



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

PARTICIPACIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE
MACRÓFAGOS (MIF) EN LA MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
CONVENCIONALES DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA CON *Toxoplasma*
GONDII

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN DE DIOS RUIZ ROSADO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA (FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA)

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA EUGENIA TÓRRES MÁRQUEZ (DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA)

DR. RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURÁN (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO, 2016.



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.

DEDICATORIA

A DIOS

Por que ha sido mi sustento, mi salvación, mi fuerza y mi guía a lo largo de mi vida. Por que me ha provisto de todo lo que necesito para ser feliz, incluyendo a la gente que mas quiero. Por que me ha brindado el privilegio de conocer a su hijo Jesús. Gracias por tu infinito amor, misericordia y sabiduría.

“ Si permanecen fieles a mis enseñanzas, serán realmente mis discípulos. Entonces conocerán la verdad y la verdad los hará libres” (Juan 8:31-32).

A MIS PADRES

Rosalía Rosado García y Alfredo Ruiz Martínez. Porque nos han puesto a mis hermanas y a mi siempre en primer lugar. No les quepa la menor duda de que son unos padres ejemplares y que espero contar algún día con todas las virtudes que los dos poseen. Este logro es suyo también. Les deseo siempre lo mejor y lo mejor es la nueva vida que ahora llevan en Cristo, los amo.

A MIS HERMANAS

Azucena y Jazmín. Por su cariño, amistad, apoyo y todo lo que hemos pasado juntos que nos ha hecho crecer como personas y ser cada vez mas unidos. Las quiero mucho y también quiero lo mejor para ustedes. Pueden confiar y contar conmigo en todo momento.

A TODA MI FAMILIA

Por su apoyo incondicional, consejos, enseñanzas, palabras de aliento e inolvidables recuerdos juntos. No habría llegado aquí sin ustedes, los quiero mucho y los llevo presente a donde vaya, que dios los bendiga siempre.

TO PHIL AND ELLEN

Because you are part of my family. I thank God for putting you in my life and bless me with such a good people. I have learned a lot from you and enjoyed many moments together. I hope that this friendship will be eternal. You are a lovely couple and a good example of true Christians. Love you and hope to see you more often after I graduate, God bless you and your kids.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser una parte fundamental en mi formación académica, en especial al Posgrado en Ciencias Biomédicas por darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todo el apoyo económico brindado para mis estudios de posgrado.

A la doctora Miriam Rodríguez Sosa mi especial admiración, agradecimiento y cariño por su enorme dedicación, paciencia y apoyo durante mis estudios de licenciatura y de posgrado. Nunca perdió la confianza en mi y siempre me impulso a lograr mis metas. Ha sido un honor y una experiencia muy valiosa para mi ser su estudiante. Muchas gracias.

A la Dra. María Eugenia y al Dr. Rafael por sus acertadas observaciones, consejos y enseñanzas en el desarrollo de este proyecto de doctorado, mi sincero respeto y admiración.

Al Dr. Luis Ignacio por todo su apoyo a lo largo de mis estudios de licenciatura y de doctorado.

Al Dr. Santiago por el espacio y la valiosa oportunidad que me ha brindado en su laboratorio para concluir los estudios de doctorado y alentarme a continuar con mi carrera científica.

A Frank y Giovanna: Ustedes han sido como mis hermanos durante estos años en Columbus, los quiero mucho y cuenten conmigo para lo que sea, les deseo el mejor de los éxitos.

A Monserrat Guadalupe, por tu cariño sincero y apoyo durante mis estudios doctorado, siempre querré lo mejor para ti y podrás contar conmigo cuando me necesites. Te deseo mucho éxito y bendiciones para ti y toda tu familia.

A mis amigos: Víctor, Kenia, Adrián, Claudia, Karina, Carmen, Yuriko, Yahir, Salomón, Orestes, Jorge, Efraín, Diana, Bere, Blanca; por los momentos compartidos en la carrera y el posgrado, Les deseo éxito en todo lo que se propongan hoy y más adelante, espero que aún cuando tomemos caminos diferentes, siempre estemos en contacto.

To my friends in Columbus; Li Chao, Grace, Gianni, Samantha, Tiziano, Alyssa, Martha, Larissa, Jorge, Silvia, Dany, Cata, Camila, Hanna, Anhirud, Shireen, Nikhil, Maggie, Ken, Kaivon, Rachel and James.

A mis amigos de Oaxaca Andy, Alan, Pepe, Mada, Alhelí y María que a pesar de la distancia siempre se acuerdan de mí y me quieren como a un hermano y yo siento lo mismo por ellos, se que nunca los perderé de vista, ni ustedes a mí, me da gusto verlos crecer y estar ahí para apoyarlos en lo que sea, los quiero mucho.

To Gene and Nancy for your outstanding hospitality in Washington and sincere love and Friendship, God bless you and your family.

A todos mis compañeros del laboratorio con los que he aprendido y pasado muchas tardes de experimentos largos y congresos.

Al personal del área administrativa del posgrado, especialmente a Sara, Zenaida y Gina por todo su apoyo, paciencia y comprensión durante mis estudios de doctorado, literalmente no lo habría logrado sin ustedes.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 5, "Inmunidad Innata", de la Unidad de Biomedicina (UBIMED). Y fue parcialmente financiado por: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos Académicos (DGAPA), No. de proyecto IN212215, y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); # de proyecto 152224.

El sustentante: Juan de Dios Ruiz Rosado fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), # de becario 290126.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	6
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Toxoplasmosis	13
1.2. Patogenia	14
1.3. Diagnóstico.....	15
1.4. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>.....	15
1.4.1. Taquizoito	15
1.4.2. Bradizoitos.....	16
1.4.3. Esporozoitos	17
1.5. Ciclo de vida sexual y asexual de <i>Toxoplasma gondii</i>.....	20
1.6. Estructura poblacional de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
1.7. Respuesta inmune hacia <i>Toxoplasma gondii</i>	22
1.8. Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)	23
1.9. Participación de MIF en la respuesta inmune hacia <i>T. gondii</i>.....	24
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. General.....	28
3.2. Particulares.....	28
4. HIPÓTESIS	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Lineamientos éticos	30
5.2. Ratones	30
5.3. Determinación del genotipo de los ratones silvestres (WT) y deficientes de MIF (<i>Mif</i>^{-/-})	30
5.3.1. Extracción del ADN genómico	31
5.3.2. Amplificación de gen	31
5.3.3. Electroforesis.....	32
5.4. Parásitos e infección experimental.....	33
5.5. Análisis del progreso de la infección	34
5.6. Preparación del Antígeno Soluble de <i>Toxoplasma gondii</i> (STAg).....	35
5.7. Diferenciación de CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea, y las condiciones de estímulo.....	35
5.8. Transferencia adoptiva de monocitos de médula ósea.....	36
5.9. Obtención de células de la cavidad peritoneal (PECS)	38
5.10. Análisis de citometría de flujo.....	39
5.11. Evaluación de la vía de señalización de la MAPK p38 por el método fosfo-flow	41
5.12. Western blot.....	42
5.13. Determinación de los niveles de citocinas.....	43

5.14. Análisis estadístico	44
6. RESULTADOS.....	45
6.1. La infección aguda con <i>T. gondii</i> induce el incremento de las citocinas inflamatorias en suero	45
6.2. MIF promueve la maduración de CDs CD11b ⁺ durante la infección aguda con <i>T. gondii</i>	46
6.3. Las CDs CD11b ⁺ expresan en mayor intensidad los receptores de MIF comparado con CDs CD8 α ⁺	51
6.4. MIF promueve el reclutamiento de linfocitos NK productores de IFN- γ durante la infección aguda con <i>T. gondii</i>	52
6.5. MIF induce TipCDs en la infección aguda con <i>T. gondii</i>	56
6.6. MIF promueve la activación clásica (M1) y diferenciación de los Mos Ly6C ^{high} hacia TipCDs	59
6.7. La administración de rMIF restablece la resistencia de los ratones <i>Mif</i> ^{-/-} infectados con <i>T. gondii</i>	66
7. DISCUSIÓN.....	68
8. CONCLUSIONES	76
9. Anexo 1 - Resultados complementarios no publicados.....	78
9.1. Determinación de la vía de activación inducida por MIF, para la maduración de CDs CD11b ⁺ derivadas de médula ósea	78
10. APÉNDICES	85
10.1. Apéndice 1.....	85
10.2. Apéndice 2.....	85
10.3. Apéndice 3.....	86
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	86

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Fig.- 1 Seroprevalencia global del parásito <i>T. gondii</i>	14
Fig.- 2 Fotografía de microscopio electrónico de un taquizoito de <i>T. gondii</i> .	16
Fig.- 3 Fotografía de microscopio electrónico de bradizoitos de <i>T. gondii</i>	17
Fig.- 4 Fotografía de microscopio electrónico de ooquistes de <i>T. gondii</i>	18
Fig.- 5 Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	18
Fig.- 6 Ciclo de vida sexual y asexual de <i>T. gondii</i>	21
Fig.- 7 Genotipificación de ratones WT y <i>MIF</i> ^{-/-}	33
Fig.- 8 Transferencia adoptiva de monocitos de médula ósea.....	38
Fig.- 9 Niveles de citocinas inflamatorias en suero	46
Fig.- 10 Análisis de la producción de IL-12 en CDs CD8 α ⁺ y CD11b ⁺	48
Fig.- 11 Expresión de CD86 y CD40 en CDs CD8 α ⁺ y CD11b ⁺	49
Fig.- 12 Análisis de la maduración de CDs CD8 α ⁺ y CD11b ⁺ en bazo.....	50
Fig.- 13 Expresión de los receptores de MIF en CDs CD8 α ⁺ y CD11b ⁺	52
Fig.- 14 Análisis de la producción de IFN- γ intracelular en linfocitos NK.....	55
Fig.- 15 Análisis de TipCDs en la infección aguda con <i>T. gondii</i>	58
Fig.- 16 Carga parasitaria en el sitio de infección de ratones WT y <i>MIF</i> ^{-/-}	59
Fig.- 17 Cinética de las poblaciones de Mos y M Φ s.....	62
Fig.- 18 Evaluación de la activación clásica de Mos Ly6C ^{high} y Ly6C ^{low}	63
Fig.- 19 Análisis de la conversión de Mos Ly6C ^{high} hacia TipCDs.....	64
Fig.- 20 Expresión de los receptores de MIF en Mos y M Φ s.....	65
Fig.-21 Efecto de la administración de rMIF en la toxoplasmosis experimental.....	67

Fig.- 22 Expresión de CD86 en CDs CD11b⁺ estimuladas *in vitro*.....81

Fig.- 23 Determinación de la producción de IL-12 y fosforilación de la MAPK p38 en CDs CD11b⁺ estimuladas *in vitro*.....83

Fig.- 24 Evaluación de la fosforilación de la MAPK p38 en CDs CD11b⁺ por la técnica de western blot.....84

ABREVIATURAS

(CDs) Células dendríticas

(CPA) Células presentadoras de antígeno

(iNOS) Sintasa inducible de óxido nítrico

(*i.p.*) intraperitoneal

(MΦ) Macrófagos

(Mo) Monocitos

(MIF) Factor inhibidor de la migración de macrófagos

(NK) Linfocito asesino natural, del inglés -Natural Killer-

(ON) Óxido nítrico

(PMN) Polimorfonucleares

(rMIF) MIF recombinante

(SFB) Suero fetal bovino

(TSAg) Antígeno soluble de *Toxoplasma gondii*

(*T. gondii*) *Toxoplasma gondii*

(TLR) Receptor de tipo toll

(*v.i.*) vía intravenosa

RESUMEN

El Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) favorece la inmunidad a la infección por *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), a través de inducir la producción de citocinas inflamatorias necesarias para el control de la replicación del parásito. Sin embargo, se conoce poco sobre el papel de esta molécula inflamatoria en la respuesta inmune celular hacia *T. gondii*. En este proyecto se utilizó un modelo murino de toxoplasmosis para determinar el papel de MIF en la maduración de células dendríticas convencionales durante la infección aguda con *T. gondii*. Ratones silvestres (WT) y deficientes de MIF (*Mif*^{-/-}) de fondo genético BALB/c, fueron infectados vía intraperitoneal con 100 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii*. Se evaluaron diariamente los niveles en suero de las citocinas MIF, IL-12p70, IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-10 durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* (1-7 días post infección). Se determinó el estado de maduración de células dendríticas convencionales CD11b⁺ y CD8 α ⁺ en el sitio de infección (cavidad peritoneal) y bazo de los ratones infectados (1-7 días post-infección). Adicionalmente, se evaluó el estado de activación de los monocitos inflamatorios Ly6C⁺ (principales precursores de CDs CD11b⁺) en el sitio de infección. Se determinó el efecto directo de MIF en la maduración de CDs CD11b⁺ en ensayos *in vitro*. Además, se analizó la producción de IFN- γ intracelular en células NKs de ratones infectados WT y *Mif*^{-/-}, un mecanismo esencial para la maduración de CDs, con el objetivo de evaluar vías alternas inducidas por MIF para la maduración de CDs convencionales durante la infección aguda con *T. gondii*. Finalmente, el papel protector de MIF en la toxoplasmosis aguda, fue corroborado evaluando el

porcentaje de supervivencia de ratones infectados *Mif*^{-/-} tratados diariamente con rMIF durante el curso de la infección (1-5 días post-infección). Nuestros datos indican que en la infección aguda con *T. gondii*, los niveles de MIF se incrementaron en suero de ratones infectados WT. Sin embargo, no se observaron niveles detectables de esta citocina en ratones infectados *Mif*^{-/-}. Adicionalmente, los ratones infectados *Mif*^{-/-} presentaron niveles reducidos de las citocinas IL-12p70, IFN- γ , IL-6 y TNF- α en suero comparado con ratones WT infectados.

Las CD^s CD11b⁺ de ratones infectados *Mif*^{-/-}, presentaron una deficiente maduración, caracterizada por la reducida producción de IL-12p70 y una menor expresión de la molécula co-estimuladora CD86 comparado con CD^s CD11b⁺ de ratones infectados WT. Los ensayos *in vitro* demostraron que MIF no induce directamente la maduración de CD^s CD11b⁺, lo que sugiere que MIF induce otras vías *in vivo* para la activación de CD^s CD11b⁺. Los ratones infectados *Mif*^{-/-}, presentaron un menor número de células NK productoras de IFN- γ en el sitio de infección comparado con ratones infectados WT, lo que sugiere que MIF promueve el reclutamiento temprano de linfocitos NK durante la infección aguda con *T. gondii*. Los ratones infectados *Mif*^{-/-} presentaron una mayor carga parasitaria y un menor número de CD^s CD11b⁺ productora de iNOS y TNF- α (TIP-CD^s) en el sitio de infección, comparado con ratones WT infectados, lo que indica un menor control de la infección en ausencia de MIF, debido a una deficiente actividad microbicida. La administración de rMIF en ratones infectados *Mif*^{-/-}, restauró los números de TIP-CD^s y revirtió el fenotipo susceptible de los ratones. Estas evidencias demuestran una participación importante de MIF en la respuesta

inmune celular hacia *T. gondii*, probablemente a través de inducir el reclutamiento temprano de linfocitos NK productores de IFN- γ , lo que a su vez promueve la maduración de CD11b⁺ y la resistencia a la infección por *T. gondii*.

