrófagos. Pese a que existen reportes que estudian la ausencia de STAT1 en infecciones con parásitos protozoarios, no se sabe si la ausencia de esta molécula tiene un papel diferente en las infecciones con helmintos, además, como se mencionó con anterioridad, la respuesta Th1 se ha asociado con la resistencia a la infección con *T. crassiceps* (Terrazas et al. 1998). Tal como se ha observado en infecciones con

protozoarios como *L. donovani* (Rosas et al. 2006) y *L. mexicana* (Rosas et al. 2003), la ausencia de STAT1 en ratones de fondo genético BALB/c infectados con *T. crassiceps* afectó de manera importante el desarrollo de la respuesta inmune Th1, ya que estos ratones desarrollaron niveles inferiores de anticuerpos de isotipo IgG2a comparados con los desarrollados por los ratones WT, mientras que su respuesta humoral Th2 no fue afectada, como se demostró al no presentarse diferencias en los niveles de anticuerpos IgG1. Lo anterior indica que la resistencia observada en estos ratones no está mediada por la respuesta Th1.

El fenómeno del incremento en la resistencia a una infección asociado a la deficiencia de STAT1 a pesar del fallo en el desarrollo de una respuesta inmune Th1 anteriormente asociada a resistencia ya se había observado en la infección con *L. donovani* (Rosas et al. 2006). Sin embargo, no se esclareció cómo la deficiencia de STAT1 facilitaba el incremento a la resistencia frente a este protozoario.

Un factor que se ha relacionado con la susceptibilidad a la infección por *T. crassiceps*, es la aparición de macrófagos con activación alternativa (Terrazas et al. 2005). Cuando se analizó por RT-PCR la presencia de marcadores de este tipo de activación en macrófagos de ratones deficientes de STAT1 se encontró que fueron capaces de expresar Ym1 y Fizz1 aunque los niveles de Arg1 y PDL-1 fueron menores que los observados en ratones WT. Mientras que ningún grupo expresó el mensajero de iNOS. Este perfil coincide en parte con el de macrófagos alternativos, sin embargo, al analizar algunas proteínas de membrana asociadas a la activación alternativa del macrófago, encontramos que los M ϕ de ratones STAT1^{-/-} con 8 semanas de infección no sobreexpresaron PDL-2 ni MMR y la expresión de PDL-1 fue inferior en comparación con los macrófagos de ratones BALB/c que claramente desarrollan un perfil alternativo. Este es un resultado importante ya que sugiere una participación de STAT1 en el desarrollo de la activación alternativa del macrófago y refuerza la idea de que la presencia de esta población celular facilita el establecimiento del parásito. La falta de capacidad de los macrófagos de activarse alternativamente en ausencia de STAT1 parece estar involucrada en la relativa resistencia a la infección, ya que animales BALB/c a los cuales se les depletaron los macrófagos residentes utilizando liposomas con clodronato y que posteriormente recibieron una transferencia de macrófagos de ratones STAT1^{-/-} desarrollaron un menor número de parásitos que los ratones no transferidos. Esto implica que la respuesta temprana (primeros días de infección) es determinante para el desarrollo de este proceso infeccioso.

Los macrófagos de ratones deficientes de STAT1 con 8 semanas de infección, al ser observados al microscopio no cumplieron con la morfología característica de aaM ϕ , mientras que los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones WT son grandes y se observan algunos binucleados. Al observar al microscopio las células del exudado peritoneal, no solo se pudieron observar estas diferencias, también se observó una mayor proporción de neutrófilos y linfocitos en los ratones STAT1^{-/-}. Los neutrófilos son células que llegan rápidamente al sitio de infección por patógenos (Segal 2005), por lo que para determinar diferencias en su reclutamiento de manera precisa, se analizó por citometría de flujo el reclutamiento de estas células a la cavidad peritoneal a los dos días de infección en ratones WT y STAT1^{-/-}. Cabe señalar que los neutrófilos expresan en su superficie una molécula llamada Ly6G, que junto con Ly6C expresada por monocitos conforma el marcador de linaje mielóide Gr1 que se expresa en las llamadas células mieloides supresoras (CD11b⁺Gr1⁺) las cuales pueden suprimir la proliferación de linfocitos T (Gomez-Garcia et al. 2005). Los ratones STAT1^{-/-} en condiciones control (no infectados) presentaron una mayor proporción de células Ly6G⁺ que corresponden a neutrófilos, en cavidad peritoneal y esta proporción se incrementa a los 2 días después de la infección en comparación con los ratones BALB/c. En el bazo las proporciones de las células Ly6G⁺ no presentaron cambios ni con la infección ni debido a la presencia o ausencia del gen de STAT1. Lo que sugiere que STAT1 no participa de manera importante en el reclutamiento de células Ly6G⁺ en la infección con *T. crassiceps*. En cuanto a las células Ly6C⁺, que corresponden a células monocíticas, los ratones STAT1^{-/-} no fueron capaces de reclutarlas en cavidad peritoneal a los 2 días post-infección y de igual manera sucedió en el bazo. Para que las células Ly6C⁺ sean liberadas de médula ósea se necesita el reconocimiento de la quimiocina CCL2 por CCR2, su receptor en la superficie de estas células (Serbina et al. 2008) y cuya expresión depende en parte de STAT1 (Hu et al. 2005). En la infección con *T. crassiceps* en ratones BALB/c, todas las células Ly6C^{high} expresaron CCR2, lo que indica que CCR2 necesario para que sean liberadas de médula ósea y reclutadas en el sitio de infección, mientras que en las células Ly6C^{low} hubo una población que lo expresó y otra que no, lo que sugiere que la dependencia de CCR2 para su liberación de médula ósea es parcial. En las células de ratones deficientes de STAT1 no se reclutó la población Ly6C^{high} ni hubo una expresión importante de CCR2 lo que refuerza la propuesta de que CCR2 es importante para el reclutamiento de monocitos durante la infección con *T. crassiceps* pero no es importante para el reclutamiento de neutrófilos ya que las células Ly6G⁺ no expresaron este receptor de quimiocinas. Estos hallazgos coinciden con reportes previos que indican que

CCR2 también es esencial en el reclutamiento de células Ly6C⁺ en la infección por el protozoario *T. gondii* (Dunay et al. 2010) sin embargo, el papel que juegan estas células como mediadores de inflamación depende del modelo de estudio, si bien en el caso de la infección por *T. gondii*, los monocitos Ly6C⁺ participan produciendo citocinas proinflamatorias con lo que se logra el control de la infección, en el caso de la artritis viral causada por el virus Chikungunya, la ausencia de CCR2 trae como consecuencia la disminución de un infiltrado de células Ly6C⁺ que conlleva al incremento y exacerbación del padecimiento (Poo et al. 2014).

Estas diferencias en el reclutamiento celular en los primeros días de infección sugieren que los monocitos pueden participar de manera importante mediante susceptibilidad a la infección con *T. crassiceps* y facilitando el establecimiento del parásito. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que las PECs reclutadas en respuesta a *T. crassiceps* dos días después de la infección en los ratones STAT1^{+/+} pudieron inhibir la proliferación de linfocitos estimulados con anti CD3 mientras que las células reclutadas en ratones STAT1^{-/-} no poseen esta propiedad, la cual puede asociarse a la expresión de PDL-1 en las células Ly6C⁺ presentes en los ratones BALB/c y ausentes en los ratones deficientes de STAT1 o bien a la ausencia de células CD11b⁺Ly6C^{high}. Así es posible que los monocitos Ly6C⁺ que se encontraron en los ratones BALB/c podrían ser precursores de macrófagos alternativos, dado que en los ratones deficientes de STAT1 donde no se logra establecer una población de macrófagos alternativos no se lleva a cabo un reclutamiento temprano y eficiente de monocitos Ly6C⁺.

En resumen, este trabajo provee hallazgos que describen nuevos mecanismos implicados en la regulación del sistema inmune causado por infecciones con helmintos. Si bien existen reportes que estudian la forma en que diversas infecciones por helmintos afectan vías de señalización implicadas en la respuesta inmune, estos trabajos se han limitado principalmente al estudio de STAT6. Por lo tanto es importante mencionar que este es el primer reporte que demuestra que un helminto y sus antígenos de secreción pueden regular la fosforilación de STAT1, que como es sabido, es una molécula fundamental para el desarrollo de respuestas inflamatorias, así como también propone mecanismos involucrados en esta regulación. Es también importante resaltar que la capacidad de regular negativamente la respuesta a IFN- γ no se encontró limitada a células murinas. Los antígenos secretados de *T. crassiceps* son capaces de inducir la disminución de la fosforilación de STAT1 en respuesta al estímulo con

IFN- γ en células humanas de sangre periférica, lo que sugiere que TcES puede estudiarse para definir posibles moléculas con potencial terapéutico para contrarrestar patologías que impliquen procesos inflamatorios exacerbados.

Este trabajo también arroja evidencia de que STAT1 participa en procesos inmunológicos que van más allá de la inducción de la inflamación ya que nuestros resultados sugieren un papel importante de STAT1 en la inducción de aaM ϕ . Por otro lado, el modelo de infección con *T. crassiceps* también facilitó el estudio de las células Ly6C⁺ y su capacidad supresora. Estos hallazgos sustentan la importancia de este trabajo y sugieren la importancia de continuar estudiando la participación de STAT1 en la respuesta inmune en las infecciones por helmintos.