ABSTRACT

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) mediates immunity against *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infection by inducing inflammatory cytokines required to control parasite replication. However, the role of this inflammatory molecule in the cell-mediated immune response against *T. gondii* is poorly understood. In this project, we used an *in vivo* model of murine toxoplasmosis to determine the role of MIF in the maturation of conventional dendritic cells (DCs) during acute *T. gondii* infection. BALB/c wild type (WT) and MIF deficient (*Mif*^{-/-}) mice were infected intraperitoneally with 100 cysts of *T. gondii* ME49 strain. Serum levels of the cytokines MIF, IL-12p70, IFN- γ , IL-6, TNF- α and IL-10, were evaluated during the acute phase of infection (1-7 days post-infection). The maturation state of conventional CD11b⁺ and CD8 α ⁺ dendritic cells in the site of infection (peritoneal cavity) and spleen was determined during the acute phase of *T. gondii* infection. In addition, we evaluated the activation of inflammatory Ly6C⁺ monocytes (main precursors of CD11b⁺ DCs) in the site of infection. The role of MIF directly inducing maturation of bone marrow-derived CD11b⁺ DCs, was tested *in vitro*. To determine alternative pathways of MIF in promoting DCs maturation, we analyzed intracellular IFN- γ production in NK cells from infected WT and *Mif*^{-/-} mice, an essential mechanism for DCs maturation during acute *T. gondii* infection. Finally, the

protective role of MIF during experimental acute toxoplasmosis was corroborated after evaluating the survival rate of *T. gondii*-infected *Mif*^{-/-} mice treated with rMIF during the acute phase of infection (1-5 days post-infection). Our data indicate that MIF levels increased in serum from acutely *T. gondii*-infected WT mice. However, infected *Mif*^{-/-} mice displayed non-detectable levels of MIF and reduced IL-12p70, IFN- γ , IL-6 y TNF- α levels in serum compared to infected WT mice. Moreover, CD11b⁺ DCs but not CD8 α ⁺ DCs from infected *Mif*^{-/-} mice showed impaired maturation, characterized by deficient IL-12p70 production and reduced expression of the co-stimulatory molecule CD86 compared to WT CD11b⁺ DCs. Interestingly, *in vitro* assays demonstrated that MIF has a limited role in inducing directly the maturation of CD11b⁺ DCs, which indicates that MIF must use an alternative pathway for inducing CD11b⁺ DC maturation. We found that *T. gondii*-infected *Mif*^{-/-} mice showed reduced numbers of IFN- γ -producing NK cells in the site of infection compared to WT mice, suggesting that MIF promotes CD11b⁺ DCs maturation by inducing the recruitment of IFN- γ -producing NK cells. Additionally, Infected *Mif*^{-/-} mice displayed higher parasitic burden in the site of infection and reduced numbers of TNF- α /iNOS-producing CD11b⁺ DCs (TipDCs), indicating an uncontrolled *T. gondii* infection due to deficient antimicrobial capacity in *Mif*^{-/-} mice. Administration of rMIF into *T. gondii*-infected *Mif*^{-/-} mice, restored the numbers of TipDCs and reversed the susceptible phenotype of *Mif*^{-/-} mice. Collectively, these results demonstrate an important role for MIF in the cellular immune response against *T. gondii*, by inducing the early recruitment of IFN- γ -producing NK cells, which in turn induces CD11b⁺ DCs maturation and resistance to *T. gondii* infection.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una enfermedad causada por el parásito intracelular obligado *T. gondii*. Este parásito fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux en especies de roedores *Ctenodactylus gondi* al norte de África. Desde entonces se ha demostrado que el patógeno es capaz de infectar una amplia variedad de especies de aves y animales de sangre caliente, incluyendo al hombre [1].

Aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con *T. gondii*, por lo que se le ha considerado como uno de los parásitos más exitosos que infectan al ser humano. La incidencia de toxoplasmosis puede variar considerablemente a nivel mundial. Existen áreas de alta prevalencia, en América Latina, parte del Este/Centro de Europa, Medio Oriente y Sur Este de Asia y África como se muestra en la Figura 1 [2].

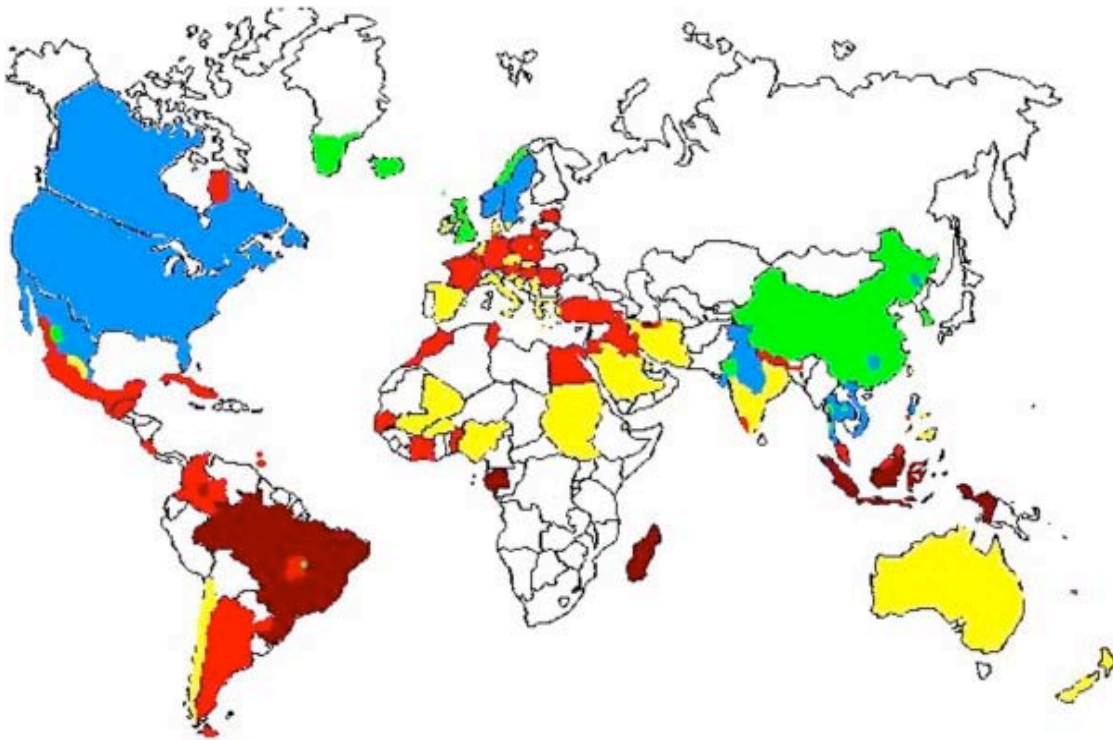


Fig. 1 Seroprevalencia del parásito *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Los colores representan la positividad en suero a *T. gondii*: Rojo oscuro es >60%, rojo es 40-60%, amarillo 20-40%, azul 10%-20% y verde <10%. Blanco es igual a ausencia de datos. Tomado de Pappas G. *et al.* [2].

1.2. Patogenia

La infección por *T. gondii* es normalmente asintomática en individuos inmunocompetentes, por tal motivo la enfermedad clínica está comúnmente limitada a individuos inmunocomprometidos o a los casos de toxoplasmosis congénita [3].

La toxoplasmosis congénita es el resultado de una primera infección con *T. gondii* durante el embarazo, causada por una migración transplacentaria de taquizoitos del parásito al feto. El riesgo de infección congénita es menor en el primer trimestre de embarazo (10-15%) y mayor en el tercer trimestre (60-90%). Sin embargo la infección en el primer trimestre es más severa debido a un alto riesgo de desarrollar abortos espontáneos o desórdenes neurológicos (ceguera o retraso mental) [4].

En pacientes inmuno-comprometidos *T. gondii* causa comúnmente lesiones unifocales o multifocales intracerebrales que resultan en una encefalitis toxoplásmica, potencialmente fatal en caso de no llevar un tratamiento adecuado. Los fármacos empleados actualmente (sulfadiazina y primetamina) eliminan eficientemente la fase de taquizoito del parásito. Sin embargo, estos no remueven la fase crónica de la infección (bradizoitos), por lo que un tratamiento a largo plazo es requerido. El efecto tóxico de éstas drogas combinado con su efecto limitado para eliminar la infección, exhibe la necesidad de tratamientos más seguros y efectivos para tratar la toxoplasmosis [5].

1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por *T. gondii* se realiza principalmente con pruebas serológicas que identifican anticuerpos IgM (infección aguda), IgA e IgG (infección crónica) específicos para *T. gondii*. Adicionalmente, esta prueba puede ser confirmada con otros estudios en el laboratorio como ensayos de PCR para detectar la presencia del parásito [5].

1.4. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

Existen 3 estadios infecciosos en el ciclo de vida del parásito Apicomplexa *T. gondii*: taquizoitos (en grupos o clones), los bradizoitos (en quistes tisulares), y esporozoitos (en ooquistes).

1.4.1. Taquizoito

Es un estadio infeccioso asociado a la fase aguda de la infección, se desplaza por deslizamiento y penetra las células del huésped de manera activa o por fagocitosis, se multiplica rápidamente en cualquier célula nucleada de los

huéspedes intermediarios y en células no pertenecientes al epitelio intestinal del huésped definitivo. El taquizoito normalmente tiene una forma de luna creciente y mide de 2-6 μm . Los taquizoitos se multiplican asexualmente por endodiogenia, una forma especializada de reproducción en la cual dos parásitos se forman dentro del parásito progenitor. La velocidad de crecimiento, virulencia e invasividad dependen de la cepa de *T. gondii* y el tipo de célula reservorio [6] [5, 7, 8].

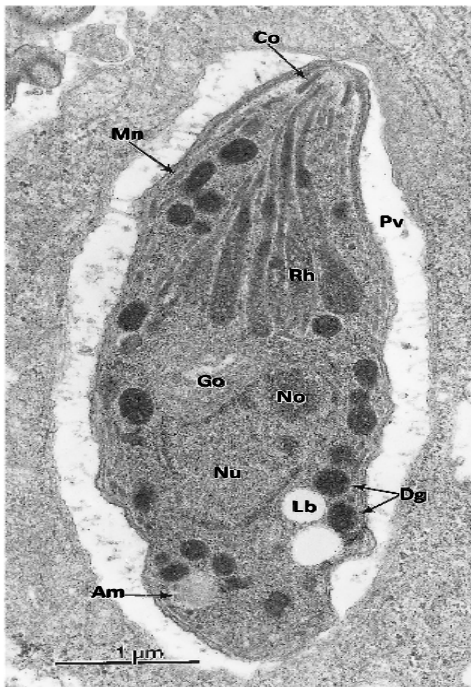


Fig. 2 Fotografía de microscopio electrónico de un taquizoito de la cepa VEG de *T. gondii*, tomado de Dubey J. P. *et al*, [8] Co, conoide; Mn, micronemo, Pv, vacuola parasitófora; Go, Golgi; Mn, micronemo; Nu, núcleo; Dg, gránulo denso; Rh, roptrias; Am, gránulo de amylopectina.

1.4.2. Bradizoitos

Es una fase infecciosa de replicación lenta en quistes tisulares, asociada a la infección crónica del parásito. Los bradizoitos son estructuralmente muy similares a los taquizoitos y difieren principalmente en la posición del núcleo, el cual se ubica normalmente en el centro en el caso de los taquizoitos y en el término posterior en los bradizoitos.

Los quistes tisulares se alojan principalmente en el sistema nervioso central y músculo esquelético donde pueden permanecer de por vida en el huésped definitivo o intermedio. Los quistes tisulares pueden llegar a medir de 5 μm a 100 μm y contener desde cientos a miles de bradizoitos que se multiplican por endodiogenia [5-8].

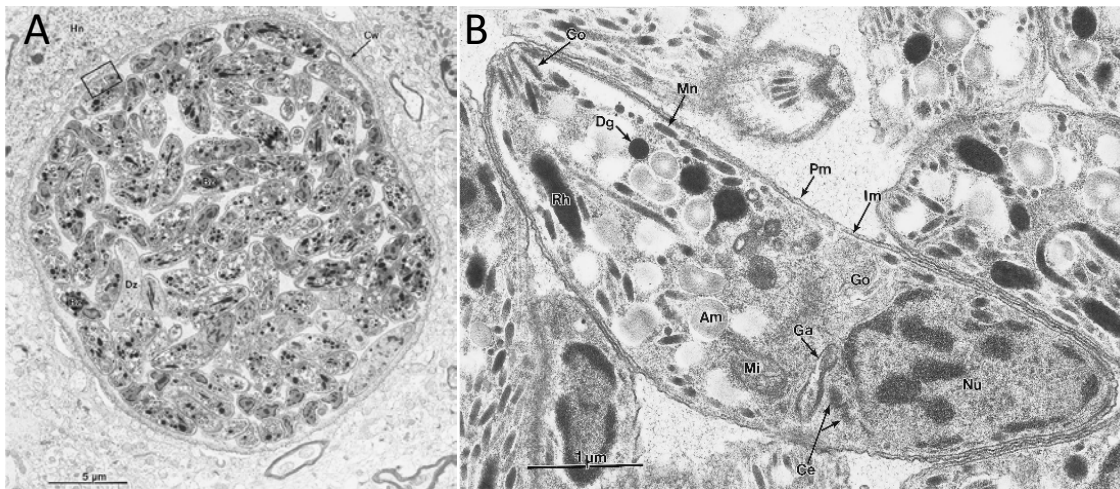


Fig. 3 Fotografía de microscopio electrónico de A) un quiste tisular en cerebro de ratón con 8 semanas de infección con la cepa VEG de *T. gondii*, con aproximadamente 110 bradizoitos. B) Bradizoito de la cepa VEG de *T. gondii*, Co, conoide; Mn, micronemo; Go, Golgi; Mn, micronemo; Nu, núcleo; Dg, gránulo denso; Rh, roptrias; Am, gránulo de amilopectina; Mi, mitocondria, Pm, plasmalema; Ce, centriolos; Im, membrana interior. Tomado de Dubey J. P. *et al* [8].

1.4.3. Esporozoitos

Se encuentran en ooquistes excretados por el huésped definitivo. Los ooquistes pasan por un proceso de esporulación con duración de 1 a 5 días, en el que se forman dos esporoquistes conteniendo cuatro esporozoitos cada uno [5-8].

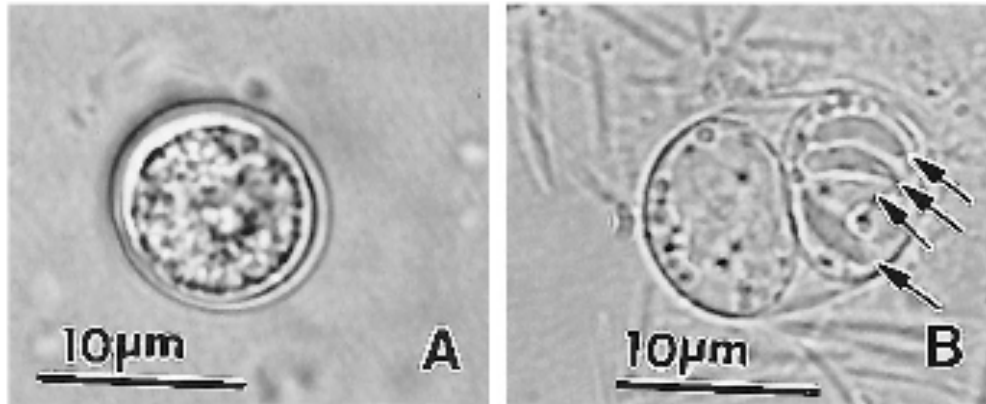


Fig. 4 Fotografía de microscopio electrónico de A) un ooquiste no esporulado y B) un ooquiste esporulado con dos esporoquistes. Cuatro esporozoitos son visibles en el esporoquiste derecho. Tomado de Dubey J. P. *et al* [8].

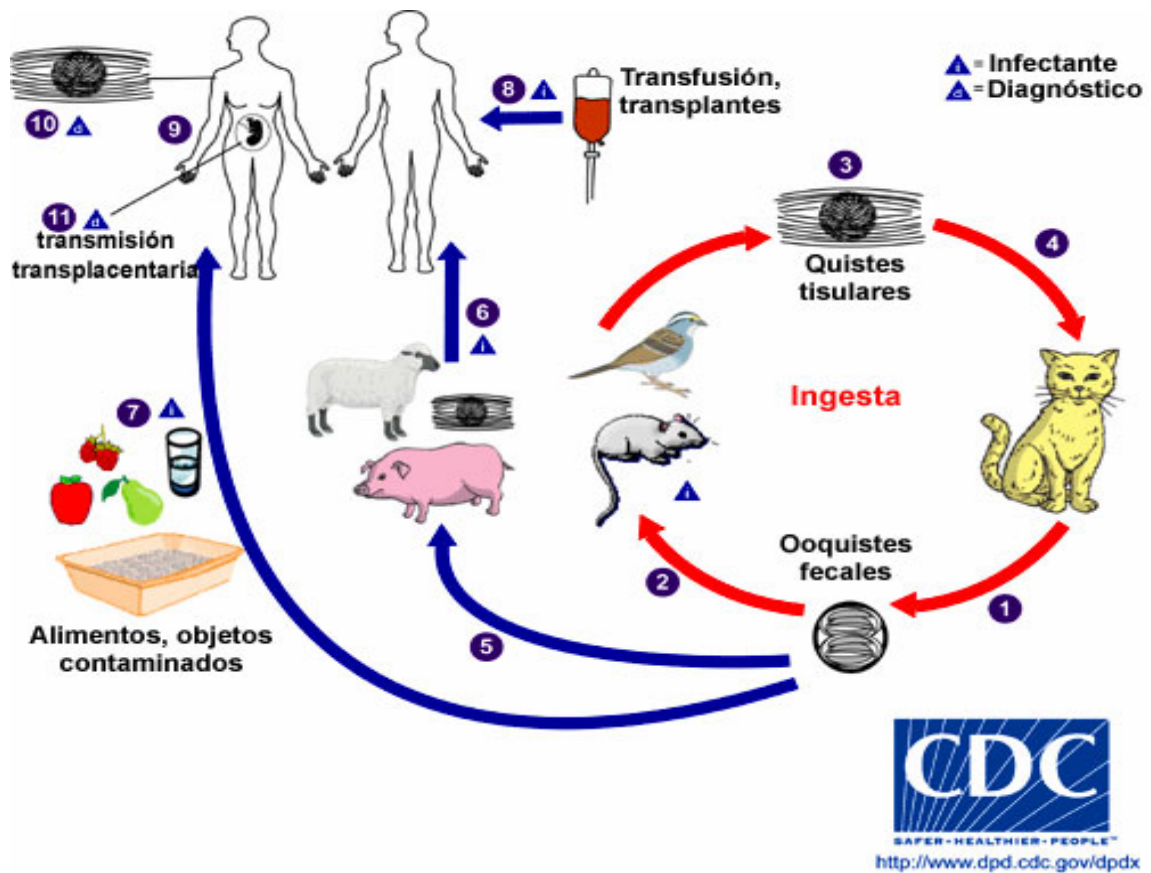


Fig. 5 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Tomado de <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>.

El ciclo de vida de *T. gondii* (Figura 5) comienza cuando el gato excreta en sus heces millones de ooquistes no esporulados, después de infectarse con cualquiera de los estadios infecciosos del parásito: taquizoitos, bradizoitos y esporozoitos¹. Aunque el gato solo defeca ooquistes durante 1-2 semanas después de ser infectado, un gran número de estos son liberados en las heces. Los ooquistes esporulan de 1-5 días en el medio ambiente y se vuelven infectivos. Los huéspedes intermediarios como aves y roedores se infectan después de ingerir tierra, agua o vegetales contaminados con ooquistes². Los ooquistes se transforman en taquizoitos después de ser ingeridos. Estos taquizoitos se alojan en los tejidos nervioso y muscular y se desarrollan hacia quistes tisulares de bradizoitos³. Los gatos se infectan después de consumir huéspedes intermediarios que alojan quistes tisulares⁴. Los animales criados para el consumo humano pueden llegar a infectarse con quistes esporulados en el medio ambiente⁵. El ser humano puede llegar a infectarse por las siguientes rutas:

- Al consumir carne mal cocida de animales infectados con quistes tisulares⁶.
- Al consumir alimentos o agua contaminada con ooquistes⁷.
- Transfusión de sangre o trasplante de órganos⁸.
- De manera transplacentaria de la madre al feto⁹.

En seres humanos infectados, los parásitos forman quistes tisulares principalmente en musculo esquelético, miocardio, cerebro y ojos, donde pueden permanecer de por vida. El diagnóstico de la infección se lleva a cabo por pruebas

serológicas, aunque los quistes tisulares también pueden ser vistos en biopsias¹⁰. El diagnóstico de infecciones congénitas se puede llevar a cabo detectando DNA de *T. gondii* en fluido amniótico utilizando métodos moleculares como PCR¹¹ [5, 7, 9].

1.5. Ciclo de vida sexual y asexual de *Toxoplasma gondii*

El ciclo de vida sexual de *T. gondii* (Fig. 3, parte superior) se limita al intestino de los miembros de la familia *Felidae*, e inicia cuando éstos ingieren ooquistes o carne infectada con quistes tisulares que contienen bradizoitos de *T. gondii*. Los quistes tisulares se rompen al pasar por el tracto digestivo y liberan bradizoitos que se pueden diferenciar en los estadios sexuales de *T. gondii* (macrogametos y microgametos), lo que resulta en la formación y posterior excreción de ooquistes en las heces del felino. Los ooquistes excretados pasan por un proceso de esporulación y se vuelven altamente infectivos y capaces de sobrevivir desde meses hasta años en el medio ambiente.

El ciclo asexual de *T. gondii* (Fig. 3, parte inferior) comienza cuando huéspedes intermedios ingieren ooquistes infecciosos. Los esporozoitos que son liberados del ooquiste infectan el epitelio intestinal y se diferencian a taquizoitos, una fase infectiva que se disemina rápidamente en el organismo (principalmente músculo y sistema nervioso), para diferenciarse posteriormente en bradizoitos que dan origen a los quistes tisulares. Cuando los quistes tisulares son ingeridos por hospederos definitivos o intermedios, se completan el ciclo sexual o asexual, respetivamente, del parásito [10].

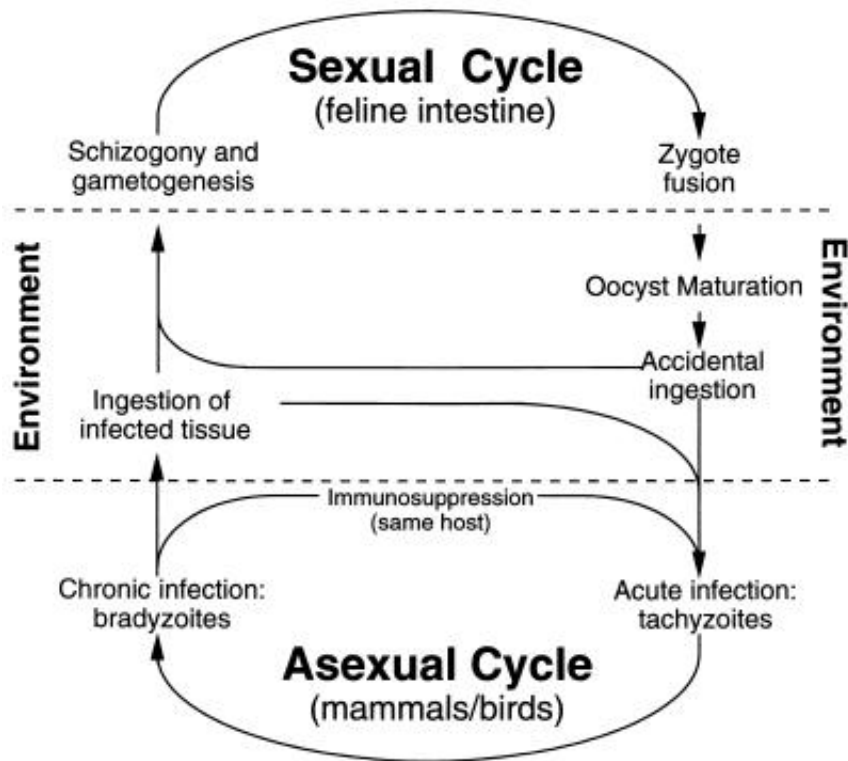


Fig. 6 Ciclo de vida sexual y asexual de *T. gondii*, tomado de Michael W. Black *et al.* [10].

1.6. Estructura poblacional de *Toxoplasma gondii*

La estructura poblacional de *T. gondii*, es el resultado de su habilidad para propagarse vía sexual y asexual. La presencia de una fase sexual en el ciclo de vida de este parásito sugirió en un principio una alta diversidad genética entre las cepas de *T. gondii*, sin embargo, la estructura poblacional de *T. gondii* es principalmente clonal, probablemente debido a su reproducción asexual que permite su propagación directa de un huésped intermedio a otro [5].

Existen 3 tres líneas clonales dominantes de *T. gondii* en Norte América y Europa: tipo I, tipo II y tipo III. Las clonas de tipo I son virulentas y las de tipo II y III son avirulentas. La cepas de tipo I causan una infección letal en ratones de laboratorio

en dosis letal media (LD) de un parásito ((LD₁₀₀)=1), mientras que los tipos II y III presentan una dosis letal media de ((LD₅₀) de $\geq 10^5$). Además, las cepas de tipo I se replican rápidamente y presentan una mayor habilidad de migración comparado con cepas de tipo II y III.

En Norteamérica y Europa, la mayoría de las infecciones en pacientes con SIDA y toxoplasmosis congénita son causadas por cepas de tipo II, mientras que en Sudamérica las cepas de tipo I son las más prevalentes [11, 12].

1.7. Respuesta inmune hacia *Toxoplasma gondii*

La infección con *T. gondii* ha sido un modelo muy importante para entender como el sistema inmune murino promueve la resistencia a enfermedades infecciosas causadas por parásitos intracelulares [13]. Diversos estudios han demostrado que la inmunidad a la infección por *T. gondii* inicia con la inducción de niveles sistémicos de la citocina pro-inflamatoria IL-12, producida por macrófagos (MΦs), células polimorfonucleares (PMNs) y células dendríticas (CDs). Esta citocina promueve a la producción de IFN- γ en linfocitos asesinos naturales (del inglés natural killer NK), colaboradores (T CD4⁺) y citotóxicos (T CD8⁺), lo que induce mecanismos microbicidas como la producción de óxido nítrico (ON) en células inmunes y la privación de triptófano en células no inmunes, un aminoácido esencial para la replicación de *T. gondii* [13, 14].

En la infección por *T. gondii* se han identificado diferentes poblaciones celulares capaces de producir IL-12. Las CDs convencionales, particularmente la subpoblación de CDs CD8 α^+ , son la fuente principal de IL-12 durante la infección

in vivo con el parásito o ante un estímulo con antígeno soluble de Toxoplasma (del inglés Toxoplasma Soluble Antigen –TSAg) [15, 16].

La producción de IL-12 por CD8 α^+ es dependiente del reconocimiento de diferentes antígenos de *T. gondii* como ciclofilina 18 y profilina, por receptores asociados a proteínas G (CCR5) y TLRs (11 y 12), respectivamente [17, 18]. El reconocimiento de antígenos de *T. gondii*, induce importantes vías de señalización a través de MyD88 y las MAPKs, para la producción de IL-12 por CD8 [13, 18, 19]. Por otra parte, estudios recientes han demostrado que CD8 α^+ derivadas de monocitos, presentan un papel crucial en la producción de IL-12 y la resistencia a la infección vía intraperitoneal (*i.p*) con *T. gondii* [20]. Lo que sugiere que diferentes poblaciones de CD8 contribuyen de manera importante en el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa hacia la infección por *T. gondii*.

1.8. Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)

La citocina inflamatoria MIF, fue descrita en 1966 como una molécula derivada de linfocitos T provenientes de un modelo *in vivo* de hipersensibilidad de tipo IV, capaz de inhibir la migración azarosa de los macrófagos *in vitro* [21]. Actualmente se sabe que MIF es una molécula de efecto pleiotrópico, ampliamente expresada, producida y secretada por células del sistema inmune como linfocitos, MΦs, CD8 y PMNs entre otras [21-24].

La secreción de MIF está regulada por señales de estrés e inflamación incluyendo: endotoxinas, citocinas inflamatorias (IFN- γ and TNF- α) y glucocorticoides [25-27]. Una vez liberado, MIF es capaz de inducir la producción de citocinas inflamatorias (TNF, IFN, IL-1 β , IL-12 e IL-6) [22, 27-34], contra-regular el efecto inmuno-

supresor de los glucocorticoides [35], promover la expresión del TLR4 [36], prolongar la vida media de células inmunes inhibiendo a la proteína p53 [29] e inducir la migración y el reclutamiento de células inmunes al promover la expresión de quimiocinas y receptores de quimiocinas como MCP-1, ICAM-I y VCAM [37-40]. Estas funciones han demostrado que MIF tienen un papel importante como potenciador de la respuesta inmune inflamatoria, por lo que se le ha estudiado en numerosas patologías y enfermedades autoinmunes como: glomerulonefritis [41, 42], artritis [43, 44], encefalomiелitis autoinmune [45], sepsis [46, 47], colitis [48, 49] entre otras. Adicionalmente, se ha demostrado que MIF participa en la resistencia a enfermedades parasitarias causadas por patógenos protozoarios como malaria, leishmaniosis, tripanosomosis, neosporosis y toxoplasmosis [50].

1.9. Participación de MIF en la respuesta inmune hacia *T. gondii*

Las enfermedades parasitarias son una causa importante de morbilidad y mortalidad en los seres humanos. Las respuestas inmune innata y adaptativa hacia las infecciones parasitarias son esenciales para determinar el control, eliminación o prevalencia de la infección. Los factores asociados a patógenos y elementos de la respuesta inmune del huésped son importantes moduladores de la respuesta inmune inflamatoria hacia la infección [50].

Desde el descubrimiento de MIF se ha presenciado un progreso lento en el conocimiento de los mecanismos inflamatorios inducidos por MIF que pudieran estar involucrados en la resistencia hacia infecciones parasitarias como malaria, leishmaniosis, tripanosomosis, neosporosis y toxoplasmosis. A pesar de los

importantes descubrimientos sobre la biología de los patógenos que causan estas enfermedades, los tratamientos preventivos y terapéuticos empleados actualmente no son lo suficientemente específicos o eficientes para la eliminación de la infección, por lo que se requiere de un mayor número de estudios sobre la respuesta inmune hacia estas enfermedades parasitarias [50].

Recientemente, estudios en nuestro laboratorio han demostrado que MIF tiene un papel crucial en la resistencia a la infección por *T. gondii*. Ratones *Mif*^{-/-} BALB/c, son altamente susceptibles a la infección vía oral o vía intraperitoneal (*i.p.*) con las cepas virulenta (RH) o avirulenta (ME49) de *T. gondii*, comparado con ratones WT BALB/c [51]. La susceptibilidad de los ratones *Mif*^{-/-} infectados, estuvo asociada a niveles disminuidos de citocinas inflamatorias (IL-12, IFN- γ , IL-1 β y TNF- α) en suero, un menor porcentaje de sobrevivencia y un mayor número de quistes en cerebro comparado con ratones infectados WT. Adicionalmente, células CD11c⁺ provenientes del bazo o ganglios mesentéricos de ratones *Mif*^{-/-} infectados, presentaron una deficiente maduración caracterizada por una menor producción de IL-12 intracelular y una reducida expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 y CD40), comparado con células CD11c⁺ de ratones WT [52]. Estas evidencias sugieren que MIF tiene un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune protectora hacia *T. gondii*, probablemente a través de inducir la maduración de CD11c⁺.

Por otra parte, estudios previos sobre la participación de MIF en la toxoplasmosis congénita, han demostrado que MIF tiene un papel importante en el control de la infección con *T. gondii* en placentas humanas infectadas *ex vivo* con la cepa

virulenta RH [53]. El papel protector de MIF estuvo asociado a un incremento en la activación y adhesión de monocitos THP-1 en placentas humanas, así como una mayor expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) en placentas infectadas [40, 54]. Estos estudios indican que MIF promueve la resistencia a la toxoplasmosis oportunista o congénita, probablemente a través de inducir la activación de las CDs y Mos en la infección aguda con el parásito.

2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades zoonóticas, enfermedades naturalmente transmisibles de animales vertebrados al ser humano (WHO), representan una amenaza importante a nivel mundial debido a que más del 60% de los patógenos emergentes que infectan al ser humano son zoonóticos e incluyen más de 200 diferentes especies de bacterias, virus y protozoos. En muchas regiones del mundo, principalmente en países en desarrollo, las medicinas y medidas de prevención para la propagación de estas enfermedades son limitadas [9].