CONCLUSIONES

- La infección crónica con *T. crassiceps* induce una disminución de la fosforilación de STAT1 en macrófagos peritoneales y esplenocitos en respuesta a IFN- γ en la cepa susceptible BALB/c pero no en la cepa resistente C57BL/6.
- Las moléculas supresoras SHP-1 y SOCS3 son inducidas en macrófagos peritoneales por la infección crónica con *T. crassiceps*.
- La inhibición de fosfatasas en macrófagos provenientes de animales infectados con *T. crassiceps* previo al estímulo con IFN- γ facilita el restablecimiento de la fosforilación de STAT1.
- La exposición a TcES regula negativamente la fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ en macrófagos murinos y en PBMC humanas.
- Ratones STAT1^{-/-} de fondo genético BALB/c presentan mayor resistencia a la infección con *T. crassiceps* que los WT aun cuando su respuesta Th1 se encuentra disminuida.
- En ausencia de STAT1 los ratones infectados con *T. crassiceps* no desarrollan macrófagos alternativamente activados.
- STAT1 es determinante para el reclutamiento de células mieloides Ly6C⁺ CCR2⁺.
- Las células Ly6C⁺ inducidas en ratones BALB/c durante la infección aguda con *T. crassiceps* inhiben la proliferación de linfocitos estimulados con α CD3.

Otras publicaciones:

Becerra-Díaz M, Valderrama-Carvajal H, Terrazas LI. **2011**. Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family members in helminth infections. *Int J Biol Sci.* 2011;7(9):1371-81.

Review

Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Family Members in Helminth Infections

Mireya Becerra-Diaz¹, Héctor Valderrama-Carvajal² and Luis I. Terrazas¹✉

1. Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
2. Instituto de Ciencia y Tecnología, Distrito Federal, México.

✉ Corresponding author: Luis I. Terrazas, Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala, UNAM. Av. De los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México. México 54090. Phone: (5255) 5623-1333 ext 39794. Fax: (5255) 5623-1138. e-mail: literazas@campus.iztacala.unam.mx

© Ivyspring International Publisher. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>). Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited.

Received: 2011.09.01; Accepted: 2011.10.01; Published: 2011.11.01

Abstract

Helminth parasites are a diverse group of multicellular organisms. Despite their heterogeneity, helminths share many common characteristics, such as the modulation of the immune system of their hosts towards a permissive state that favors their development. They induce strong Th2-like responses with high levels of IL-4, IL-5 and IL-13 cytokines, and decreased production of proinflammatory cytokines such as IFN- γ . IL-4, IFN- γ and other cytokines bind with their specific cytokine receptors to trigger an immediate signaling pathway in which different tyrosine kinases (e.g. Janus kinases) are involved. Furthermore, a seven-member family of transcription factors named Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) that initiate the transcriptional activation of different genes are also involved and regulate downstream the JAK/STAT signaling pathway. However, how helminths avoid and modulate immune responses remains unclear; moreover, information concerning STAT-mediated immune regulation during helminth infections is scarce. Here, we review the research on mice deficient in STAT molecules, highlighting the importance of the JAK/STAT signaling pathway in regulating susceptibility and/or resistance in these infections.

Key words: STAT, helminths, *Taenia crassiceps*, alternatively activated macrophages, filariasis, schistosomiasis.

Introduction

Helminth parasites are a very diverse group of multicellular organisms, including both flat worms like *Taenia sp.*, and cylindrical worms like *Ascaris sp.* Although they exhibit different mechanisms of infection and distinct sites at which they lodge in the host, they share some common features such as the immune modulation induced by the host immune system that triggers a permissive state for their development [1]. Helminth parasites possess sophisticated and efficient mechanisms to regulate the immune response to survive inside their hosts. A distinctive characteristic in these infections is that they induce the skewing of the immune response toward a Th2 re-

sponse with high concentrations of interleukin (IL)-4, IL-13, IL-5 and IgE, IgG1 and IgG4 isotype antibodies that commonly are related to protective effects [2]. On the other hand, a hypo-responsive state is also consistently observed in lymphocytes, mainly by a reduced proliferative response to parasites, non-related antigens, or polyclonal stimuli [3]. In addition to Th2 polarization, the recruitment of immunomodulatory cell populations, such as T regulatory cells (Tregs) and alternatively activated macrophages (AAM Φ s), has also been recently described in different helminthic infections, and these cells may be dependent on such signals. The role of this group of cells depends on the

particular type of helminth. For example, in *Nippostrongylus brasiliensis* infection, AAMΦs actively participate in parasite clearance, while in *Taenia crassiceps* infection; AAMΦs favor parasite persistence [4, 5]. Interestingly, experimental infections with *Brugia malayi*, *Schistosoma mansoni* or *Litomosoides sigmodontis* induce an increased and rapid recruitment of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs [6, 7, 8], which can be beneficial for both, the parasite and the host. It is clear that the strong regulatory mechanisms developed by helminths are necessary either to successfully colonize their hosts or to complete their life cycle while minimizing damage to the host. However, the mechanisms used by helminth parasites to achieve modulation of the host immune response have not been clarified.

During helminth infection, high levels of different types of cytokines are secreted. Cytokines initiate signaling when they bind to their specific receptors, inducing several important conformational changes mainly oligomerization or multimerization of their receptors. These changes are followed by activation of several downstream signaling molecules including those named JAK (Janus Kinases). JAKs signaling molecules are tyrosine kinases, found constitutively associated with each receptor chain [9]. Once the JAKs are activated, they autophosphorylate and transphosphorylate the receptor tyrosine intracellular motifs, which serve as recruiting sites for the SH2 domain of STATs.

Upon activation, the STATs are phosphorylated and dimerize through their SH2 domain to form homo- or heterodimers. These dimers translocate to the nucleus where they bind to the promoter region of genes via specific DNA binding domains and thus bring about the transcription of their respective genes. Here, we discuss the signature cytokines and complex STAT-mediated signaling networks involved in regulating the host response and determining disease outcome during various helminth infections.

The JAK/STAT families

JAK/STAT families are two groups of proteins that, constitute diverse signaling pathways [10] involved in cytokine signaling. STAT family members act as transcriptional factors, activated upstream by JAK proteins. Furthermore, STAT proteins are phosphorylated on tyrosine residues by JAKs. The STAT family is composed of seven proteins (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b and STAT6), while the JAK family is composed of four proteins (JAK1, JAK2, JAK3 and TyK2). All of these proteins are constitutively present in the cytoplasm without previous stimuli. These two large groups of molecules repre-

sent a signaling pathway that can be quickly activated from the cellular membrane to the nucleus.

JAK protein family

These proteins are called Janus kinases because of the homology of the kinase and pseudokinase domains with Janus, the Roman god of two faces [11]. The first JAK identified was Tyk2 by Krolewski in 1990 [12], using libraries of complementary DNA from human T lymphocytes, while JAK1, JAK2 and JAK3 were identified through conserved motif cloning of the catalytic domain [11, 13, 14]. JAK proteins are molecules structurally composed of seven regions (JH1- JH7). The JH1 domain bears the kinase activity (Fig.1), while JH2 is homologous to JH1 but without the residues required for kinase activity (pseudokinase domain), so this domain is usually associated with regulatory functions [15].

JAK proteins interact with different intracellular domains of cytokine receptors and are present in a variety of cell subtypes. Their participation in mutated cell lines resistant to IFN- α stimuli was observed, and signaling in those cells was restored when different JAK proteins were transfected. Thus it was shown that IFN- α signaling requires JAK1 and Tyk2, while IFN- γ signaling requires JAK1 and JAK2 [16, 17, 18]. After that discovery, the participation of other JAK proteins in cytokine signaling was described (Table 1).

As shown in Table 1, although JAKs participate in multiple signaling pathways, their importance in modulating immune responses is evident. Therefore, their function is mainly in cytokine signaling.

Table 1. JAK Family

	Cytokine or factor
JAK1	IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-4, IL-13, IL-6, IL-11, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-10, CT-1
JAK2	IL-3, IL-12, IL-13, IL-6, IL-11, IFN- γ , CT-1, Growth hormone, Prolactin, Eritropoietin
JAK3	IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-4
TyK2	IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, CT-1, IFN- α , IFN- β , IL-10

STAT family

The STAT proteins are a family of transcription factors composed of 7 members. In 1994, Darnell and colleagues identified the first two members of the family, STAT1 and 2, by purification of factors linked to IFN stimulated genes; the other family members were described subsequently and are STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b and STAT6 [19, 20, 21, 22, 23]. These

proteins act as transcription factors when they form homo- and heterodimers among them. Dimerization is possible once STATs have been phosphorylated at tyrosine residues in their SH2 domain (Fig.1). STATs are the only family of transcription factors that contain SH2 domains for phosphotyrosines that serve mainly for both binding to the activated cytokine receptor and activating STATs through tyrosine phosphorylation [24]. STAT proteins together with JAKs are involved in many cytokine signaling pathways (Table 2).

Table 2. STAT Family

	Cytokine or factor
STAT1	IL-2, IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-27
STAT2	IFN- α , IFN- β
STAT3	LIF, IL-10, IL-6, IL-27, Growth hormone
STAT4	IL-12
STAT5a/b	Prolactin, Growth hormone, Thrombopoietin
STAT6	IL-4, IL-13

The Janus kinase/signal transducers and activators for transcription (JAK/STAT) pathway regulate a large plethora of biological processes including

cell proliferation, differentiation, cell migration and apoptosis [25]. Ligand binding induces an intracellular activation through the multidimerization of different cytokine receptors units [25], followed by JAKs recruitment to the cytoplasmic domain of the cytokine receptor. JAK activation occurs when a tyrosine residue in the cytokine receptor is phosphorylated, creating a docking site for cytoplasmic STAT. While STAT proteins are attached to the cytokine receptor, JAK proteins phosphorylate them at a tyrosine residue, detaching the STAT protein from the cytokine receptor so that the STATs form homo- and heterodimers that will translocate to the nucleus and bind DNA sequences to promote gene expression (Fig. 2).

An important characteristic observed in diverse helminthic infections is the participation of some members of the STAT protein family and their associated tyrosine kinases family (JAK kinases) in the regulation of susceptibility and resistance to the infection. Several reports have shown that STAT proteins participate in diverse cytokines signaling pathways, such as IL-4 and IL-13, particularly involving STAT6, responsible for triggering the Th2 immune responses at the transcriptional level, which is a feature of helminth infections.

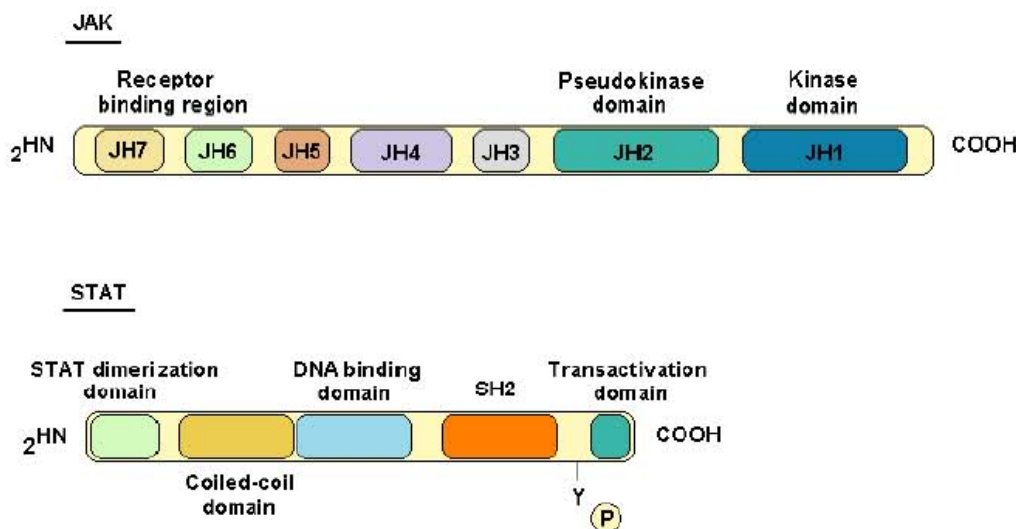
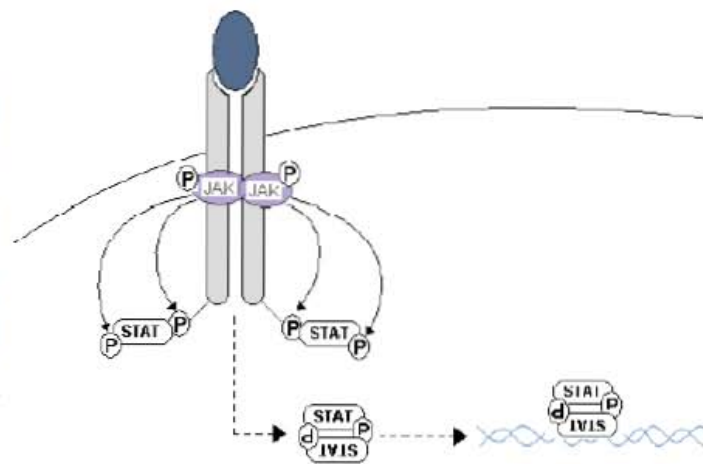


Figure 1. JAK and STAT protein structures. JAK proteins feature 7 domains; they owe their name due to the homology of JH1 and JH2 to the two faced god Janus. The difference between both domains is that JH2 lacks some residues implicated in kinase activity. STAT proteins are transcription factors that feature five conserved domains.

Figure 2. JAK/STAT signaling pathway. Cytokine binds with the target receptor; this causes dimerization of receptor chains and the juxtaposition of JAKs, and their reciprocal phosphorylation. Once activated, JAKs phosphorylate the intra-cytoplasmic regions of the cytokine receptor; creating a docking site for cytoplasmic STATs that once joined with the receptor are activated by JAK phosphorylation in a tyrosine residue. STATs dimers act as transcriptional factors recognizing specific DNA sequences.



IFN- γ is a cytokine affected by helminth infections. One of the most important functions of this cytokine is classic activation of macrophages, and it is also known that chronic infections with this kind of parasite preferentially induce an alternative state of activation in this cell lineage. It has been shown that AAM Φ s are induced by stimulation with IL-4, and they do not have the faculty to adequately respond to IFN- γ [26, 27]. This may be the key to the relationship between helminth infections and the JAK/STAT proteins because is STAT1 precisely the transcription factor involved in the IFN- γ signaling pathway.

JAK/STAT in helminth infections

Large amount of information has demonstrated that the JAK/STAT pathway is involved in helminth infections, suggesting that family members of these families might participate in mediating susceptibility or resistance to different helminth infections.

Helminth parasites are a heterogeneous group with common characteristics, such as host modulation of the immune response to generate a permissive environment that favors infection and induction of the development and polarization of the immune response towards a Th2 dominant profile. It is known that development of Th2 immune responses is IL-4-dependent, while the Th1 immune responses depend mainly on IL-12 and IFN- γ [28]. These important cytokines exert their biological effects signaling through the JAK/STAT pathway. However, the mechanisms involved in helminth immune modulation remain unclear, but there is evidence that indicates the importance of the presence or absence of some JAK/STAT proteins to modify the resistance or susceptibility to these parasite infections

STAT1 and helminths

STAT1 is an important player in IFN- γ signaling. It has been demonstrated that IFN- γ is a very important cytokine in the development and regulation of Th1-type immune response and inflammatory responses. Whereas IFN- γ plays a critical role in protecting animals against viral, bacterial, and protozoan pathogens, its role on many helminthic infections is practically unknown. Moreover, it was previously thought that Th1-mediated immune responses did not participate as effector responses against helminth infections. However, several new evidences show that immune response against these parasites is a very complex event. Effectors' mechanisms against helminths are not exclusively limited to Th2-type responses, but Th1-type responses may participate and develop effector mechanisms depending on diverse factors such as the type of helminth infection, site where the helminth is established (intestinal lumen, liver, muscle, lung or brain), and the life cycle stage of the parasite (eggs, larvae or adult).

In contrast to other STAT family proteins, very few reports exist regarding how STAT1 participates in helminth infections. Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematode flatworms of the genus *Schistosoma*, and in particular *Schistosoma mansoni*, affecting both human and cattle. The immune response against this parasite is initiated by soluble egg antigens (SEA) derived by laying eggs in the lung and liver. During the development of the infection, a significant decrease of Th1-type cytokine (IL-12, IFN- γ and TNF- α) expression has been observed followed by a clear augmentation in the production of regulatory and Th2-type cytokine (TGF- β , IL-10, IL-4) ex-

pression in splenocytes, protecting host-pathology and control etiology of sickness [29].

Due to the fact that STAT1 is not only involved in the Th1 response but also in regulating cytokine signaling (i.e., IL-10), Goh and colleagues [30] analyzed the effect of SEA in activating different signaling pathways that could induce Th2 immune responses. Interestingly, among the molecules activated by SEA, this group observed that p38 and Erk 1/2 signaling pathways were activated but STAT1 was not.

In murine schistosomiasis, IFN- γ and the Th1 response can protect against severe fibrosis by preventing AAM Φ activation and thereby limiting the fibrosis by enhancing effects of the Th2 response [31]. However, in humans Mwatha and colleagues [32] reported Th1-type immune responses in individuals with severe hepatosplenomegaly, whereas individuals infected but with less-severe hepatosplenomegaly mounted Th2-type responses. Thus, STATs controlling Th1 or Th2 responses may be involved in regulating the balance between pathology and elimination of this helminth infection.

In contrast to the dearth of knowledge regarding participation of STAT1 in helminth infections, there is evidence of its importance in protozoan infections. When C57BL/6 mice that mount a strong Th1 response against *Leishmania major* infection lack STAT1, they became highly susceptible to this infection [33]. In some helminth infections such as filariasis, cysticercosis and echinococcosis, the early immune response is Th1-mediated, which sometimes correlates with rapid control of the infection or maintenance of low parasite burdens. However, this response is mainly transient, and it rapidly shifts towards Th2 immune responses that may favor the establishment of the helminth. Keeping in mind that STAT1 is key molecule in Th1-type immune response development, this suggests that a rigorous study on STAT1 participation in helminth infections is clearly missing in the literature of the immunoparasitology field, therefore we cannot rule out a possible role for STAT1 in regulating control or pathology of helminth infections.

A role for STAT4 during helminth infections

The transcription factor STAT4 participates in the IL-12 signaling pathway. IL-12 functions as the main physiological inducer of IFN- γ by activated T cells and promotes Th1-type CD4⁺T cell differentiation and therefore may play an important role in response to helminth infections. Thus, STAT4 and STAT1 both induce and sustain a Th1 immune response, and as described below, this response has

been implicated in resistance against some helminths among them *Taenia crassiceps* infection [34, 35, 36].

IL-12 signaling leads to activation of STAT4 by JAK2 and Tyk2 [37, 38]. STAT4 dimers translocate into the nucleus and bind DNA sequences at the IFN- γ activation site (GAS). In T cells and NK cells, the main action of IL-12 is the induction of IFN- γ [39]. By this pathway, STAT4 mediates most of the pro-inflammatory activities of IL-12 and is critical for Th1 differentiation and directing the cell-mediated immune response [40, 41]. Rodriguez-Sosa and colleagues evaluated the role of STAT4 in experimental cysticercosis [34]. Surprisingly they found an unexpected participation of STAT4 in mediating resistance against this helminth. In this study, the authors observed that while wild type (WT) C57BL/6 mice were highly resistant to *T. crassiceps* infection, this group found that C57BL/6 mice lacking STAT4 (STAT4^{-/-}) were highly susceptible to *T. crassiceps* infection. It is worth noting that in cysticercosis caused by *T. crassiceps*, there are sex-associated differences in susceptibility, where males are more resistant, and females show more susceptibility to this infection [42]. Although C57BL/6 is a resistant strain of mouse, these differences in susceptibility became evident in STAT4^{-/-} mice, where both males and females became highly susceptible, but females still presented a greater parasite burden. In addition to the loss of resistance to this infection in STAT4^{-/-} mice, the Th1 immune response was also critically affected; they found a decrease in IgG2a specific antibodies, while there was an increase in IgG1 specific antibodies titers. The absence of STAT4 in this infection also affected splenocyte proliferation to specific antigens where they found an important decrease that was more evident as infection progressed. As expected, the absence of STAT4 decreased the levels of IFN- γ from CD4⁺ enriched cells, whereas the levels of IL-13 and IL-10 were significantly increased.