La toxoplasmosis, una enfermedad zoonótica clásica, ha adquirido una significancia clínica importante desde los años 80s al ser identificada como una de las principales infecciones oportunistas en pacientes con SIDA [3, 5]. La reactivación de la infección latente con *T. gondii* en individuos inmunocomprometidos, ocasiona una encefalitis severa que es potencialmente fatal. Los fármacos empleados actualmente (sulfadiazina y primetamina) eliminan la fase aguda del parásito (taquizoito) mas no la fase crónica de la infección (bradizoitos),

lo que exhibe la necesidad de tratamientos más seguros y efectivos para tratar esta enfermedad [5].

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la citocina inflamatoria MIF, favorece la inmunidad hacia *T. gondii* promoviendo la producción de citocinas esenciales (IL-12 e IFN- γ) para el control de la infección aguda y crónica del parásito [51]. Además, células CD11c⁺ de ratones *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii*, presentaron una maduración deficiente caracterizada por una menor producción de IL-12 y una reducida expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86 y CD40) comparado con células CD11c⁺ de ratones WT [52]. Estos resultados sugieren que MIF regula la producción de citocinas inflamatorias y la resistencia al parásito, a través de inducir la maduración de CDs necesarias para el control de la infección. Sin embargo, el análisis de las CDs sólo con la identificación de la expresión de CD11c es bastante general; lo que limita determinar si todas las subpoblaciones de CDs se encuentran afectadas en ausencia de MIF, y no permite discriminar entre otras poblaciones celulares como M ϕ s y NKs que también pueden expresar la integrina CD11c [55, 56]. En éste proyecto de investigación, se determinó el papel de MIF en la maduración de las subpoblaciones de CDs CD8 α ⁺ y CD11b⁺ (subpoblaciones esenciales para la resistencia a la infección por *T. gondii*) durante la infección aguda con el parásito.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Determinar la participación de MIF en la maduración de las subpoblaciones de CDs convencionales CD11b⁺ y CD8α⁺, durante la infección aguda con *T. gondii*.

3.2. Particulares

1. Determinar en la infección aguda por *T. gondii* los niveles de MIF en suero de ratones WT y *Mif*^{-/-}.
2. Analizar la producción de IL-12p70 y la expresión de las moléculas coestimuladoras (CD86 y CD40) en las subpoblaciones de CDs CD11b⁺ y CD8α⁺, durante la infección aguda con *T. gondii*.
3. Determinar la expresión de los receptores de MIF (CD74, CXCR2 y CXCR4) en las subpoblaciones de CDs convencionales en la infección con *T. gondii*.
4. Determinar si MIF induce *in vitro* la maduración de CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea.
5. Determinar si MIF participa en la activación y diferenciación de monocitos inflamatorios hacia CDs CD11b⁺ en ratones *Mif*^{-/-} y WT infectados con *T. gondii*.
6. Determinar si la administración de MIF recombinante en ratones *Mif*^{-/-} reconstituye la resistencia a la infección por *T. gondii*.

4. HIPÓTESIS

MIF participa en la maduración de las subpoblaciones de células dendríticas convencionales CD11b⁺ a través de inducir la producción de IL-12, iNOS, TNF- α y la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86 durante la infección aguda por *T. gondii*. Además, MIF participa en la activación y diferenciación de los precursores de CDs CD11b⁺ (monocitos inflamatorios) durante la infección aguda con el parásito.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lineamientos éticos

Los experimentos en este proyecto fueron realizados de acuerdo con los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la regulación mexicana para el cuidado de animales (NOM-062-ZOO-1999, 2001) y el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) durante una estancia de investigación en en Research Institute, Nationwide Children's Hospital. En el curso de estos estudios se hizo el máximo esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

5.2. Ratones

Ratones adultos de 6-8 semanas de edad (BALB/c) fueron adquiridos de los laboratorios de Harlan (México o USA). Los ratones *Mif*^{-/-} fueron desarrollados como se describió anteriormente [33] y cruzados por más de diez generaciones en fondo genético BALB/c. Todos los animales fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos y las colonias fueron establecidas en el departamento de animales transgénicos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) o en el Research Institute at Nationwide Children's Hospital animal facility.

5.3. Determinación del genotipo de los ratones silvestres (WT) y deficientes de MIF (*Mif*^{-/-})

Con el objetivo de asegurarnos que los grupos de ratones experimentales cumplieran con la condición de silvestre (WT) y/o deficientes para el gen que MIF (*Mif*^{-/-}), los ratones fueron genotipificados por la técnica de PCR.

5.3.1. Extracción del ADN genómico

Para la obtención del DNA genómico se empleó el método previamente reportado por Laird, P.W. [57]. Brevemente, se utilizaron ratones machos entre 6-8 semanas de edad, guantes y material nuevo estéril, libre de DNAsas-RNAsas. Se obtuvo aproximadamente 0.5 cm de la parte final de la cola de cada uno de los ratones experimentales, el tejido fue colocado en tubos de 1.8 ml (Eppendorf), marcados previamente. Para llevar a cabo la digestión del tejido se agregó 500 µl de buffer de lisis (Apéndice 1) y 20 µl de proteinasa K (Invitrogen 100 µg/µl) dejando incubar toda la noche a 55 °C. Terminada la incubación, se centrifugaron los tubos a 11000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante con micropipeta para colocarlos en tubos Eppendorf con 500 µl de isopropanol frío (grado biología molecular, Sigma-Aldrich, México), éstos se invirtieron suavemente hasta hacer evidente la precipitación del DNA. Se centrifugaron nuevamente a 11000 rpm durante 5 segundos para precipitar el DNA, se decantó el sobrenadante para proceder a lavar el botón de DNA con etanol frío al 75 % (grado biología molecular, Sigma-Aldrich, México). En el mismo tubo se resuspendió la pastilla y se centrifugó nuevamente a 11000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue desechado, se dejó evaporar el etanol del tubo a temperatura ambiente (1 h). Posteriormente el botón fue resuspendido en 200 µl de H₂O grado miliQ (mQ, Sigma-Aldrich, México).

5.3.2. Amplificación de gen

Se utilizaron cebadores específicos (referidos en el Apéndice 2) para el reconocimiento del gen de MIF. Brevemente, se utilizaron tubos nuevos libres de

DNASas-RNASas de 0.2 ml, para llevar a cabo la reacción con un volumen final de 25 µl colocando los siguientes reactivos (Kit Red-Taq DNA polimerasa, Sigma-Aldrich, México) en el siguiente orden:

		Para MIF	Para NEO
Buffer	[10x]	2.5 µl	2.5 µl
Mg Cl ₂	[50 mM]	0.75 µl	0.75µl
dNTP's	[10 mM]	1.0 µl	0.5 µl
F	[15 pM]	1.0 µl	3.0 µl
R	[15 pM]	1.0 µl	3.0 µl
Red-Taq	[2.5 U/µl]	0.5 µl	0.5 µl
H ₂ O	(Sigma)	18 µl	14.5 µl
Muestra DNA	(100 ng)	1.0 µl	1.0 µl

Una vez listos los tubos se colocaron en el termociclador (Bioer) con la temperatura mencionada en el Apéndice 2.

5.3.3. Electroforesis

Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) al 1% en buffer TBE 1x (Apéndice 3) y 0.1% de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, México) sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos, que se mantuvo a 4 °C por 15 min para que se solidificara.

A cada uno de los tubos se les agregó 5 µl de buffer de carga blue Juice con Sybr-Green (Invitrogen), una vez mezclados se tomaron 8 µl de la muestra y se colocaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primero para colocar 3 µl del marcador de tamaño molecular 100 pb (Invitrogen). Las muestras fueron colocadas en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 90 volts, 200 mA durante 40 min. Se capturó la imagen con el equipo Fla 5000 Fujifilm.

La Figura 7 muestra una electroforesis en gel de agarosa del amplificado del gen funcional de MIF de ratones WT, con un tamaño de 200 pb, en los carriles 1-4, del grupo utilizado como control positivo, y el gen de neomicina (NEO), gen de inserción de los ratones *Mif*^{-/-}, con un peso de 500 pb, en los carriles 5-8. La secuencia de los cebadores utilizados se muestra en el Apéndice 2.

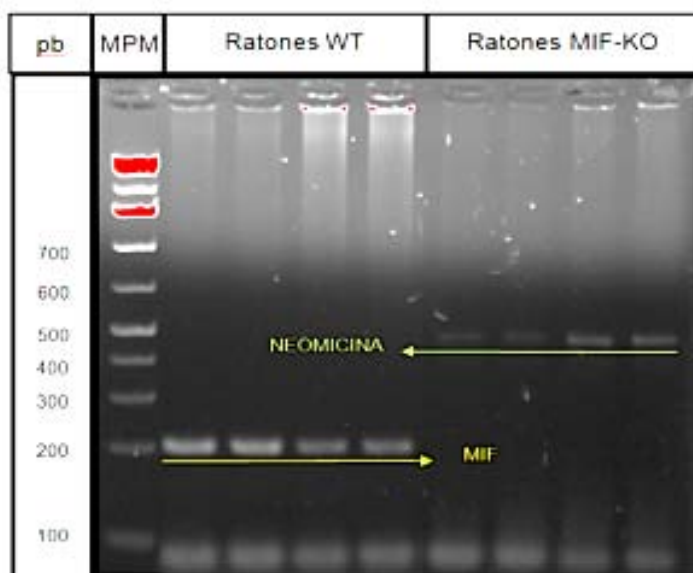


Fig.- 7. Gel representativo de una electroforesis del producto de PCR para el gen de MIF (carriles 1-4) y Neomicina (carriles 5-8). MTM= marcador de tamaño molecular; pb= pares de bases.

5.4. Parásitos e infección experimental

El estudio de la infección *in vivo* se llevó acabo inoculando vía intraperitoneal (*i.p.*) ratones *Mif*^{-/-} o WT con 100 quistes tisulares de la cepa avirulenta ME49 de *T. gondii* o PBS como control. En algunos casos MIF recombinante (Biolegend #599504) fue administrado vía *i.p.* en ratones infectados o no infectados como control.

Los quistes tisulares de la cepa ME49 de *T. gondii*, fueron obtenidos de cerebros de ratones C57BL/6 de 8 semanas de infección, los cuales fueron infectados vía *i.p.* con 40 quistes de *T. gondii*. El homogenado de cerebros provenientes de ratones no infectados, usado como control, no indujo respuesta inflamatoria detectable y tampoco indujo el incremento en los niveles de citocinas inflamatorias.

5.5. Análisis del progreso de la infección

La sobrevivencia de los ratones infectados *Mif*^{-/-} y WT se realizó mediante el monitoreo visual diario durante 25 días posteriores a la infección y se registró el deceso para graficarlo (gráfico de sobrevivencia, GraphPath Prisma 6).

Para determinar el establecimiento de la infección aguda con *T. gondii*, se inyectaron 3 ml de PBS frío (4°C) en la cavidad peritoneal de ratones *Mif*^{-/-} o WT sacrificados por CO₂ a las 0, 3, 5 y 7 días post infección (dpi). Posteriormente se hizo una pequeña incisión en la piel dejando expuesta la cavidad peritoneal para extraer el fluido rico en células del exudado peritoneal (PECs, del inglés Peritoneal Exudate Cells) y taquizoitos de *T. gondii*. Los taquizoitos fueron contados por exclusión de azul tripano en cámara de Neubauer en el microscopio Olympus BX51 (X100; Olympus American, Melville, NY).

Por otro lado, se obtuvieron cerebros de ratones *Mif*^{-/-} o WT a 25 dpi y se homogenizaron cada uno en 2 ml de PBS. De esta solución se tomaron 10 µl para contar el número de quistes en cámara de Neubauer en los cuadrantes para

leucocitos con objetivo 40X, microscopio Olympus. El número de parásitos por cerebro de ratón se obtuvo desarrollando la fórmula:

$$\frac{\text{No. de quistes x la dilución}}{0.1 \times \text{No. de cuadrantes contados}} = \frac{\text{No de quistes}}{\text{mm}^3} \times 1000 = \frac{\text{No. de quistes}}{\text{ml}}$$

5.6. Preparación del Antígeno Soluble de *Toxoplasma gondii* (STAg)

El STAg fue preparado acorde a los lineamientos descritos anteriormente [58]. Brevemente, la cepa RH de *T. gondii* fue mantenida por pases seriados en la cavidad peritoneal de ratones CD1. Para la preparación del antígeno de *T. gondii* se obtuvieron taquizoitos de un cultivo de células Vero infectadas con el parásito como se ha descrito anteriormente [59]. Los taquizoitos (1×10^9) fueron suspendidos en 5 ml de solución salina de fosfatos amortiguada de Dulbecco (Dulbecco's phosphate-buffered saline D-PBS), sonicados en hielo por 5 min a 40 W con el homogenizador ultrasónico 4710 (Cole-Parmer, Chicago, Ill.) y centrifugados a 10000 X g a 4°C por 30 min. El sobrenadante fue colectado, filtrado en condiciones estériles (filtro de 0.22 μm) y almacenado en alícuotas a -20 °C. La concentración proteica fue determinada con el Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Richmond, Cal.), en el que se usó albumina de suero como control estándar.

5.7. Diferenciación de CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea, y las condiciones de estímulo

Se obtuvieron CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea de acuerdo al protocolo descrito anteriormente [60]. Brevemente, células de médula ósea fueron obtenidas de fémures y tibias de ratones WT o *Mif*^{-/-}, a través de lavados con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) suplementado con 10% de suero

fetal bovino (SFB), 100 unidades penicilina/estreptomicina, 2 mM de glutamina, 25 mM de buffer HEPES y 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO, BRL Grand Island, NY, USA). Los eritrocitos fueron descartados con cloruro de amonio al 0.83%. La suspensión celular fue estimulada por 24 h con 20 ng/ml de mGM-CSF (Peprotech, México) en medio D-MEM suplementado. Después de 24 h las células no adherentes fueron descartadas y las células adherentes fueron re-estimuladas con 20 ng/ml de mGM-CSF a 30°C, 5% CO₂. Este paso fue repetido en el día 3 y 5 de incubación. En el día 6 de cultivo las células no adherentes (en su mayoría CD⁺CD11b⁺) fueron cosechadas y resuspendidas a una concentración de 2x10⁶/ml en medio D-MEM suplementado. Las células fueron transferidas a platos de cultivo de 24 pozos (Costar, Cambridge, MA, USA) y tratadas con el inhibidor de p-38/SAPK2 (SB203580, Millipore) a 10 µM, o únicamente con el diluyente (DMSO) durante 2 h. Posteriormente, las células fueron incubadas a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30 min y 24 h) a 30°C, 5% CO₂, con los siguientes estímulos: MIF recombinante murino (rMIF, 100 ng/ml, Biolegend), Lipopolisacáridos (LPS, 100 ng/ml, SIGMA), STAg (5 µg/ml) y acetato de forbol miristato (PMA, 50 ng/ml, SIGMA) en conjunto con ionomicina (1 µg/ml, Invitrogen). Las células fueron cosechadas y analizadas por fosfo-flow o western blot. Se colectaron los sobrenadantes de cultivos estimulados por 24 h y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

5.8. Transferencia adoptiva de monocitos de médula ósea

Los monocitos fueron aislados como se reportó anteriormente [61]. Brevemente, tejido de médula ósea fue obtenido de fémures y tibias de ratones WT o *Mif*^{-/-}, a

través de lavados con medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10%, penicilina/estreptomicina (100 unidades), glutamina 2 mM, buffer HEPES 25 mM y aminoácidos no esenciales 1% (GIBCO, BRL Grand Island, NY, USA). Los monocitos fueron enriquecidos a través de un gradiente de Ficoll (SIGMA), centrifugado a 500 x g por 30 min a 24 °C (sin freno). A continuación, se colectó la capa de monocitos y se diluyó en PBS 1:10 para centrifugarla a 500 x g por 10 min a 24 °C. Una vez terminado el lavado, las células fueron contadas en el microscopio (40X) e incubadas con el KIT Monocyte Isolation (Miltenyi Biotec, 130-100-629) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las células fueron corridas a través de una columna LS (MACS separation columns, Miltenyi Biotec) para su selección negativa. La fracción negativa fue colectada (90% de monocitos) y teñida para ser adquirida en el DB Influx Sorter. Se colectó la población de monocitos Ly6C^{high} y se incubó con marca para rastreo y proliferación celular (cell trace proliferation dye) eFluor 450 (eBioscience, 65-0842-85) de acuerdo a los lineamientos del fabricante. Una vez teñidas las células, fueron transferidas (2×10^6 células) vía intravenosa (*v.i.*) a ratones WT o *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii* o no infectados como control. Las células transferidas fueron recuperadas de la cavidad peritoneal y analizadas por citometría de flujo 5 días después de la infección (vía *i.p.* con 100 quistes de *T. gondii*). La figura 8 muestra el diseño experimental de la transferencia adoptiva de monocitos de médula ósea.

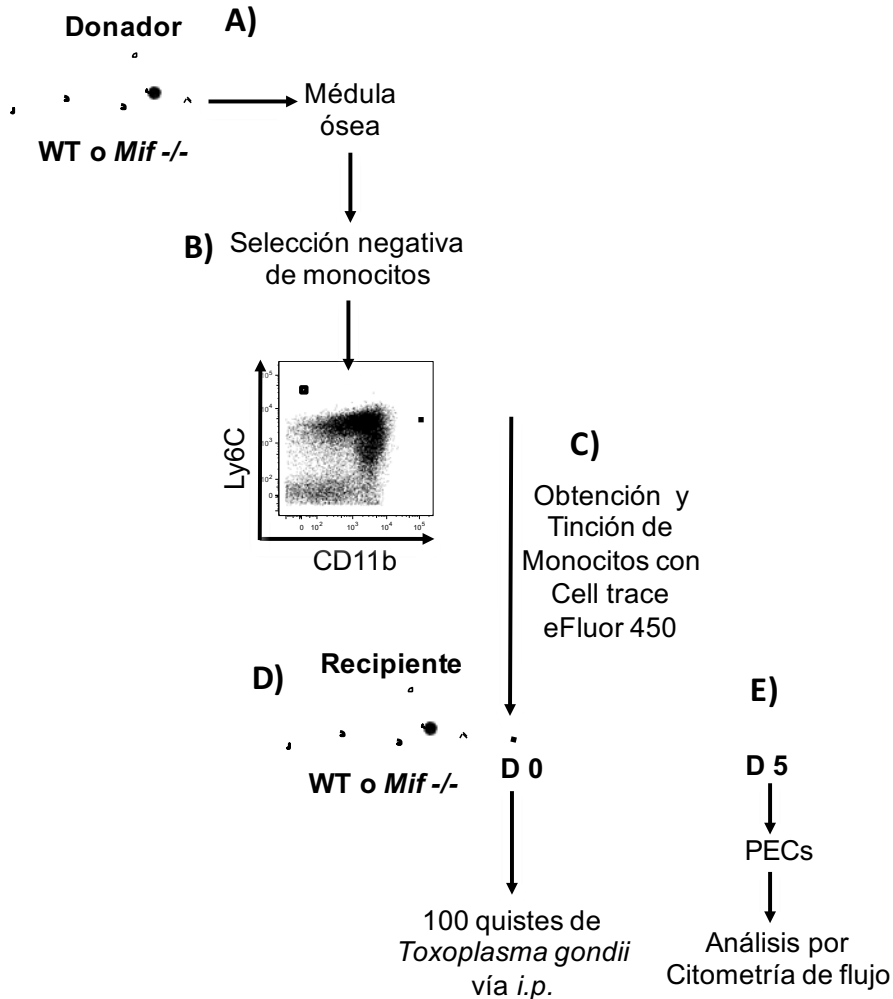


Fig. 8.- (A) Monocitos CD49b⁻ CD90⁻ Ly6G⁻ CD11b⁺ Ly6C⁺ de ratones WT o *Mif*^{-/-}, fueron aislados por (B) selección negativa y separados en Ly6C^{high} y Ly6C^{low} por cell sorting. (C) Mos Ly6C^{high} fueron marcados con eFluor 450 dye y transferidos v.i. a ratones WT o *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii*. (D) Las PECs de ratones infectados fueron cosechadas al quinto día de infección y analizadas por citometría de flujo.

5.9. Obtención de células de la cavidad peritoneal (PECS)

Para la obtención de PECs de ratones WT y *Mif*^{-/-}, se utilizó el método básico de exudado peritoneal. Este método consiste en inyectar 10 ml de PBS a 4 °C en la cavidad peritoneal de los ratones dando un ligero masaje a fin de remover la mayor cantidad de macrófagos del peritoneo. Se hace una pequeña incisión en la

piel dejando expuesta la cavidad peritoneal para extraer las PECs contenidas en la solución de PBS. El exudado peritoneal obtenido fue colocado en tubos cónicos estériles de 15 ml y centrifugados a 600 x g durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el botón resuspendido en 1 ml de medio RPMI-1640 suplementado. Una vez resuspendidas las células, se filtraron con una malla de Nylon de 70 µm y se tomaron 10 µl de la suspensión para su tinción con azul tripano en proporción 1:1 (Sigma-Aldrich) para ser contadas en cámara Neubauer y eventualmente ajustadas para ser analizadas por citometría de flujo.

5.10. Análisis de citometría de flujo

Aproximadamente $1-3 \times 10^6$ PECs fueron teñidas con blue-fluorescent dye L23105 (Life technologies) e incubadas con anti-ratón CD16/32, 93 (Biolegend) en FACs buffer (1% SFB/0.01% NaN₃ in PBS) por 15 min a 4 °C, para descartar células muertas y reconocimiento inespecífico de los anticuerpos, respectivamente. Después de un lavado con PBS, las células fueron reconstituidas en 100 µl de FACs buffer con diferentes combinaciones de anticuerpos fluorescentes primarios a 4 °C por 20 min para su tinción extracelular y colectadas en el citómetro de flujo LSRII (Becton Dickinson, BD). Las células fueron seleccionadas de acuerdo al tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A) para eliminar residuos y eritrocitos, seguido por una selección en FSC-A y FSC-H para discriminar los dobletes o agregados celulares. Los números absolutos de las células fueron calculados con el número total de células multiplicado sucesivamente por los porcentajes de selección obtenidos a través del programa Flow Jo Versión 9.8.2. Los siguientes anticuerpos conjugados fueron adquiridos de eBioscience y usados para la tinción

extracelular: anti-CD11c Alexa Fluor 700, N418; anti-DEC-205 PE-cy7, 205yekta; anti-MHCII eFluor 450, M5/114.15.2; anti-CD40 PE, 1C10; anti-CD86 FITC, CT-CD8b; anti-CD86 Brilliant violet 605, GL1; anti-CD11b Alexa Fluor 647, M1/70; anti-Ly6C, Alexa Fluor 488, HK1.4; anti-F480 Alexa Fluor 488, BM8; anti-Ly6C efluor 450, HK1.4; anti-CD3 FITC, 145-2C11; anti-CD3 Alexa 700, 17A2; anti-CD49 APC, DX5; anti-CD49 APC/Cy7, DX5. Los siguientes anticuerpos fueron adquiridos de Biolegend: anti-CD8 α Alexa Fluor 700, 53-6.7; anti-CD8 α PerCP, 53-6.7; anti-CD11b Alexa Fluor 700, M1/70; anti-F4/80 Brilliant violet 605, BM8; anti-Ly6G PER-CP, 1A8; anti-CXCR4 Brilliant violet 421, 1276F12; anti-CXCR2 PE/Cy7, 5E8/CXCR2. Los siguientes anticuerpos fueron adquiridos de BD Bioscience: anti-MHCII PE, AF6-120.1; anti-CD8 α PER-CP, 53-6; anti-CD11c APC, N418; anti-CD74, FITC, In-1.

La tinción intracelular de CDs y Mo de PECs se realizó incubando $1-3 \times 10^6$ células por 6 h en medio RPMI-1640 suplementado y BD Golgi Plug (BD Biosciences) a 37 °C, 5% CO₂. Una vez terminado el tiempo de incubación, las células fueron lavadas, teñidas extracelularmente y tratadas con el kit Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) de acuerdo al protocolo del fabricante. Una vez tratadas con Cytotfix/Cytoperm, las células fueron teñidas intracelularmente con los anticuerpos adquiridos de las siguientes compañías: eBiosciences: anti-iNOS PE, CXNFT. Biolegend: anti-TNF- α Brilliant violet 650, MP6-XT22. BD Biosciences: anti-IL-12p40/70 Brilliant violet 405, C15.6 y anti-IL-12p40/70 APC, C15.6.

Las CDs CD11b⁺ fueron analizadas como células negativas para el marcador de células muertas (Live/dead⁻) y positivas para MHCII, CD11c y CD11b. Las CDs

CD8 α ⁺ fueron catalogadas como Live/dead⁻ MHCII⁺ CD11c⁺ DEC205⁺ CD8 α ⁺. Las poblaciones de monocitos fueron clasificadas como Live/dead⁻ Ly6G⁻ CD11b⁺ F480⁺ Ly6C^{high} o Ly6C^{low}. Los macrófagos residentes en el peritoneo fueron analizados como Live/dead⁻ Ly6G⁻ CD11b⁺ Ly6C^{low} F480^{high}.

En linfocitos NK la tinción intracelular se realizó incubando 3x10⁶ PECs en 2 ml de medio RPMI-1640 suplementado BD Golgi Plug (BD Biosciences) a 37 °C, 5% CO₂, estimulados por 4 h con 5 ng/ml de Phorbol 12-myristato 13-acetato (PMA, Sigma) más 500 ng/ml de ionomicina (Sigma). Las células fueron lavadas, teñidas extracelularmente como se mencionó anteriormente y tratadas con el kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) de acuerdo al protocolo del fabricante. Una vez tratadas con Cytofix/Cytoperm, las células fueron teñidas intracelularmente con los anticuerpos anti-IFN- γ , PECy7, XMG1.2 (Biolegend) o anti-IFN- γ Alexa fluor 647, XMG1.2 (BD Pharmingen).

5.11. Evaluación de la vía de señalización de la MAPK p38 por el método fosfo-flow

Para determinar la(s) posibles vías de señalización inducidas por la presencia de MIF en las CDs, se evaluó la fosforilación de la MAPK p-38 en CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea de ratones WT o *Mif*^{-/-}, a través de la técnica de fosfo-flow, 3x10⁶ células fueron incubadas con anti-ratón CD16/32, 93 (Biolegend) en FACs buffer (1% SFB/0.01% NaN₃ in PBS) por 15 min a 4 °C. Las células fueron reconstituidas en 100 μ l de FACs buffer con los anticuerpos: anti-CD11c FITC, anti-MHCII PerCP y anti-CD11b PE (Biolegend) a 4 °C por 20 min para su tinción extracelular. Las células fueron transferidas a platos de cultivo de 24 pozos

(Costar, Cambridge, MA, USA) y tratadas con el inhibidor de p-38/SAPK2 (SB203580, Millipore) a 10 μ M, o únicamente con el diluyente (DMSO) durante 2 h. A continuación, fueron incubadas por 30 min con los siguientes estímulos: rMIF (100 ng/ml, Biolegend), LPS (100 ng/ml, SIGMA), STAg (5 μ g/ml) y PMA (50 ng/ml, SIGMA) en conjunto con ionomicina (1 μ g/ml, Invitrogen). Las células fueron tratadas con el kit Cytotfix/Cytoperm de acuerdo al protocolo del fabricante (BD Biosciences) para su tinción intracelular con los siguientes anticuerpos: conejo anti-fosfo p-38 (Thr180/Tyr182, Cell signaling #9211) y anti-conejo APC (Biolegend) a 4 °C por 30 min. Una vez teñidas, las células fueron lavadas y colectadas en el citómetro de flujo Attune (Becton Dickinson, BD) para su análisis.

5.12. Western blot

La técnica de Westernblot se realizó acorde a los lineamientos descritos anteriormente [62]. Brevemente, las CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea de ratones WT o *Mif*^{-/-}, fueron tratadas con el inhibidor de p-38/SAPK2 (SB203580, Millipore) a 10 μ M, o únicamente con el diluyente (DMSO) durante 2 h. Posteriormente, las células fueron incubadas a diferentes tiempos (0, 5, 15 y 30 min) a 30°C, 5% CO₂, con los siguientes estímulos: rMIF (100 ng/ml, Biolegend), LPS (100 ng/ml, SIGMA), STAg (5 μ g/ml) y PMA (50 ng/ml, SIGMA) en conjunto con ionomicina (1 μ g/ml, Invitrogen). Las células fueron cosechadas y tratadas con el buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol y 1% del inhibidor de proteasas y (Thermoscientific #78441). La concentración proteica fue determinada con el Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) y las muestras fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso. Las alícuotas de lisado

celular fueron separadas por SDS-PAGE (40 µg de proteína por pozo) usando mini-geles de poliacrilamida al 10% y transferidas a una membrana de polyvinylidene difluoride (PVDF, Immobilon-P, Millipore, USA). Las membranas fueron bloqueadas con PBS al 5% de albumina por 2 h e incubadas con el anticuerpo primario anti-fosfo p-38 (Thr180/Tyr182, Cell signaling #9211) a una dilución de 1:5000 al 2% de albúmina durante toda la noche. A continuación, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa (HRP) a una dilución de 1:5000 (Cell signaling #7074) en PBS al 2% de albúmina durante 2 h. Las membranas fueron incubadas por 5 min con la solución West Pico Chemiluminiscent (Thermoscientific #34080) y reveladas con el aparato ImageQuant LAS 4000 System (GE Healthcare), siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente, las membranas fueron tratadas con la solución de stripping (Blot stripping buffer, Thermoscientific #21059) y teñidas con el anticuerpo anti-p-38 (Cell signaling #9212) a una dilución de 1:2500 en PBS al 2% de albúmina durante toda la noche. Después de 3 lavados con PBS, la membrana fue teñida con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa (HRP), a una dilución de 1:5000 (Cell signaling #7074). Las membranas fueron reveladas como se describió arriba y el análisis por densitometría se llevó a cabo utilizando el programa ImageQuant TL LAS 4000 (GE Healthcare).

5.13. Determinación de los niveles de citocinas

Se obtuvo sangre de ratones WT y *Mif*^{-/-} infectados con 100 quistes de *T. gondii*, realizando una incisión en la vena caudal a los 0, 1, 2, 3, 5 y 7 dpi. La sangre se

centrifugó en tubos eppendorf de 1.8 ml a 3000 rpm a 4 °C por 10 min hasta la obtención pura del suero, éste se mantuvo en congelación a -70 °C hasta su uso. La concentración de los niveles de citocinas inflamatorias (IFN- γ , IL-6, IL-12p70 y TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10) en suero y sobrenadantes de CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea estimuladas por 24 h, se determinó por medio de los KITS Bio-Plex Pro Assay (BIO-RAD, M600003J7) y Cytometric Bead Array (BD Biosciences, CBA Th1/Th2, 551287) de acuerdo a los lineamientos de los fabricantes. Los niveles de MIF fueron obtenidos a través del Kit Mouse MIF ELISA (Neobiolab, MM0216) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.14. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue desarrollado con la prueba *t* de Student's o one-way ANOVA, seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey para los datos que presentaron distribución normal. Los datos graficados se muestran como la media \pm SD o SEM. Los valores obtenidos de $P \leq 0.05$ fueron considerados como significativos. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad prism 6.

6. RESULTADOS

6.1. La infección aguda con *T. gondii* induce el incremento de las citocinas inflamatorias en suero

Aunque MIF tiene un papel importante en la resistencia a *T. gondii* [51], se desconoce si este papel protector comienza en la fase aguda de la infección con el parásito, por lo tanto, primero se cuantificaron los niveles de MIF en suero de ratones WT y *Mif*^{-/-} infectados con la cepa avirulenta ME49 de *T. gondii*.