Another case in which STAT4 appears to be involved is in the effect of vaccination on experimental schistosomiasis. Wynn et al [43] demonstrated that IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosomes by augmenting both humoral and cell-mediated immune responses, and because IL-12 biological activity is STAT4-dependent, cysticercosis caused by *T. crassiceps* is not the only helminth infection related to STAT4 and protection. Interestingly, this protein has been also involved in anti-filarial responses. Those parasites are typical of tropical environments and are capable of avoiding immune response to facilitate their permanence in their host [44, 45]. Like other nematodes, filarias induce a Th2 response in their host [46]. Recent studies trying to un-

cover how filarias avoid immune response have demonstrated that these parasites are capable of ontogenic transformations of surface epitope expression [47, 48]. Besides surface antigens, Muthian and colleagues [35] demonstrated another immune evasion mechanism related to secreted lipids from the filarial parasite *Sctaria digitata*, named, secreted filarial lipids (SFL). This group observed that proliferation of T cells induced by myelin antigens was decreased when co-stimulated with SFL, as well as IL-12 and IFN- γ production. Given that IFN- γ production is related to STAT4 activation, they analyzed the effect of SFL on STAT4 phosphorylation in IL-12-stimulated T cells; they observed that SFL decreased STAT4 activation in a dose-dependent manner. This same phenomenon was observed in the proteins responsible for STAT4 phosphorylation in response to IL-12, JAK2 and TyK2. Thus, the infection with *S. digitata* inhibits Th1 response by secreting lipid antigens that inhibit STAT4 activation favoring polarization toward a Th2 immune response. This suggests an important immune evasion mechanism where helminth-derived products drive host immune response toward a Th2 profile that, in some infections, works as an effector mechanism to remove parasites, but in other cases works as an evasion mechanism that favors establishment of the infection. Surprisingly, STAT4 has been recently implicated in Th2 immune response development; Syrbe et al [36] observed that although they employ *Nippostrongylus brasiliensis*, an infection model that triggers Th2 immune response, when mice lacking STAT4 were infected there was a decrease in the number of cells producing IL-4. Thereby it is possible that STAT4 participates in Th2 immune response development, at least during *N. brasiliensis* infection.

The Role of STAT6 in resistance to helminth infections

It is generally recognized that IL-4 and IL-13-producing CD4⁺ Th2 cells and eosinophils play an important role in inhibiting and killing helminth parasites and impeding helminth establishment and growth, as signature molecules associated with Th2-type immune responses are the predominant cytokines present either in circulation or at the site of infection during helminth parasitic infections [2]. These infections can be related to STAT6 because this transcription factor is a key molecule involved in IL-4 and IL-13 cytokine signaling [49]. The IL-4R and IL-13R share a common receptor chain involved in signal transduction. Both IL-4 and IL-13 are activators of STAT6, which mediates most biological activities of these cytokines. STAT6^{-/-} mice display impaired Th2 differentiation and lose responsiveness to IL-4 and

IL-13, but these animals are capable to maintain normal responses to other cytokine signals. The importance of IL-4, IL-13 and STAT6 in mediating resistance during helminth infection was clearly demonstrated in experimental models of infection with the gastrointestinal parasite *Trichinella spiralis*. It has been observed that while IFN- γ deficiency accelerates infection clearance, mice with IL-4R α deficiency did not achieve worm expulsion, nor did STAT6^{-/-} mice. The STAT6^{-/-} mice also displayed an increase in parasite burden and significant changes in cytokine profile production, evidenced by a decrease in IL-4 and IL-13 and increase in IFN- γ production eleven days post infection. Moreover, it was observed that STAT6 was participating through mast cell-dependent mechanisms [50]. Thus, STAT6 and Th2 immune response are important in *T. spiralis* clearance.

Besides mast cell participation in *T. spiralis* expulsion, other important cell population that has been implicated in this process is the goblet cells, whose participation is STAT6-dependent, suggested by Khan and colleagues in 2001 [51]. This scientific group worked with STAT6^{-/-} mice and observed that these mice lost the resistance to infection comparing with WT mice, as demonstrated by higher parasite burden. Furthermore, it was also observed that the production of IL-4 and IL-13 was decreased 14 days post infection associated with a significant decrease in goblet cell numbers. In addition, the decrease in goblet cell production is important in the context that *T. spiralis* infection is characterized by an induced goblet cell hyperplasia necessary for worm expulsion [52, 53].

T. spiralis clearance has also been shown to be related to intestinal muscle hypercontractility. Mice strains that show a quick clearance of this worm also show greater gut muscle hypercontractility [54]. This hypercontractility depends on both CD4⁺ and MHC-II⁺ T cells [55], although mechanisms involved in these events remain unclear. Thus, trying to determine possible mechanisms, in 2001 Khan and colleagues [56] analyzed the participation of IL-4 and STAT6 in hypercontractility development and its relationship with parasite expulsion. They observed that *T. spiralis* infection induced an increase in IL-4 and IL-6 cytokine production in mesenteric lymph node and spleen cell culture supernatants stimulated with ConA. However, this increase was not observed in STAT6^{-/-} mice. Together with these results, they found a marked attenuation of carbachol-induced muscle contraction in STAT6^{-/-} mice but only a slight decrease in muscle hypercontractility in IL-4^{-/-} mice. Parasite burden was delayed in STAT6^{-/-} mice, but was almost normal in mice lacking IL-4. Thus, the

absence of STAT6 is important in gut hypercontractility that can be related to the inefficiency of parasite expulsion. However, this seems to be an IL-4 independent event, so perhaps other cytokines such as IL-13 or IL-9 may be responsible for *T. spiralis* gastrointestinal infection clearance.

However, *T. spiralis* infection is not strictly restricted to the gastrointestinal site, but the larval stage of this parasite rapidly can get into the blood stream and disseminate in the host. In order to investigate the influence of Th2 cytokines during muscle infection with *T. spiralis*, Beiting et al [57] infected STAT6^{-/-} mice. These mice were in a BALB/c background, which would be expected to mount a strong Th2 response. Tissue muscle recovered from BALB/c mice at 18 dpi contained numerous mature larvae and fully developed nurse cells surrounded by focal infiltrates. In contrast, nurse cells from STAT6^{-/-}-infected mice had markedly reduced inflammatory infiltrates around infected cells and reduced numbers of lymph node cells. When stimulated with larval antigens, lymph node cells from BALB/c mice produced significantly more IL-4, IL-5, and IL-13, but less IFN- γ , compared with their STAT6^{-/-} counterparts, whereas IL-10 concentrations were comparable in BALB/c and STAT6^{-/-} mice. Interestingly, despite impairment of Th2 responses and inflammation in STAT6^{-/-} mice, larval burdens were similar to those in BALB/c mice. These data highlights a more important role for STAT6 in eliminating gastrointestinal worms than in tissue-dwelling helminths.

Another helminth parasite infection in which STAT6 appears to be involved is the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. The third-stage larvae of this parasite infect mice through the skin, migrate into the lungs, are coughed up, ingested, travel to gut lumen where mature adults reside, produce eggs that are excreted in the feces, and are themselves expelled approximately 10 days after the initiation of infection [58]. In 1988, Katona and colleagues [59] described that even when Th2 responses are necessary for parasite expulsion, IL-4 is not, while treatment of infected mice with IL-12 blocks worm expulsion [60]. Although those results suggest that the primary mechanism of host protection against *N. brasiliensis* might be production of a Th2 immune response, it seems to be IL-4-independent but may be related to other molecules involved in Th2 polarization, like IL-4 cytokine receptor IL-4R α or STAT6.

Urban and colleagues [4] analyzed whether *N. brasiliensis* expulsion was affected in mice lacking IL-4R α or STAT6. They found that both deficient animals failed to expel *N. brasiliensis* and presented elevated egg burdens, whereas WT mice did not.

These results were confirmed with the administration of anti-IL-4R α to WT mice, which lost resistance evidenced by the presence of egg and parasite burden. They also found antibody isotype changes, as WT mice produced IgG1 whereas IgG2a, characteristic in Th1 responses, was not detected. On the other hand, STAT6^{-/-} mice produced greater levels of both IgG1 and IgG2a antibodies during chronic infection. The fact that IL-4 is not the only cytokine that uses IL-4R α for signaling suggests analysis of the participation of IL-13, which also signals through IL-4R α , might be appropriate. Administration of soluble IL-13R α 2-Fc, a fusion protein that neutralizes IL-13, in WT mice infected with *N. brasiliensis*, demonstrated that these mice became susceptible to infection. So, protection against *N. brasiliensis* depends mainly on STAT6 but not on IL-4, and STAT6 might be activated through IL-13 signaling, a cytokine related to Th2 immune response in addition to IL-4. This exhibits the importance of STAT6 in protection against gastrointestinal helminth infections.

Another enteric helminth related to this transcription factor is the cestode *Hymenolepis diminuta*. In 2003, McKay and Khan [61] described the importance of STAT6 in this infection by analyzing the participation of IL-4, IL-13 and STAT6 in worm expulsion. They found that adult worms were harbored in the gut only in STAT6^{-/-} mice, and that both IL-4 and IL-13 deficient mice were able to expel *H. diminuta*. Another important finding was the reduced goblet cell numbers found in STAT6^{-/-} mice that was related to susceptibility to infection.