En la figura 9 se observa que los niveles de MIF en suero de ratones WT se incrementaron desde el primer día de la infección, alcanzando un pico máximo a los 3 y 5 días post infección (dpi), descendiendo eventualmente a niveles basales a los 7 dpi. Como era de esperarse, los ratones *Mif*^{-/-} presentaron una deficiencia de los niveles de MIF en suero a lo largo de la infección aguda con *T. gondii*.

Adicionalmente, los ratones WT infectados presentaron niveles elevados de citocinas inflamatorias en suero (IL-12p70, IFN- γ , IL-6 y TNF- α), en algunos casos desde el día 1 p.i., en comparación con ratones *Mif*^{-/-} infectados (Fig. 9B-E). Los niveles de la citocina reguladora IL-10 fueron similares entre los grupos de ratones *Mif*^{-/-} y WT (Fig. 9F).

Estos datos sugieren que el incremento de los niveles de MIF en los ratones WT durante los primeros días de la infección, podría promover de manera muy temprana la producción de citocinas inflamatorias y por lo tanto el desarrollo de respuesta inmune hacia *T. gondii*. Esto de acuerdo a las propiedades de inductor de la respuesta inflamatoria que se han descrito para MIF, en infecciones por parásitos protozoarios [50].

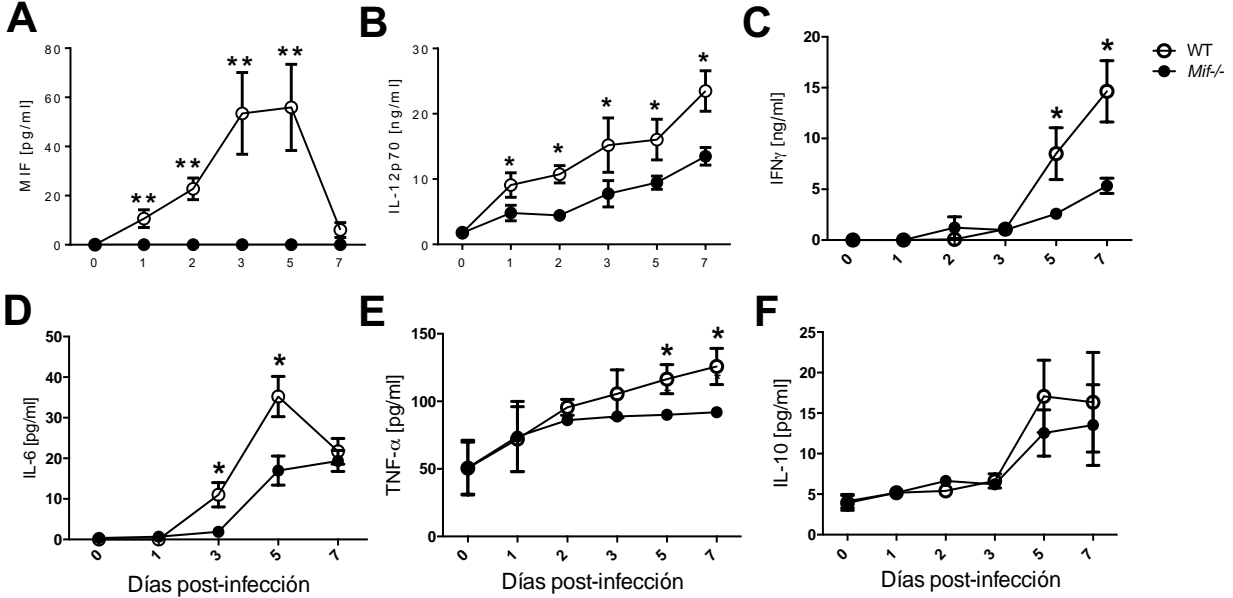


Fig. 9 Niveles en suero de las citocinas: MIF (A), IL-12p70 (B), IFN- γ (C), IL-6 (D), TNF- α (E) e IL-10 (F) de ratones WT (O) y *Mif*^{-/-} (●) infectados con 100 quistes de *T. gondii* a los tiempos: 0, 1, 2, 3, 5 y 7 dpi. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes (n=3-5 cada tiempo de infección), mostrados como la media \pm SE *p< 0.05 prueba “t” de student.

6.2. MIF promueve la maduración de CDs CD11b⁺ durante la infección aguda con *T. gondii*

En la infección por *T. gondii* se ha descrito que una de las principales fuentes de citocinas pro-inflamatorias son las subpoblaciones de células dendríticas convencionales [15, 16] [20]. En condiciones de infección, las CDs maduran por la exposición a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o factores mediadores de la inflamación, lo que incrementa su capacidad de procesar antígenos, expresión de moléculas co-estimuladoras y producción de citocinas [63]. Estudios recientes en nuestro laboratorio sugieren que MIF promueve la maduración de CDs en la infección con *T. gondii* [52], lo que podría explicar los

niveles reducidos de citocinas inflamatorias en suero y el incremento en la susceptibilidad de los ratones *Mif*^{-/-} a la toxoplasmosis experimental. Por estos motivos, se evaluó el papel de MIF en la maduración de las subpoblaciones de CDs convencionales CD8 α ⁺ y CD11b⁺, reportadas anteriormente como esenciales para la resistencia a *T. gondii*, y principales productoras de IL-12 durante la infección aguda con el parásito [15, 16, 20].

Los resultados demostraron que los números absolutos de ambas poblaciones de CDs CD8 α ⁺ y CD11b⁺, se incrementaron en el sitio de infección con *T. gondii* (cavidad peritoneal) hasta alcanzar un pico máximo a los 5 dpi (Fig. 10B y C). Los números absolutos de CDs CD8 α ⁺ y CD11b⁺ fueron similares entre ratones infectados *Mif*^{-/-} y WT. Sin embargo, los ratones *Mif*^{-/-} presentaron un menor número de CDs CD11b⁺ IL-12p70⁺ comparado con CDs de ratones WT a los 3 ($P = 0.0028$) y 5 ($P = 0.0006$) dpi (Fig. 10D). No se encontraron diferencias significativas en el número de CDs CD8 α ⁺ IL-12p70⁺ (Fig. 10E). Adicionalmente, las CDs CD11b⁺, mas no CD8 α ⁺ provenientes de ratones *Mif*^{-/-}, presentaron una reducida expresión de la molécula coestimuladora CD86 (11A-C) comparado con CDs CD11b⁺ WT después de 3 ($P = 0.0498$) y 5 dpi ($P = 0.0194$). No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD40 entre los grupos (Fig. 11D y E). Resultados similares, tanto en ratones WT como *Mif*^{-/-}, se observaron en CDs del bazo (Fig. 12). Estas evidencias indican que MIF tiene un papel importante en la maduración de CDs CD11b⁺, un población crucial en el control de la infección y la inducción de la respuesta inmune innata hacia *T. gondii*.

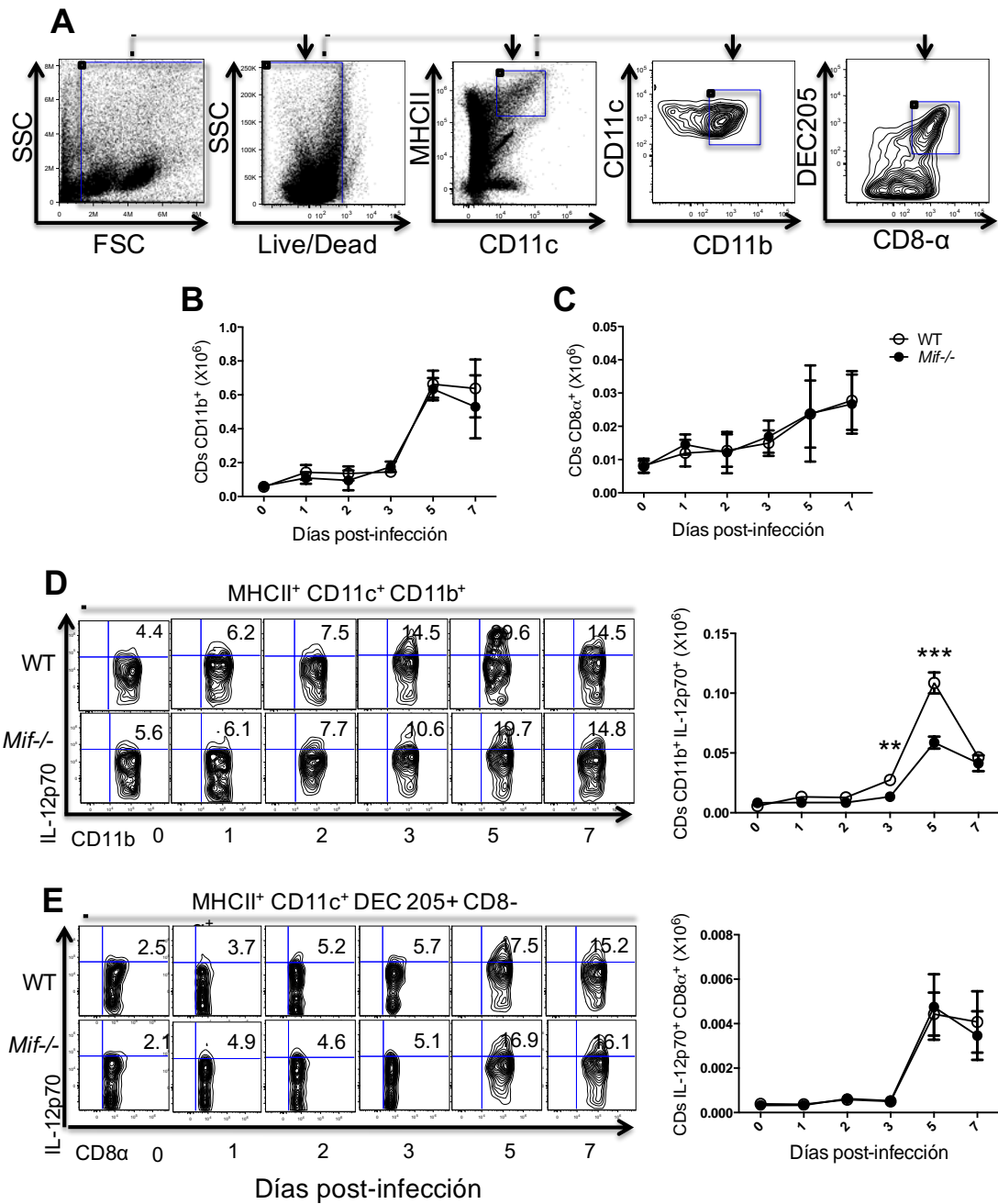


Fig. 10 Ratones WT (○) y *Mif*^{-/-} (●) fueron infectados con 100 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii* y sacrificados a los tiempos 0, 1, 2, 3, 5 y 7dpi. Se cosecharon PECs de las cuales se analizó la producción de IL-12p70 intracelular en CDs CD11b⁺ y CD8α⁺ por la técnica de citometría de flujo. (A) Estrategia de selección de CDs CD11b⁺ (MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺) y CD8α⁺ (MHCII⁺CD11c⁺DEC205⁺CD8α⁺). (B) Cinética de los números absolutos de CDs CD11b⁺ y (C) CD8α⁺. (D) Dotplots representativos (panel izquierdo) y números absolutos (panel derecho) de CDs CD11b⁺ IL-12p70⁺. (E) Dotplots representativos (panel izquierdo) y números absolutos (panel derecho) de CDs CD8α⁺ IL-12p70⁺. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media ± SE *p< 0.05 prueba "t" de student.

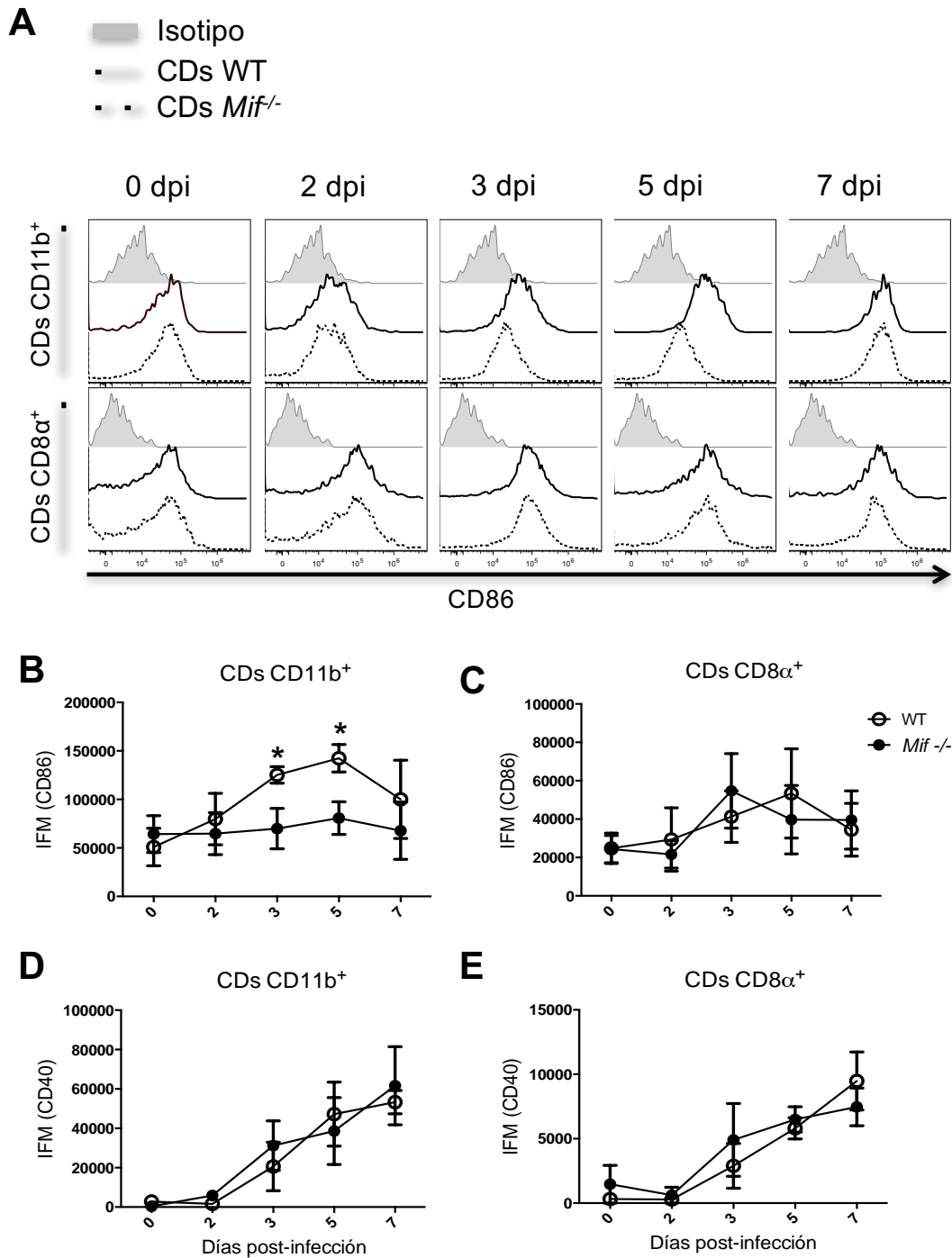


Fig.- 11 Análisis de la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40 en CDs de ratones WT y *Mif*^{-/-} a 0, 3, 5 y 7 dpi con *T. gondii*. (A) Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD86 en CDs CD11b⁺ y CD8 α ⁺ de ratones WT (línea sólida), *Mif*^{-/-} (línea punteada) e isotipo (CDs teñidas con anticuerpo IgG no específico). (B) Cinética del MFI correspondiente a la expresión de CD86 en CDs CD11b⁺ y (C) CD8 α ⁺. (D) Cinética del MFI correspondiente a la expresión de CD40 en CDs CD11b⁺ y (E) CD8 α ⁺. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media \pm SE **p* < 0.05 prueba "t" de student.

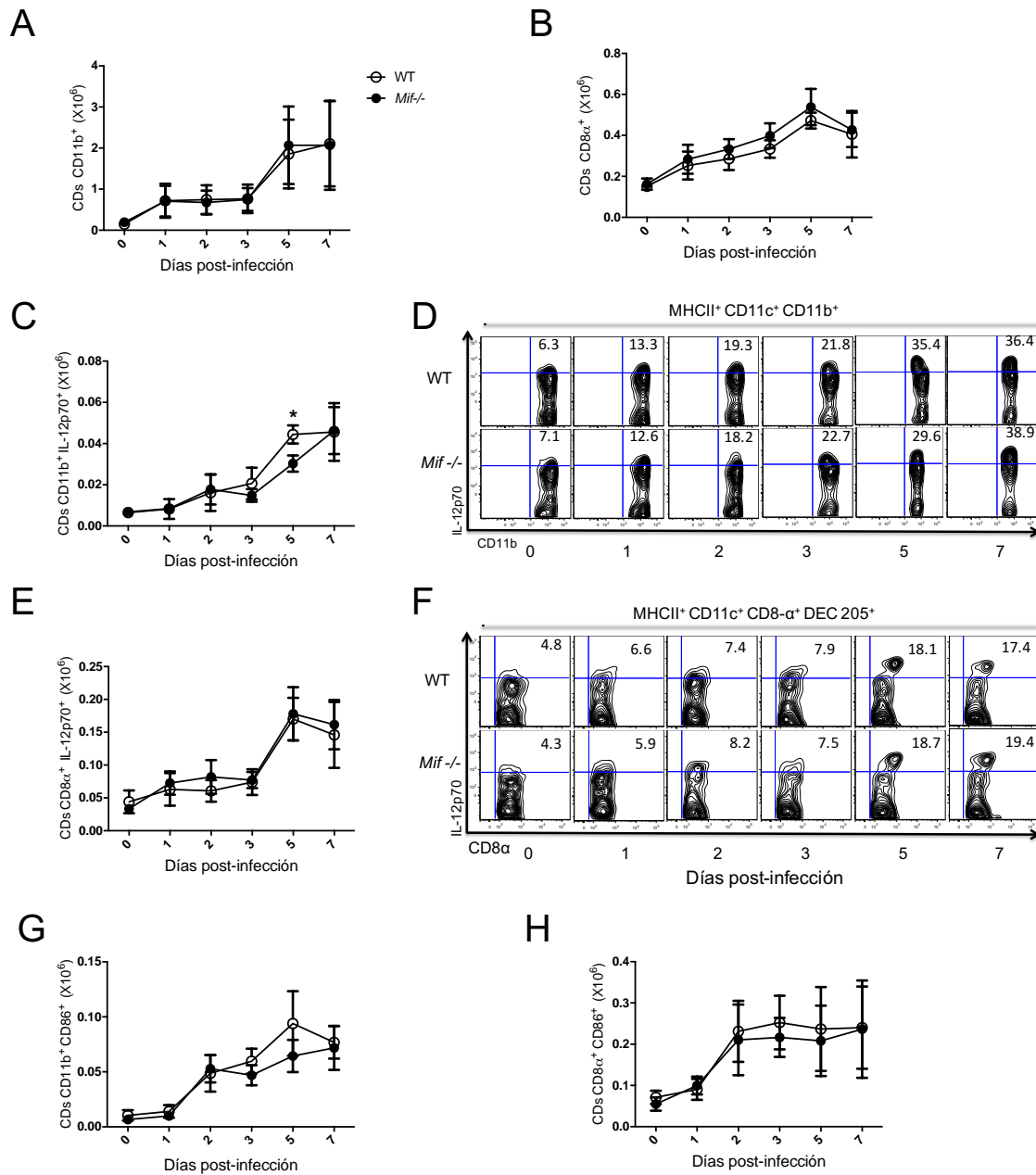


Fig. 12 Ratones WT (○) y *Mif*^{-/-} (●) fueron infectados con 100 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii* y sacrificados a los tiempos 0, 1, 2, 3, 5 y 7 dpi. Se cosecharon esplenocitos en los cuales se analizó la producción de IL-12p70 intracelular en CDs CD11b⁺ y CD8α⁺ por la técnica de citometría de flujo. (A) Cinética de los números absolutos de CDs CD11b⁺ y (B) CD8α⁺. (C) Números absolutos y (D) dotplots representativos de CDs CD11b⁺ IL-12p70⁺. (E) Números absolutos y (F) dotplots representativos de CDs CD8α⁺ IL-12p70⁺. (D) Cinética del MFI correspondiente a la expresión de CD86 en CDs CD11b⁺ y (E) CD8α⁺. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media ± SE *p< 0.05 prueba “t” de student

6.3. Las CDs CD11b⁺ expresan en mayor intensidad los receptores de MIF comparado con CDs CD8 α ⁺

MIF es un ligando de la proteína transmembranal de tipo II CD74 [64] y un ligando no convencional de los receptores de quimiocinas CXCR2, CXCR4 [64, 65] y CXCR7 [66]. Debido a que MIF promueve la maduración de CDs CD11b⁺ pero no CD8 α ⁺, esta función selectiva podría estar relacionada con la expresión diferencial de los receptores de MIF en las subpoblaciones de CDs CD11b⁺ y CD8 α ⁺, por lo tanto, en este estudio se comparó la expresión de los receptores CD74, CXCR2 y CXCR4 en CDs CD11b⁺ y CD8 α ⁺ de ratones WT infectados con *T. gondii*.

Los resultados obtenidos por medio de citometría de flujo demostraron que las CDs CD11b⁺ expresan en mayor intensidad los receptores CD74 (3 dpi, $P = 0.0013$; 5 dpi, $P = 0.0014$; Fig. 13A y B), CXCR4 (5 dpi, $P = 0.0014$; Fig. 13A y C) y CXCR2 (3 dpi, $P = 0.0241$; 5 dpi, $P = 0.0341$; Fig. 13A y D) comparado con CDs CD8 α ⁺.

Estas evidencias sugieren que las CDs CD11b⁺ son más sensibles al estímulo de MIF comparado con las CDs CD8 α ⁺, lo que podría explicar el papel selectivo de MIF en la maduración de las CDs CD11b⁺, durante la infección aguda con *T. gondii*.

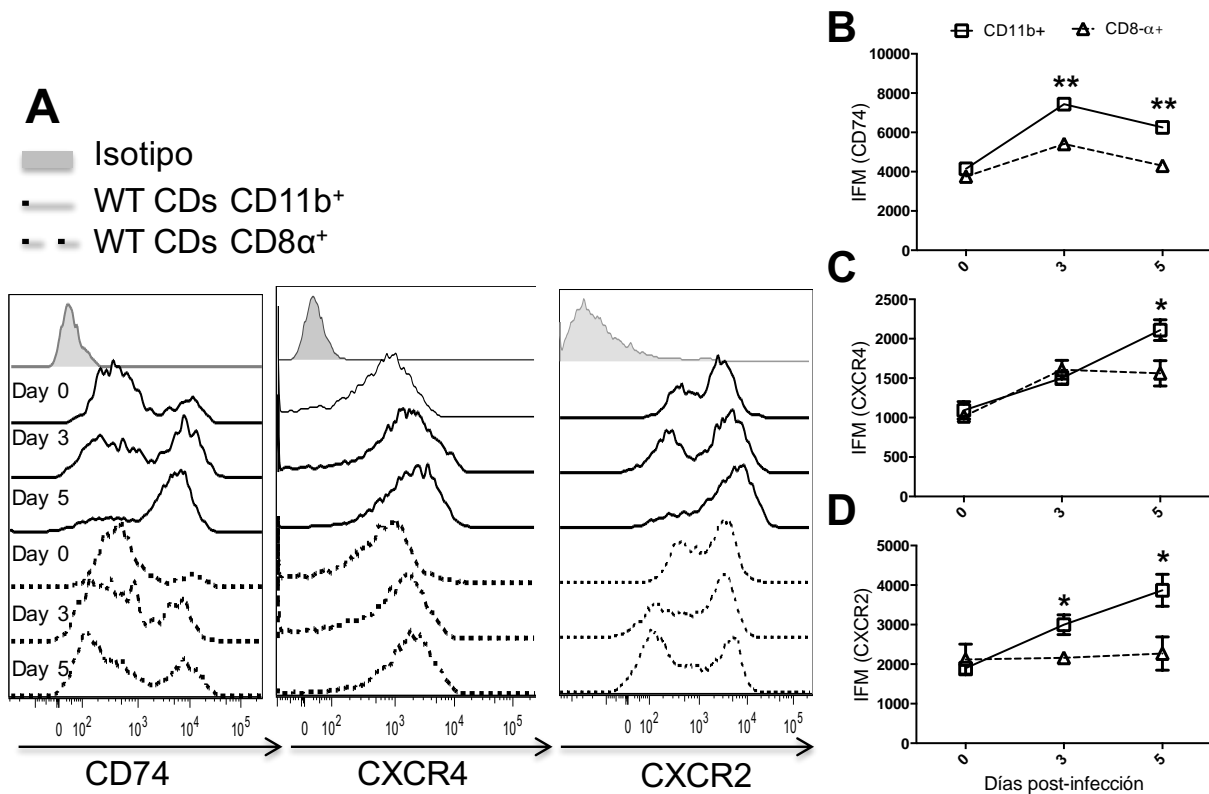


Fig.- 13.-Análisis de la expresión de los receptores CXCR2, CXCR4 y CD74 en CDs de ratones WT infectados a los 0, 3 y 5 dpi con *T. gondii*. (A) Histogramas representativos de la IFM de CD74, CXCR4 y CXCR2 en CDs CD11b⁺ (línea sólida), CD8α⁺ (línea punteada) e isotipo (línea gris). (B) Cinética del IFM correspondiente a la expresión de CD74, (C) CXCR4 y (D) CXCR2 de CDs CD11b⁺ (□) y CD8α⁺ (Δ). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media ± SE *p< 0.05 prueba “t” de student.

6.4. MIF promueve el reclutamiento de linfocitos NK productores de IFN-γ durante la infección aguda con *T. gondii*

MIF es una molécula que presenta un efecto pleiotrópico en diferentes modelos de inflamación e infección [41, 42] [43, 44] [45] [50]. Esta propiedad sugiere que MIF es capaz de inducir la maduración de CDs directamente al ser reconocido por sus

receptores o indirectamente induciendo mecanismos importantes para la activación de las CDs. Estudios previos han demostrado que el IFN- γ producido por linfocitos NK durante la infección aguda con *T. gondii*, tiene un papel crucial en la maduración de la subpoblación de CDs CD11b⁺ [20] [67, 68]. Nuestros resultados demuestran que los ratones infectados *Mif*^{-/-} presentan niveles reducidos de IFN- γ en suero comparado con ratones infectados WT, por lo que en este proyecto se analizó la producción de IFN- γ intracelular de linfocitos NK del peritoneo de ratones WT y *Mif*^{-/-} infectados con el parásito.

Los resultados obtenidos demostraron que los ratones WT y *Mif*^{-/-} presentaron un incremento gradual en el porcentaje de linfocitos NK (CD49b⁺ CD3⁻) IFN- γ ⁺ durante el curso de la infección aguda con *T. gondii* (Fig. 14B). No obstante, los ratones *Mif*^{-/-} infectados presentaron un menor porcentaje de células NK IFN- γ ⁺ comparado con linfocitos NK IFN- γ ⁺ de ratones WT ($P = 0.038$, Fig. 14B). Este fenómeno estuvo asociado a un menor porcentaje ($P = 0.0197$, Fig. 14C) y número absoluto ($P = 0.0362$, Fig. 14D) de linfocitos totales NK en el sitio de infección de ratones *Mif*^{-/-} comparados con los ratones infectados WT. Estas evidencias sugieren que MIF promueve la maduración de CDs CD11b⁺ a través de inducir el reclutamiento temprano de linfocitos NKs productores de IFN- γ durante la infección aguda con *T. gondii*. Recientemente, se ha demostrado que MIF participa en el reclutamiento de linfocitos NKT productores de IFN- γ en el modelo murino de psoriasis [69], lo que sugiere que MIF induce el reclutamiento de linfocitos NK y NKTs como un mecanismo para promover la respuesta inmune innata en condiciones de infección o de autoinmunidad.

Por otra parte, aunque la alta expresión de los receptores de MIF en CD8⁺ sugiere que éstas son más sensibles al estímulo de MIF comparado con CD8⁺, resultados preliminares de ensayos *in vitro* (Anexo1), indican que el estímulo con MIF recombinante no induce directamente la maduración de CD8⁺ derivadas de médula ósea. Probablemente la participación de MIF es indirecta, a través del reclutamiento de linfocitos NKs productores de IFN- γ , el cual parece ser el mecanismo principal para inducir la maduración de CD8⁺ en la toxoplasmosis experimental.

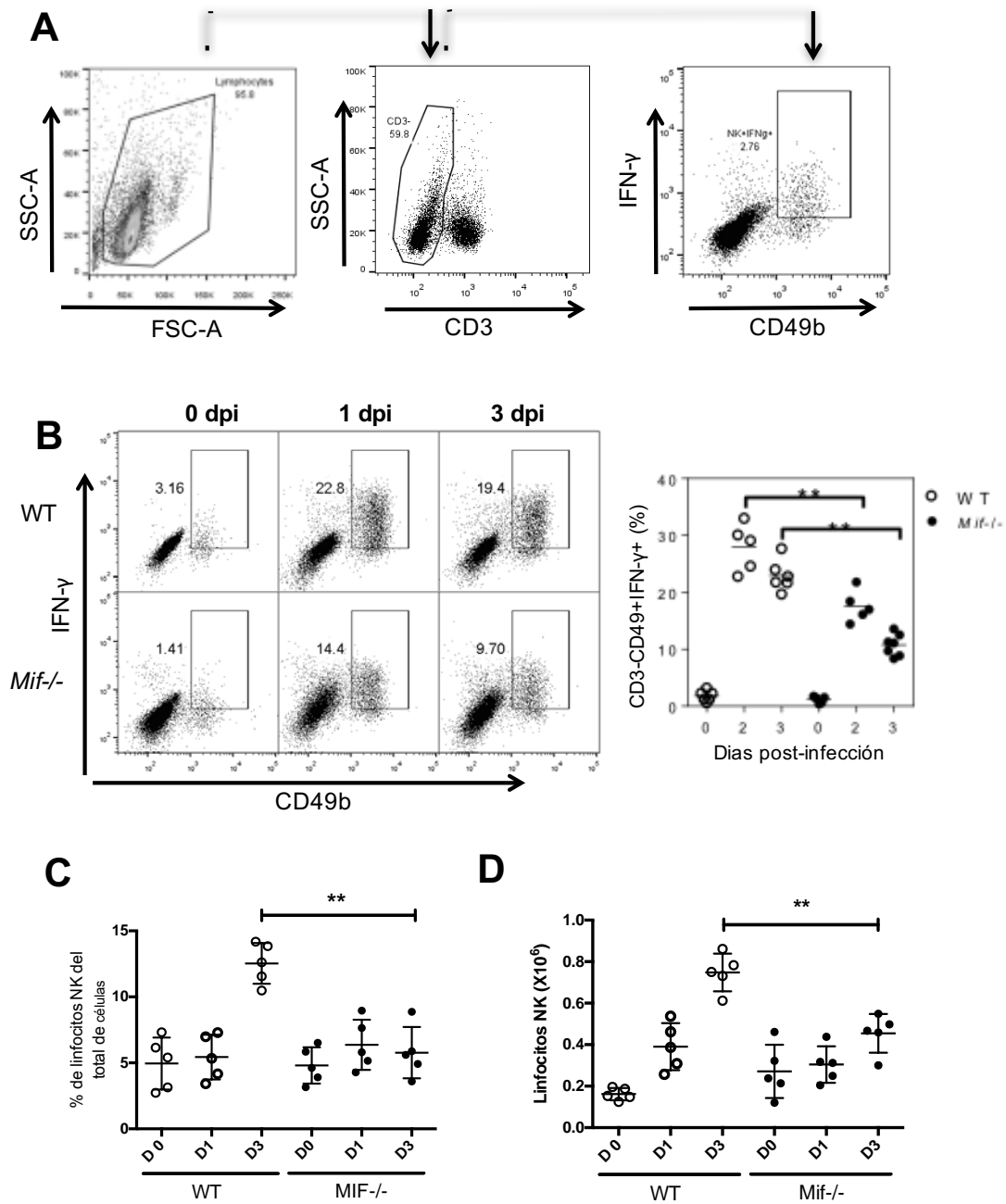


Fig. 14 Ratones WT (○) y *Mif*^{-/-} (●) fueron infectados con 100 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii* y sacrificados a los tiempos 0, 1 y 3 dpi. Se cosecharon PECs en las cuales se analizó la producción de IFN- γ intracelular en linfocitos NK por la técnica de citometría de flujo. (A) Estrategia de selección de linfocitos NK (CD3⁺ CD49b⁺). (B) Dotplots representativos (panel izquierdo) y porcentajes de linfocitos NK IFN- γ ⁺ (panel derecho). (C) Números absolutos de linfocitos NKs y (D) NK IFN- γ ⁺. Los datos son representativos de 1-2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media \pm SE **p*< 0.05 prueba “*t*” student.