Brugia malayi is a human-infecting tissue-dwelling nematode that induces a Th2 response that also seems to be beneficial in rodent hosts. In the mouse model of infection, immunocompetent mice are able to clear the parasites [62]. In 2001, Spencer and colleagues described that IL-4 is required for clearance of *Brugia* from BALB/c [63] and C57BL/6 mice strains. This was evidenced in IL-4 and STAT6^{-/-} mice, which still harbored live worms 6 weeks post-infection in BALB/c mice and two and four weeks post-infection in C57BL/6 mice, contrary to WT mice in both strains. Therefore, IL-4 favors parasite clearance via the STAT6 signaling pathway in filariasis.

Another helminth infection is murine cysticercosis caused by the helminth parasite *Taenia crassiceps*, which induces a strong Th2-like response. Interestingly, *T. crassiceps*-infected mice develop a transient Th1-like response during the first weeks of infection, but later they develop a dominant Th2 response in chronic phases of infection (>4 weeks) that is associated with an increase in parasite loads [64]. Trying to

confirm that development of Th2 immune response correlates with susceptibility to this infection, Rodriguez-Sosa and colleagues [65] analyzed the role of a Th2-type response induced via STAT6-mediated signaling in BALB/c mice during *T. crassiceps* infection. They found that even when BALB/c mice were susceptible to infection and carried approximately 400 intraperitoneal metacystodes at 12 weeks after infection, STAT6^{-/-} mice resolved the infection as early as 4 weeks post-infection. STAT6^{-/-} mice, together with resistance to infection, developed a dominant Th1-type response with high levels of anti-*T. crassiceps*-specific IgG2a antibodies, and lower levels of specific IgG1 and total IgE antibodies compared to WT mice; they also produced higher levels of IFN- γ and lower levels of IL-4 and IL-13 in the course of infection. Consistent with this, macrophages from STAT6^{-/-} *T. crassiceps*-infected mice displayed an inflammatory phenotype with high IL-12 and NO production compared to macrophages from WT mice which displayed an alternative activation phenotype, with inhibited IL-12 production and NO and high expression of Arginase-1, PD-L2 and IL-4R α [66]. Together, these results show that murine cysticercosis requires a Th1 immune response development to clear infection, while Th2 immune response mediated by STAT6 is related to susceptibility to this extra-intestinal infection.

As previously described, while STAT6-mediated Th2 immune response is not always related to helminth resistance, it may be dependent on several factors, such as the site of infection, type of parasite and chronicity of the infection, among others. Thus, re-

cently Mishra et al. [67] analyzed the development of immunopathology in a murine model of neurocysticercosis caused by *Mesocostoides corti* in the absence of STAT6. They found that WT BALB/c mice, as seen with *T. crassiceps* infection [26, 68, 69, 70], induced expression of markers associated with alternatively activated macrophages such as Ym1, Fizz1, Arg-1, MR1 and MGL 1/2 in the brains of infected mice. Interestingly, STAT6^{-/-} mice showed a down-regulation in the expression of AAM Φ associated molecules compared with WT mice. As reported previously by Rodriguez-Sosa et al [71], STAT6 deficient mice with cysticercosis displayed also increased iNOS expression. However, these mice displayed enhanced susceptibility to *M. corti* and greater neuropathology (abnormal vestibular function, tilted head, walking in circles, and morbidity). Thus, it appears that in this model STAT6 may participate by controlling excessive pathology (inflammation) through the development of AAM Φ s, which have been proven to have suppressive activity mainly mediated by the Death-ligand pathway [66]. Furthermore, AAM Φ s may participate by healing central nervous system damage during neurocysticercosis, as one the newest functions associated with AAM Φ s during helminth infections [72]. Interestingly, the development of AAM Φ s and the expression of PD-L2 in such cells have been recently confirmed to be STAT6-dependent [73], suggesting that an anti-inflammatory and healing processes during helminth infections may be also associated with STAT6 function.

Table 3. STATs in helminth infections

	Parasite	Effect	References
STAT1	<i>Schistosoma mansoni</i>	Soluble egg antigens (SEA) do not induce STAT1 phosphorylation in macrophages but induce ERK and p38 activation.	[30]
STAT4	<i>Taenia crassiceps</i>	Genetically resistant C57BL/6 mice became susceptible when lacking STAT4 gene.	[34]
	<i>Setaria digitata</i>	Secreted filarial lipids (SFL) down-regulate Th1 immune responses by decreasing STAT4 phosphorylation in a dose-dependent manner.	[35]
	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Decrease in frequency of IL-4 producing cells in infected STAT4 ^{-/-} mice.	[36]
STAT6	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	IL4-R α and STAT6 are necessary for worm expulsion; IL-13 is decisive for clearance.	[4]
	<i>Trichinella spiralis</i>	Absence of STAT6 is related to higher parasite burden and lower Th2 cytokines.	[50]
		STAT6 and Th2 cytokines seems to be necessary for goblet cell hyperplasia.	[51]
		Gut muscle hyper-contractility necessary for worm expulsion depends on STAT6 signaling.	[56]
	<i>Hymenolepis diminuta</i>	Resistance is mediated by STAT6 but do not depend on IL-4 or IL-13 alone. The absence of STAT6 down regulates goblet cells.	[61]
	<i>Brugia malayi</i>	IL-4 and STAT6 are required for clearance from BALB/c and C57BL/6 mice.	[63]
	<i>Taenia crassiceps</i>	STAT6 deficient mice were resistant to infection with an intense Th1 response.	[65]
	<i>Mesocostoides corti</i>	In murine neurocysticercosis STAT6 deficient mice succumbed faster given an intense inflammatory response	[67]

Conclusion

The pathology and resolution of different helminth infections is dependent to a large extent on the infecting species, the model used, and the site of infection. STATs molecules do have a role in all cases either by initiating the development of a Th1 response as in schistosomiasis and cysticercosis or development of Th2 response in case of gastrointestinal infections. The major cytokines in both cases are IL-12, IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-13 the effects of which are mediated by specific STATs. Thus, even when STAT6 participates in the expulsion of some gut parasites, a STAT4 mediated Th1 immune response seems to be necessary to control extra-intestinal larvae stages. Hence, both of these STATs proteins are necessary in trigger immune responses against helminth infections but play different role. The fact that helminth-derived antigens have been demonstrated to inhibit at least STAT4 activation, it must be enough motivation to try new helminth antigens to study STAT modulation in different target cells, this will help to clarify how helminths modulate the immune response.

Acknowledgments

This work was supported by grants IN212909 PAPIIT-UNAM, PAPCA-FES Iztacala 23 (2010-2011), and ICYTDF. It is part of the requirements to obtain the PhD degree in the Postgraduate Program in Biomedical Sciences, Facultad de Medicina, UNAM, for M.B.D. who was supported by a fellowship from CONACYT-Mexico.

Conflict of Interests

The authors have declared that no conflict of interest exists.

References

- Maizels R, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor M, and Allen J. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol Rev.* 2004; 201: 89-116.
- Pearce EJ, Reiner SL. Induction of Th2 responses in infectious diseases. *Curr Opin Immunol.* 1995 Aug;7(4):497-504.
- King CL, Kumaraswami V, Poindexter RW, Kumari S, Jayaraman K, Alling DW, Ottesen EA, Nutman TB. Immunologic tolerance in lymphatic filariasis. Diminished parasite-specific T and B lymphocyte precursor frequency in the microfilaremic state. *J Clin Invest.* 1992 May; 89(5): 1403-1410.
- Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M, Finkelman FD. IL-13, IL-4/alpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity.* 1998 Feb;8(2):235-64.
- Reyes J.L., Terrazas L.I. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunol.* 2007; 29: 609-619.
- Gillan V, Devaney E. Regulatory T cells modulate Th2 responses induced by *Brugia pahangi* third-stage larvae. *Infect Immun.* 2005 Jul;73(7):4034-42.
- Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(2):148-54.
- Taylor MD, van der Werf N, Harris A, Graham AL, Bain O, Allen JE, Maizels RM. Early recruitment of natural CD4+ Foxp3+ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection. *Eur J Immunol.* 2009 Jan;39(1):192-206.
- Williams JG. STAT signalling in cell proliferation and in development. *Curr Opin Genet Dev.* 2000 Oct;10(5):503-7.
- Darnell JEJ, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular-lar. *Science.* 1994;264(5164):1415-21.
- Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zürcher G, Ziemiecki A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1991 Apr;11(4):2057-65.
- Firmbach-Kraft I, Byers M, Shows T, Dalla-Favera R, Krolewski JJ. Tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene.* 1990 Sep;5(9):1329-36.
- Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A, Aston RR, Wilks AF. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene.* 1992 Jul;7(7):1347-53.
- Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, Blake TB, Shibuya K, Ortaldo JR, McVicar DW, O'Shea JJ. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature.* 1994. 370:151-53.
- Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol.* 2000. May;20(10):3387-95.
- Velazquez L, Fellous M, Stark G, and Pellegrini S. A Protein Tyrosine Kinase in the Interferon alpha/beta signaling Pathway. *Cell.* 1992 Jul 24;70(2):313-22.
- Watling D, Guschin D, Muller M, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Rogers NC, Schindler C, Stark GR, Ihle JN, et al. Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature.* 1993. 366:166-70.
- Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature.* 1993. 366:383-85.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Science. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science.* 1994 Apr 1;264(5155):95-8.
- Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Wong SC, McKnight SL. Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. *Immunity.* 1995;2(4):321-9.
- Yamamoto K, Quelle FW, Thierfelder WE, Kreider BL, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Silvennoinen O, Ihle JN. Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Mol Cell Biol.* 1994 Jul;14(7):4342-9.
- Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L. Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(19):8831-5.
- Quelle FW, Shimoda K, Thierfelder W, Fischer C, Kim A, Ruben SM, Cleveland JL, Pierce JH, Keegan AD, Nelms K, et al. Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Mol Cell Biol.* 1995 Jun;15(6):3336-43.
- Schindler CW. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1133-7.

25. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004 Mar 15;117(Pt 8):1281-3.
26. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992 Jul 1;176(1):287-92.
27. Rodríguez-Sosa M, Rivera-Montoya I, Espinoza A, Romero-Grijalva M, López-Flores R, González J, Terrazas LI. Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cell Immunol.* 2006 Aug;242(2):61-71.
28. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010 Mar;28:445-89.
29. Pearce EJ. Priming of the immune response by schistosome eggs. *Parasite Immunol* 2005; 27:265-70.
30. Goh F, Irvine KM, Lovelace E, Donnelly S, Jones MK, Brion K, Hume DA, Kotze AC, Dalton JP, Ingham A, Sweet MJ. Selective induction of the Notch ligand Jagged-1 in macrophages by soluble egg antigen from *Schistosoma mansoni* involves ERK signalling. *Immunology.* 2009 Jul;127(3):326-37.
31. Wynn TA, Cheever AW, Jankovic D, Poindexter RW, Caspar P, Lewis FA, Sher A. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature.* 1995 Aug 17;376(6541):594-6.
32. Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, Mbugua GG, Ouma JH, Mumo J, Fulford AJ, Jones FM, Butterworth AE, Roberts MB, Dunne DW. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol.* 1998 Feb 15;160(4):1992-9.
33. Rosas LE, Keiser T, Pyles R, Durbin J, Satoskar AR. Development of protective immunity against cutaneous leishmaniasis is dependent on STAT1-mediated IFN signaling pathway. *Eur J Immunol.* 2003 Jul;33 (7):1799-805.
34. Rodríguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR, Terrazas LI. A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun.* 2004. Aug;72(8):4552-60.
35. Muthian G, Pradeep C, Sargapradeep K, Kaleysaraj R, Bright J. *Setaria digitata* secreted filarial lipids modulate IL-12 signaling through JAK-STAT pathway leading to the development of Th1 response. *Experimental Parasitology* 2006. 114: 193-203.
36. Syrbe U, Hoffmann U, Schlawe K, Liesenfeld O, Erb K, Hamann A. Microenvironment-Dependent Requirement of STAT4 for the Induction of P-Selectin Ligands and Effector Cytokines on CD4+ T Cells in Healthy and Parasite-Infected Mice. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 7673-7679.
37. Schindler, C. and Darnell, J., Jr., Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem.* 1995. 64: 621-651.
38. Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K. and Silvennoinen, O., Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol.* 1995. 13: 369-398.
39. Lund RJ, Chen Z, Scheinin J, Lahesmaa R. Early target genes of IL-12 and STAT4 signaling in th cells. *J Immunol.* 2004 Jun 1;172 (11):6775-82.
40. Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr, Murphy KM. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med.* 1995 May 1;181(5):1755-62.
41. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature.* 1996 Jul 11;382(6587):174-7.
42. Sciuotto E, Fragoso G, Diaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, Lomeli C, Larralde C. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res.* 1991;77(3):243-6.
43. Wynn TA, Reynolds A, James S, Cheever AW, Caspar P, Hieny S, Jankovic D, Strand M, Sher A. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosomes by augmenting both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite. *J Immunol.* 1996 Nov 1;157(9):4068-78.
44. Maizels RM, Bundy DAP., Selkirk ME, Smith DF, Anderson RM. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 1993; 365: 797-805.
45. Maizel RM, Gomez-Escobar N, Gregory WF, Murray J, Zang X. Immune evasion genes from filarial nematodes. *International Journal of Parasitology* 2001; 31: 889-898.
46. Dalai SK, Das D, Kar SK. *Setaria digitata* adult 14- to 20-kDa antigens induce differential Th1/Th2 cytokine responses in the lymphocytes of endemic normal and asymptomatic microfilariae carriers in bancroftian filariasis. *Journal of Clinical Immunology* 1998; 18: 114-123.
47. Bright JJ, Raj RK. Ontogenetic transformation of surface epitope expression, an adaptive immunoevasive strategy of filarial parasites. *Indian Journal of Experimental Biology* 1994; 32: 49-54.
48. Lawrence RA. Immunity to filarial nematodes. *Veterinary Parasitology* 2001. 100: 33-44.
49. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity.* 1996 Mar;4(3):313-9.
50. Urban JF, Schopf L, Morris SC, Orekhova T, Madden K, Betts C, Gamble HR, Byrd C, Donaldson D, Else K, Finkelman FD. Stat6 signaling promotes protective immunity against *Trichinella spiralis* through a mast cell- and T Cell-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 2046-2052.
51. Khan WI, Blennerhasset P, Ma C, Matthaei KI, Collins SM. Stat6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. *Parasite Immunol.* 2001 Jan;23(1):39-42.
52. Garside P, Grecnis RK, McMowat A. T lymphocyte dependent enteropathy in murine *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunology* 1992; 14: 217-225.
53. Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF Jr. The role of IL-13 in helminth induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 420-426.
54. Vallance BA, Blennerhasset PA, Collins SM. Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode infected mice. *Am. J. Physiol.* 1997 35:G321-G327.
55. Vallance BA, Collins SM, Snider DP. CD4 T cells and major histocompatibility couple class II expression influence worm expulsion and increased intestinal muscle contraction during *Trichinella spiralis* infection. *Infect Immun.* 1999 67:6090-6097.
56. Khan WI, Vallance BA, Blennerhasset PA, Deng Y, Verdu EF, Matthaei KI, Collins SM. Critical role for signal transducer and activator of transcription factor 6 in mediating intestinal muscle hypercontractility and worm expulsion in *Trichinella spiralis*-infected mice. *Infect Immun.* 2001 Feb;69(2):838-44.
57. Beiting DP, Gagliardo LF, Hesse M, Bliss SK, Meskill D, Appleton JA. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF-beta. *J Immunol.* 2007 Jan 15;178(2):1039-47.
58. Ogilvie BM, Hockley DJ. Effects of immunity on *Nippostrongylus brasiliensis* adult worms: reversible and irreversible changes in infectivity, reproduction, and morphology. *J Parasitol.* 1968 54: 1073-1084.
59. Katona IM, Urban JF Jr., Finkelman FD. The role of L3T4 and Lyt21 T cells in the IgE response and immunity to *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Immunol.* 1988; 140: 3206-3211.
60. Finkelman FD, Madden KB, Cheever AW, Katona IM, Morris SC, Gately MK, Hubbard BR, Gause WC, and Urban JF Jr. Ef-

- fects of interleukin-12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. *J Exp. Med.* 1994; 179: 1563-1572.
61. McKay DM, Khan WI. STAT-6 is an absolute requirement for murine rejection of *Hymenolepis diminuta*. *J Parasitol.* 2003 Feb;89(1):188-9.
 62. Loke P, MacDonald AS, Allen JE. Antigen-presenting cells recruited by *Brugia malayi* induce Th2 differentiation of naive CD4(+) T cells. *Eur J Immunol.* 2000 Apr;30(4):1127-35.
 63. Babu S, Ganley LM, Klei TR, Shultz LD, Rajan TV. Role of gamma interferon and interleukin-4 in host defense against the human filarial parasite *Brugia malayi*. *Infect Immun.* 2000 May;68(5):3034-5.
 64. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol.* 1998 Feb;84(1):74-81.
 65. Rodríguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3135-9.
 66. Terrazas LI, Montero D, Terrazas CA, Reyes JL, Rodríguez-Sosa M. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol.* 2005 Nov;35(13):1349-58.
 67. Mishra BB, Gundra UM, Teale JM. STAT6^{-/-} mice exhibit decreased cells with alternatively activated macrophage phenotypes and enhanced disease severity in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol.* 2011 Mar;232(1-2):26-34.
 68. Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol.* 1998 Jun 1;160(11):5347-54.
 69. Raes G, De Baetselier P, Noël W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2002 Apr;71(4):597-602.
 70. Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanham G, Noël W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Bergh R, Leenen PJ, De Baetselier P, Ghassabeh GH. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol.* 2005 Mar;77(3):321-7.
 71. Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderón R, Gomez-García L, Saavedra R, Bojalil R, Terrazas LI. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun.* 2002 Jul;70(7):3656-64.
 72. Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jun; 11(6):375-88.
 73. Huber S, Hoffmann R, Muskens F, Voehringer D. Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. *Blood.* 2010 Oct 28;116(17):3311-20.

REFERENCIAS

- Alexander J, Russell DG (1992) The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advances in parasitology* 31:175-254
- Almand B, et al. (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of immunology* 166(1):678-89
- Alonso-Trujillo J, Rivera-Montoya I, Rodriguez-Sosa M, Terrazas LI (2007) Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology research* 100(6):1341-50 doi:10.1007/s00436-006-0424-4
- Arora T, et al. (2003) PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *The Journal of biological chemistry* 278(24):21327-30 doi:10.1074/jbc.C300119200
- Baeck C, et al. (2012) Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 61(3):416-26 doi:10.1136/gutjnl-2011-300304
- Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC (2000) Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 17(10):915-25
- Becerra-Diaz M, Valderrama-Carvajal H, Terrazas LI (2011) Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family members in helminth infections. *International journal of biological sciences* 7(9):1371-81
- Becker S, Groner B, Muller CW (1998) Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394(6689):145-51 doi:10.1038/28101
- Belosevic M, Finbloom DS, Van Der Meide PH, Slayter MV, Nacy CA (1989) Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *Journal of immunology* 143(1):266-74
- Bertholet S, Dickensheets HL, Sheikh F, Gam AA, Donnelly RP, Kenney RT (2003) *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infection and immunity* 71(4):2095-101
- Bhardwaj N, Rosas LE, Lafuse WP, Satoskar AR (2005) *Leishmania* inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by *Leishmania mexicana*. *International journal for parasitology* 35(1):75-82 doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.018
- Blanchette J, Racette N, Faure R, Siminovitch KA, Olivier M (1999) *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *European journal of immunology* 29(11):3737-44 doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11<3737::AID-IMMU3737>3.0.CO;2-S
- Bosschaerts T, et al. (2010) Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. *PLoS pathogens* 6(8):e1001045 doi:10.1371/journal.ppat.1001045
- Brojer CM, Peregrine AS, Barker IK, Carreno RA, Post C (2002) Cerebral cysticercosis in a woodchuck (*Marmota monax*). *Journal of wildlife diseases* 38(3):621-4 doi:10.7589/0090-3558-38.3.621
- Bronte V, et al. (2000) Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96(12):3838-46
- Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L (1998) Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Experimental neurology* 151(1):77-88 doi:10.1006/exnr.1998.6785

- Carrera L, et al. (1996) Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *The Journal of experimental medicine* 183(2):515-26
- Coller SP, Mansfield JM, Paulnock DM (2003) Glycosylinositolphosphate soluble variant surface glycoprotein inhibits IFN-gamma-induced nitric oxide production via reduction in STAT1 phosphorylation in African trypanosomiasis. *Journal of immunology* 171(3):1466-72
- Croker BA, et al. (2003) SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nature immunology* 4(6):540-5 doi:10.1038/ni931
- Culbreth KL, Esch GW, Kuhn RE (1972) Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). 3. The relationship between larval biomass and the uptake and incorporation of ¹⁴C-leucine. *Experimental parasitology* 32(2):272-81
- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Jr., Kuriyan J (1998) Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93(5):827-39
- Christophi GP, et al. (2009) Macrophages of multiple sclerosis patients display deficient SHP-1 expression and enhanced inflammatory phenotype. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89(7):742-59 doi:10.1038/labinvest.2009.32
- Chung CD, et al. (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278(5344):1803-5
- Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA (1993) Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259(5102):1739-42
- Dambach DM, Watson LM, Gray KR, Durham SK, Laskin DL (2002) Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology* 35(5):1093-103 doi:10.1053/jhep.2002.33162
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264(5164):1415-21
- Deb DK, et al. (2003) Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma. *Journal of immunology* 171(1):267-73
- Decker T, Kovarik P (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19(21):2628-37 doi:10.1038/sj.onc.1203481
- Delvalle B (1989) Larvae of *Taenia crassiceps* (Cestoda): host specificity and localisation. *Parasitology research* 76(2):181-2
- Denkers EY, Gazzinelli RT (1998) Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical microbiology reviews* 11(4):569-88
- Dietlin TA, Hofman FM, Lund BT, Gilmore W, Stohlman SA, van der Veen RC (2007) Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. *Journal of leukocyte biology* 81(5):1205-12 doi:10.1189/jlb.1006640
- Dunay IR, Fuchs A, Sibley LD (2010) Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infection and immunity* 78(4):1564-70 doi:10.1128/IAI.00472-09
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM (2006) Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of leukocyte biology* 80(6):1298-307 doi:10.1189/jlb.0406249
- Esch GW, Smyth JD (1976) Studies on the in vitro culture of *Taenia crassiceps*. *International journal for parasitology* 6(2):143-9
- Everhart ME, Kuhn RE, Zelmer DA (2004) Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/cJ mice. *The Journal of parasitology* 90(1):79-84 doi:10.1645/GE-3255

- Firnbach-Kraft I, Byers M, Shows T, Dalla-Favera R, Krolewski JJ (1990) tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene* 5(9):1329-36
- Fleming JC, et al. (2006) The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain : a journal of neurology* 129(Pt 12):3249-69 doi:10.1093/brain/awl296
- Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR (1993) Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *Journal of immunology* 151(5):2399-408
- Forget G, Gregory DJ, Olivier M (2005) Proteasome-mediated degradation of STAT1alpha following infection of macrophages with *Leishmania donovani*. *The Journal of biological chemistry* 280(34):30542-9 doi:10.1074/jbc.M414126200
- Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology* 9(3):162-74 doi:10.1038/nri2506
- Gazzinelli RT, et al. (1994) Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology* 153(6):2533-43
- Gazzinelli RT, et al. (1996) In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *Journal of immunology* 157(2):798-805
- Gillan V, Devaney E (2005) Regulatory T cells modulate Th2 responses induced by *Brugia pahangi* third-stage larvae. *Infection and immunity* 73(7):4034-42 doi:10.1128/IAI.73.7.4034-4042.2005
- Gomez-Garcia L, Lopez-Marin LM, Saavedra R, Reyes JL, Rodriguez-Sosa M, Terrazas LI (2005) Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite immunology* 27(10-11):395-405 doi:10.1111/j.1365-3024.2005.00790.x
- Goodridge HS, et al. (2004) In vivo exposure of murine dendritic cell and macrophage bone marrow progenitors to the phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein ES-62 polarizes their differentiation to an anti-inflammatory phenotype. *Immunology* 113(4):491-8 doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01993.x
- Goodridge HS, Wilson EH, Harnett W, Campbell CC, Harnett MM, Liew FY (2001) Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *Journal of immunology* 167(2):940-5
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 3(1):23-35 doi:10.1038/nri978
- Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32(5):593-604 doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007
- Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, Clarke CJ (2008) IFN-gamma signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine & growth factor reviews* 19(5-6):383-94 doi:10.1016/j.cytogfr.2008.08.004
- Greenhalgh CJ, Hilton DJ (2001) Negative regulation of cytokine signaling. *Journal of leukocyte biology* 70(3):348-56
- Helk E, et al. (2013) TNF-alpha-mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during *Entamoeba histolytica* infection. *PLoS pathogens* 9(1):e1003096 doi:10.1371/journal.ppat.1003096
- Heller NM, et al. (2008) Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages. *Science signaling* 1(51):ra17 doi:10.1126/scisignal.1164795
- Herbert DR, et al. (2004) Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20(5):623-35
- Hestdal K, et al. (1991) Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *Journal of immunology* 147(1):22-8

- Horvath CM, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE, Jr. (1996) Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Molecular and cellular biology* 16(12):6957-64
- Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Wong SC, McKnight SL (1995) Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. *Immunity* 2(4):321-9
- Hu X, Park-Min KH, Ho HH, Ivashkiv LB (2005) IFN-gamma-primed macrophages exhibit increased CCR2-dependent migration and altered IFN-gamma responses mediated by Stat1. *Journal of immunology* 175(6):3637-47
- Ihle JN (2001) The Stat family in cytokine signaling. *Current opinion in cell biology* 13(2):211-7
- Isnard A, Shio MT, Olivier M (2012) Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2:72 doi:10.3389/fcimb.2012.00072
- Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG (2009) Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(43):13435-44 doi:10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009
- Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ (2002) The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends in biochemical sciences* 27(5):235-41
- King CL, et al. (1992) Immunologic tolerance in lymphatic filariasis. Diminished parasite-specific T and B lymphocyte precursor frequency in the microfilaremic state. *The Journal of clinical investigation* 89(5):1403-10 doi:10.1172/JCI115729
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285(1-2):1-24
- Kiu H, Nicholson SE (2012) Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth factors* 30(2):88-106 doi:10.3109/08977194.2012.660936
- Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80(5):729-38
- Kovarik P, et al. (1999) Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(24):13956-61
- Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Jr., Gause WC (2007) Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current opinion in immunology* 19(4):448-53 doi:10.1016/j.coi.2007.07.002
- Kumamaru H, Saiwai H, Ohkawa Y, Yamada H, Iwamoto Y, Okada S (2012) Age-related differences in cellular and molecular profiles of inflammatory responses after spinal cord injury. *Journal of cellular physiology* 227(4):1335-46 doi:10.1002/jcp.22845
- Kundu K, Dutta K, Nazmi A, Basu A (2013) Japanese encephalitis virus infection modulates the expression of suppressors of cytokine signaling (SOCS) in macrophages: implications for the hosts' innate immune response. *Cellular immunology* 285(1-2):100-10 doi:10.1016/j.cellimm.2013.09.005
- Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI (2004) Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology* 172(2):989-99
- Langrish CL, et al. (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 201(2):233-40 doi:10.1084/jem.20041257
- Leonard WJ, O'Shea JJ (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annual review of immunology* 16:293-322 doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.293

- Li Q, Pan PY, Gu P, Xu D, Chen SH (2004) Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity. *Cancer research* 64(3):1130-9
- Liao J, Fu Y, Shuai K (2000) Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(10):5267-72
- Lieberman LA, Banica M, Reiner SL, Hunter CA (2004) STAT1 plays a critical role in the regulation of antimicrobial effector mechanisms, but not in the development of Th1-type responses during toxoplasmosis. *Journal of immunology* 172(1):457-63
- Lima LM, et al. (2013) Schistosoma antigens downmodulate the in vitro inflammatory response in individuals infected with human T cell lymphotropic virus type 1. *Neuroimmunomodulation* 20(4):233-8 doi:10.1159/000348700
- Liu B, Gross M, ten Hoeve J, Shuai K (2001) A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(6):3203-7 doi:10.1073/pnas.051489598
- Liu B, et al. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(18):10626-31
- Liu BA, Jablonowski K, Raina M, Arce M, Pawson T, Nash PD (2006) The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. *Molecular cell* 22(6):851-68 doi:10.1016/j.molcel.2006.06.001
- Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L (1995) Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(19):8831-5
- Loke P, Allison JP (2003) PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9):5336-41 doi:10.1073/pnas.0931259100
- Loke P, MacDonald AS, Robb A, Maizels RM, Allen JE (2000) Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. *European journal of immunology* 30(9):2669-78 doi:10.1002/1521-4141(200009)30:9<2669::AID-IMMU2669>3.0.CO;2-1
- Loos-Frank B (2000) An up-date of Verster's (1969) 'Taxonomic revision of the genus Taenia Linnaeus' (Cestoda) in table format. *Systematic parasitology* 45(3):155-83
- Losman JA, Chen XP, Hilton D, Rothman P (1999) Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction. *Journal of immunology* 162(7):3770-4
- Loverde PT, Li C, Maizels RM, Geary TG, Colley DG (2002) Molecular helminthology: an integrated approach. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 66(4):346-7
- Ma J, et al. (2003) Regulation of macrophage activation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60(11):2334-46 doi:10.1007/s00018-003-3020-0
- Mackness GB (1964) The Immunological Basis of Acquired Cellular Resistance. *The Journal of experimental medicine* 120:105-20
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE (2004) Helminth parasites--masters of regulation. *Immunological reviews* 201:89-116 doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00191.x
- Maizels RM, Yazdanbakhsh M (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature reviews Immunology* 3(9):733-44 doi:10.1038/nri1183
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 5(1):62-71 doi:10.1006/niox.2000.0319

- Moncada PA, Montoya JG (2012) Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10(7):815-28 doi:10.1586/eri.12.58
- Morales-Montor J, Escobedo G, Vargas-Villavicencio JA, Larralde C (2008) The neuroimmunoendocrine network in the complex host-parasite relationship during murine cysticercosis. *Current topics in medicinal chemistry* 8(5):400-7
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 8(12):958-69 doi:10.1038/nri2448
- Movahedi K, et al. (2008) Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111(8):4233-44 doi:10.1182/blood-2007-07-099226
- Murray HW (1982) Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *Journal of immunology* 129(1):351-7
- Murray HW, Cohn ZA (1980) Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. III. Enhanced oxidative metabolism as an expression of macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 152(6):1596-609
- Murray HW, Masur H, Keithly JS (1982) Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine-generating capacity. *Journal of immunology* 129(1):344-50
- Nair JS, et al. (2002) Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(9):5971-6 doi:10.1073/pnas.052159099
- Nandan D, Reiner NE (1995) Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infection and immunity* 63(11):4495-500
- Navia BA, Petito CK, Gold JW, Cho ES, Jordan BD, Price RW (1986) Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. *Annals of neurology* 19(3):224-38 doi:10.1002/ana.410190303
- Neel BG (1993) Structure and function of SH2-domain containing tyrosine phosphatases. *Seminars in cell biology* 4(6):419-32
- Nicola NA, et al. (1999) Negative regulation of cytokine signaling by the SOCS proteins. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 64:397-404
- O'Shea JJ, Murray PJ (2008) Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28(4):477-87 doi:10.1016/j.immuni.2008.03.002
- Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC (2007) Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(2 Pt 2):721s-726s doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2197
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of immunology* 182(8):4499-506 doi:10.4049/jimmunol.0802740
- Pearce EJ, Reiner SL (1995) Induction of Th2 responses in infectious diseases. *Current opinion in immunology* 7(4):497-504
- Pineau I, Sun L, Bastien D, Lacroix S (2010) Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain, behavior, and immunity* 24(4):540-53 doi:10.1016/j.bbi.2009.11.007
- Poo YS, et al. (2014) CCR2 deficiency promotes exacerbated chronic erosive neutrophil-dominated chikungunya virus arthritis. *Journal of virology* 88(12):6862-72 doi:10.1128/JVI.03364-13

- Quelle FW, et al. (1995) Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Molecular and cellular biology* 15(6):3336-43
- Raes G, De Baetselier P, Noel W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G (2002) Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *Journal of leukocyte biology* 71(4):597-602
- Ray M, Gam AA, Boykins RA, Kenney RT (2000) Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. *The Journal of infectious diseases* 181(3):1121-8 doi:10.1086/315330
- Reiner NE, Ng W, Ma T, McMaster WR (1988) Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(12):4330-4
- Reyes JL, Terrazas LI (2007) The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite immunology* 29(12):609-19 doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00973.x
- Rodriguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI (2002a) Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *Journal of immunology* 168(7):3135-9
- Rodriguez-Sosa M, et al. (2006) Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cellular immunology* 242(2):61-71 doi:10.1016/j.cellimm.2006.09.006
- Rodriguez-Sosa M, Rosas LE, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI (2003) Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and immunity* 71(3):1247-54
- Rodriguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR, Terrazas LI (2004) A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and immunity* 72(8):4552-60 doi:10.1128/IAI.72.8.4552-4560.2004
- Rodriguez-Sosa M, et al. (2002b) 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):3656-64
- Rosas LE, Keiser T, Pyles R, Durbin J, Satoskar AR (2003) Development of protective immunity against cutaneous leishmaniasis is dependent on STAT1-mediated IFN signaling pathway. *European journal of immunology* 33(7):1799-805 doi:10.1002/eji.200323163
- Rosas LE, et al. (2006) Cutting edge: STAT1 and T-bet play distinct roles in determining outcome of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *Journal of immunology* 177(1):22-5
- Saiwai H, et al. (2013) Ly6C⁺ Ly6G⁻ Myeloid-derived suppressor cells play a critical role in the resolution of acute inflammation and the subsequent tissue repair process after spinal cord injury. *Journal of neurochemistry* 125(1):74-88 doi:10.1111/jnc.12135
- Sciutto E, et al. (1991) Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology research* 77(3):243-6
- Scharton-Kersten TM, et al. (1996) In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *Journal of immunology* 157(9):4045-54
- Schindler C, Strehlow I (2000) Cytokines and STAT signaling. *Advances in pharmacology* 47:113-74
- Schindler CW (2002) Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *The Journal of clinical investigation* 109(9):1133-7 doi:10.1172/JCI15644
- Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology* 23:197-223 doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653

- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG (2008) Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. Annual review of immunology 26:421-52 doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
- Shea M, Maberley AL, Walters J, Freeman RS, Fallis AM (1973) Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology 77(6):OP778-83
- Shi C, Pamer EG (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nature reviews Immunology 11(11):762-74 doi:10.1038/nri3070
- Shuai K (2000) Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. Oncogene 19(21):2638-44 doi:10.1038/sj.onc.1203522
- Shuai K, Liu B (2003) Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. Nature reviews Immunology 3(11):900-11 doi:10.1038/nri1226
- Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S (2007) Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. Journal of immunology 179(2):977-83
- Song MM, Shuai K (1998) The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. The Journal of biological chemistry 273(52):35056-62
- Sroga JM, Jones TB, Kigerl KA, McGaughey VM, Popovich PG (2003) Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. The Journal of comparative neurology 462(2):223-40 doi:10.1002/cne.10736
- Staab J, Herrmann-Lingen C, Meyer T (2013) CDK8 as the STAT1 serine 727 kinase? Jak-Stat 2(3):e24275 doi:10.4161/jkst.24275
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. The Journal of experimental medicine 176(1):287-92
- Stoiber D, Kovarik P, Cohny S, Johnston JA, Steinlein P, Decker T (1999) Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. Journal of immunology 163(5):2640-7
- Taylor MD, et al. (2009) Early recruitment of natural CD4+ Foxp3+ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection. European journal of immunology 39(1):192-206 doi:10.1002/eji.200838727
- Terrazas CA, Alcantara-Hernandez M, Bonifaz L, Terrazas LI, Satoskar AR (2013) Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 27(11):4547-60 doi:10.1096/fj.13-228932
- Terrazas CA, Gomez-Garcia L, Terrazas LI (2010a) Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. International journal for parasitology 40(9):1051-62 doi:10.1016/j.ijpara.2010.02.016
- Terrazas CA, et al. (2011) Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. International journal of biological sciences 7(9):1391-400
- Terrazas CA, Terrazas LI, Gomez-Garcia L (2010b) Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. Journal of biomedicine & biotechnology 2010:357106 doi:10.1155/2010/357106

- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C (1998) Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of parasitology* 84(1):74-81
- Terrazas LI, Bojalil R, Rodriguez-Sosa M, Govezensky T, Larralde C (1999) *Taenia crassiceps* cysticercosis: a role for prostaglandin E2 in susceptibility. *Parasitology research* 85(12):1025-31
- Terrazas LI, Montero D, Terrazas CA, Reyes JL, Rodriguez-Sosa M (2005) Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *International journal for parasitology* 35(13):1349-58 doi:10.1016/j.ijpara.2005.06.003
- Tsui FW, Martin A, Wang J, Tsui HW (2006) Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1. *Immunologic research* 35(1-2):127-36 doi:10.1385/IR:35:1:127
- Urban JF, Jr., et al. (1998) IL-13, IL-4 α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8(2):255-64
- Varinou L, et al. (2003) Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN- γ -dependent innate immunity. *Immunity* 19(6):793-802
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24(2):179-89 doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001
- Vila-del Sol V, Diaz-Munoz MD, Fresno M (2007) Requirement of tumor necrosis factor α and nuclear factor- κ B in the induction by IFN- γ of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Journal of leukocyte biology* 81(1):272-83 doi:10.1189/jlb.0905529
- Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE, Jr. (1996) DNA binding of in vitro activated Stat1 α , Stat1 β and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *The EMBO journal* 15(20):5616-26
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82(2):241-50
- Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zurcher G, Ziemiecki A (1991) Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Molecular and cellular biology* 11(4):2057-65
- Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA (2007) Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and cell biology* 85(2):148-54 doi:10.1038/sj.icb.7100014
- Wu C, Sun M, Liu L, Zhou GW (2003) The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer. *Gene* 306:1-12
- Yamamoto K, et al. (1994) Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Molecular and cellular biology* 14(7):4342-9
- Yeh TC, Dondi E, Uze G, Pellegrini S (2000) A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon- α signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16):8991-6 doi:10.1073/pnas.160130297
- You M, Yu DH, Feng GS (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Molecular and cellular biology* 19(3):2416-24
- Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI (2008) Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* 181(8):5791-802
- Young MR, Newby M, Wepsic HT (1987) Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research* 47(1):100-5

- Yu WM, Wang S, Keegan AD, Williams MS, Qu CK (2005) Abnormal Th1 cell differentiation and IFN-gamma production in T lymphocytes from motheaten viable mice mutant for Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1. *Journal of immunology* 174(2):1013-9
- Zhang X, Wrzeszczynska MH, Horvath CM, Darnell JE, Jr. (1999) Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 19(10):7138-46
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264(5155):95-8
- Zhu B, et al. (2007) CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 179(8):5228-37
- Zhu M, John S, Berg M, Leonard WJ (1999) Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. *Cell* 96(1):121-30
- Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K, Dalpke AH (2006) Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *Journal of immunology* 176(3):1840-7