6.5. MIF induce TipCDs en la infección aguda con *T. gondii*

Estudios previos han demostrado que los niveles de IFN- γ producidos por linfocitos NK en la respuesta inmune innata hacia Infecciones parasitarias o microbianas son un factor crucial para la inducción de CDs CD11b⁺ productoras de iNOS y TNF- α (TipCDs) en el sitio de infección [70-73]. En la respuesta inmune hacia *T. gondii*, iNOS y TNF- α son mediadores importantes para el control de la replicación del parásito [74-78]. Sin embargo, no se ha demostrado si la población de CDs CD11b⁺ en la infección con *T. gondii*, produce iNOS y TNF- α , o si MIF induce la expresión de estos factores en CDs CD11b⁺. Por estos motivos, se determinó la producción de iNOS/TNF- α intracelular en CDs CD11b⁺ y CD8 α ⁺ de ratones WT y *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii*.

Los resultados demuestran que una población de CDs CD11b⁺ iNOS⁺ TNF- α ⁺, (TipCDs), se incrementó gradualmente en la cavidad peritoneal de los ratones WT o *Mif*^{-/-} durante el curso de la infección aguda con *T. gondii* (Fig. 15A y 15B). No obstante, los ratones *Mif*^{-/-} infectados presentaron un menor número de TipCDs ($P = 0.0049$; Fig. 15A y 15B) así como de CDs CD11b⁺ TNF- α ⁺ iNOS⁻ ($P = 0.0090$, Fig. 15A y 15C) a los 5 dpi. No se observaron diferencias significativas en CDs CD11b⁺ iNOS⁺ TNF- α ⁻ (Fig. 15A y 15D). Por otra parte, las CDs CD8 α ⁺ presentaron un incremento gradual en su producción de TNF- α mas no de iNOS (Fig. 15E) en el curso de la infección aguda con *T. gondii*. No se observaron diferencias significativas entre CDs CD8 α ⁺ WT y *Mif*^{-/-} (Fig. 15E-H). Estos resultados indican que las CDs CD11b⁺ mas no CD8 α ⁺, son capaces de co-expresar iNOS y TNF- α durante la infección aguda con el parásito, originando a

las TipCDs. Además, MIF participa en la inducción de TipCDs en la fase aguda de la infección con *T. gondii*, probablemente a través de promover el reclutamiento de linfocitos NK productores de IFN- γ .

Por otra parte, debido a que la presencia de TipDCs en el sitio de infección se ha asociado al control de las infecciones parasitarias y microbianas [70-73], en este estudio se determinó el número de taquizoitos de *T. gondii* en la cavidad peritoneal de ratones infectados WT y *Mif*^{-/-} a los 5 y 7 dpi. Los resultados indican que los ratones *Mif*^{-/-} presentaron un mayor número de taquizoitos en el sitio de infección comparado con ratones WT infectados ($P < 0.05$, Figura 16), lo que indica un menor control de la infección por *T. gondii* en ratones *Mif*^{-/-}, probablemente debido a una deficiente actividad microbicida como resultado de un número reducido de TipDCs en el sitio de infección.

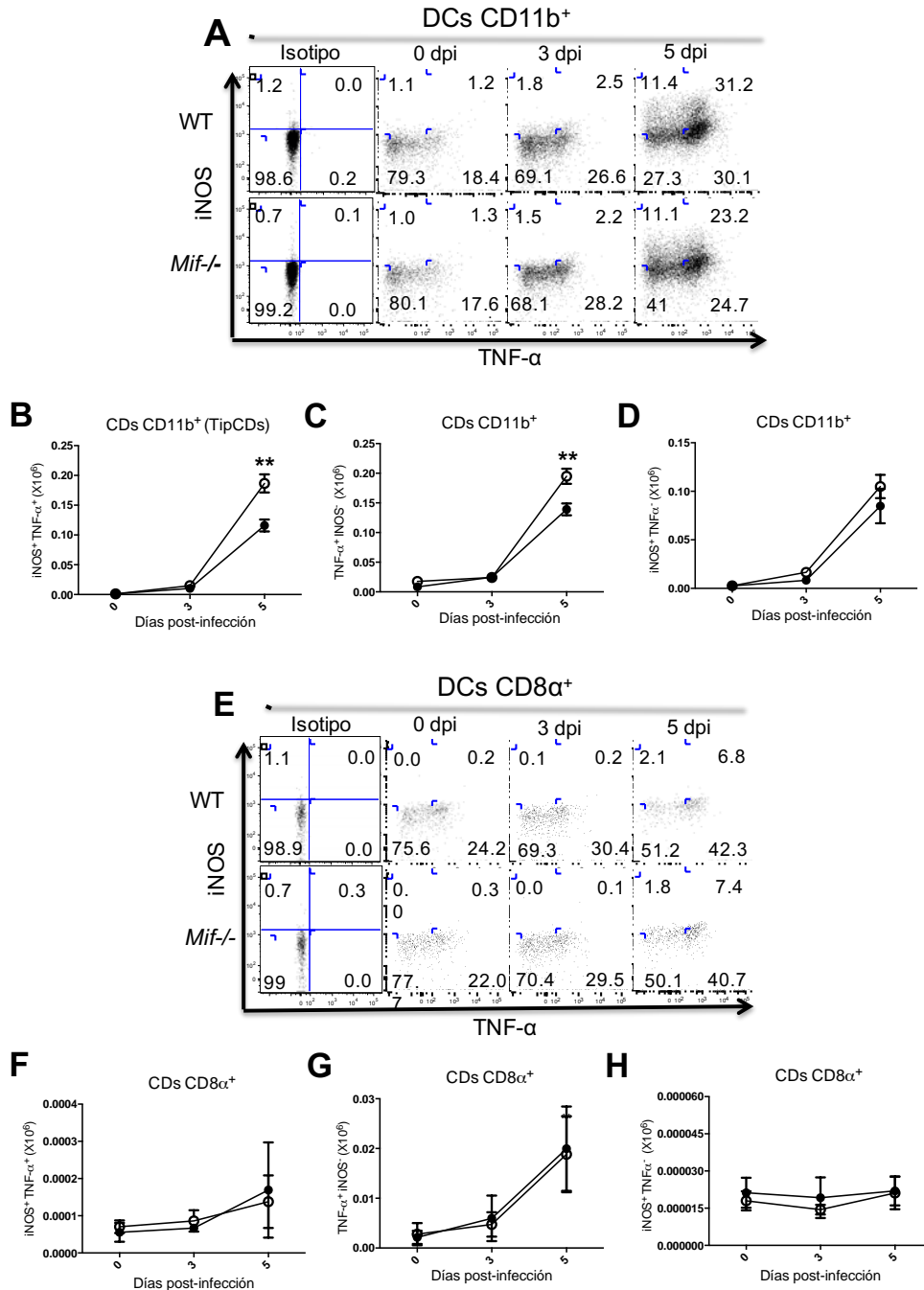


Fig. 15 Análisis de la producción intracelular de iNOS y TNF- α en las subpoblaciones de CDs CD11b⁺ y CD8 α ⁺ de ratones WT (○) y Mif^{-/-} (●) a los tiempos 0, 3 y 5 dpi con *T. gondii*. (A) Dotplots representativos de la producción intracelular de iNOS y TNF- α (TipCDs) en CDs CD11b⁺. (B) Cinética de los números absolutos de CDs CD11b⁺ iNOS⁺ TNF- α ⁺ (TipCDs), (C) CD11b⁺ iNOS⁻ TNF- α ⁺ y (D) CD11b⁺ iNOS⁺ TNF- α ⁻. (E) Dotplots representativos de iNOS y TNF- α intracelular de CDs CD8 α ⁺. (F) Cinética de los números absolutos de CDs CD8 α ⁺ iNOS⁺ TNF- α ⁺, (G) CD8 α ⁺ iNOS⁻ TNF- α ⁺, (H) CD8 α ⁺ iNOS⁺ TNF- α ⁻. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como media \pm SE *p< 0.05 prueba "t" student.

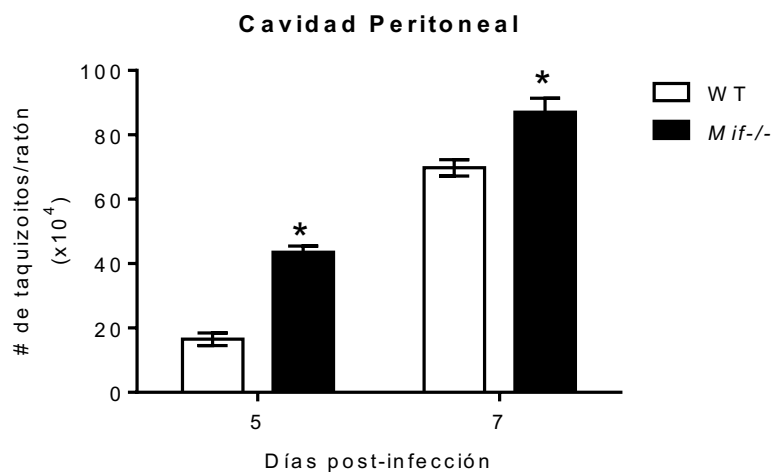


Fig. 16 Número de taquizoitos de *T. gondii* en ratones infectados WT (barras blancas) y *Mif*^{-/-} (barras negras) a 5 y 7dpi. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media ± SE *p< 0.05 prueba “t” student.

6.6. MIF promueve la activación clásica (M1) y diferenciación de los Mos Ly6C^{high} hacia TipCDs

Actualmente, se han caracterizado dos poblaciones de Mos en el modelo murino basadas en sus características funcionales y fenotípicas. Una población de Mos presenta una alta expresión de Ly6C (Ly6C^{high}) y ha sido denominada comúnmente como Mos inflamatorios debido a su rápida y selectiva migración de sangre hacia sitios de inflamación [79, 80]. La segunda subpoblación denominada Mos residentes, presentan una baja expresión de Ly6C (Ly6C^{low}) y se encuentran distribuidos tanto en sangre como en diferentes tejidos en condiciones basales [79-82]. Estudios recientes han demostrado que las poblaciones de monocitos Ly6C⁺ son requeridas para la resistencia a la infección vía oral o *i.p.* hacia *T. gondii* [83-87]. Adicionalmente, estos monocitos son capaces de diferenciarse hacia CDs CD11b⁺ durante la infección aguda con *T. gondii* [88], y hacia TipDCs

en otras infecciones parasitarias [70, 73]. Para determinar si MIF participa en la activación de los monocitos precursores de CDs CD11b⁺ durante la infección aguda con *T. gondii*, en este proyecto se analizó la producción de iNOS y TNF- α (marcadores de la activación clásica o M1) de los Mos Ly6C^{high} y Ly6C^{low} provenientes de ratones *Mif*^{-/-} y WT infectados con *T. gondii*.

La figura 17 demuestra que en condiciones basales, la cavidad peritoneal aloja tanto M ϕ s residentes F480^{high} como monocitos residentes Ly6C^{low} (Fig. 17B). Sin embargo, un gran número de Mos Ly6C^{high} y Ly6C^{low} son reclutados en la cavidad peritoneal después de 3 y 5 dpi con *T. gondii* (Fig. 17B-D). Por el contrario, se observó una baja proporción de M ϕ s residentes F480^{high} en el curso de la infección con el parásito (Fig. 17B y 17E). No se observaron diferencias significativas en el número total de Mos y M ϕ s entre ratones *Mif*^{-/-} y WT infectados (Fig. 17B-E). Sin embargo, los ratones *Mif*^{-/-} presentaron un número reducido de Mos Ly6C^{high} iNOS⁺ TNF- α ⁺ ($P = 0.0330$; Fig. 18A y 18B) y Ly6C^{high} iNOS⁺ TNF- α ⁻ ($P = 0.0473$; Fig. 18A y 18C), comparado con Mos Ly6C^{high} de ratones WT. No se observaron diferencias significativas en la producción de iNOS y TNF- α entre Mos Ly6C^{low} de ratones infectados *Mif*^{-/-} y WT (Fig. 18E-H). Estos datos sugieren que MIF promueve la activación de los monocitos Ly6C^{high}, mas no de los Ly6C^{low}, hacia un perfil de tipo M1 y probablemente su diferenciación hacia CDs CD11b⁺.

Para determinar la participación de MIF en la diferenciación de los Mos Ly6C^{high} hacia CDs CD11b⁺, se realizó una transferencia adoptiva *v.i.* de Mos Ly6C^{high} de ratones *Mif*^{-/-} o WT (donadores) teñidos con marca de rastreo celular (cell trace) a ratones *Mif*^{-/-} o WT infectados con *T. gondii* (recipientes), como se muestra en la Figura 8. Los resultados demostraron que la población de CDs CD11b⁺ de ratones

recipientes *Mif*^{-/-} o WT no infectados, no presenta CDs provenientes de Mos transferidos (cell-trace positivas) y tampoco produce iNOS (marcador de TipDCs). Sin embargo, en condiciones de infección la población de CDs CD11b⁺ de ratones recipientes *Mif*^{-/-} o WT, incrementó su producción de iNOS y presentó CDs positivas para cell-trace (Fig. 19A). Estos datos indican que los monocitos transferidos Ly6C^{high} *Mif*^{-/-} o WT son reclutados en el sitio de infección con *T. gondii* (la cavidad peritoneal) donde se diferencian a CDs CD11b⁺ y TipDCs. De manera interesante, los Mos de ratones *Mif*^{-/-} presentaron una habilidad similar a la de Mos WT para diferenciarse a CDs CD11b⁺ (Fig. 19B y 19C) y TipCDs (Fig. 19D y 19E) al ser transferidos a ratones WT infectados con *T. gondii*, lo que indica que la presencia de MIF en los monocitos Ly6C^{high} no es requerida para su conversión a CDs CD11b⁺ o TipCDs. Sin embargo, al ser transferidos a ratones *Mif*^{-/-} infectados, tanto los Mos *Mif*^{-/-} como los Mos WT presentaron una capacidad reducida para su conversión a TipCDs (WT, *P* = 0.0049; *Mif*^{-/-}, *P* = 0.0047; Fig. 19D y 19E). No se observaron diferencias significativas en la habilidad de los monocitos *Mif*^{-/-} o WT para diferenciarse hacia CDs CD11b⁺ en ratones *Mif*^{-/-} infectados (Fig. 19B y 19C). Estos resultados sugieren que los niveles sistémicos de MIF, son más importantes para inducir la conversión de los monocitos inflamatorios hacia TipCDs comparado con el MIF liberado/producido por los monocitos durante la fase aguda de la infección con *T. gondii*.

Por otra parte, los monocitos Ly6C^{high} reclutados a los 5 dpi con *T. gondii*, presentaron una mayor expresión de los receptores de MIF: CXCR4 (Fig. 20A y 20B) y CD74 (Fig. 20C y D), comparado con los monocitos Ly6C^{low} (5 dpi) o Mφs residentes F480^{high} (0 dpi). Debido a que estos Mos Ly6C^{high} son los precursores

de CDs $CD11b^+$, estas evidencias podrían explicar la alta expresión de los receptores de MIF en CDs $CD11b^+$. Sin embargo, MIF comparte estos receptores con otras quimiocinas que inducen el reclutamiento de monocitos en el sitio de infección [65, 89] por lo que es necesario investigar si la presencia de estos receptores favorece la activación de los monocitos con el estímulo de MIF.

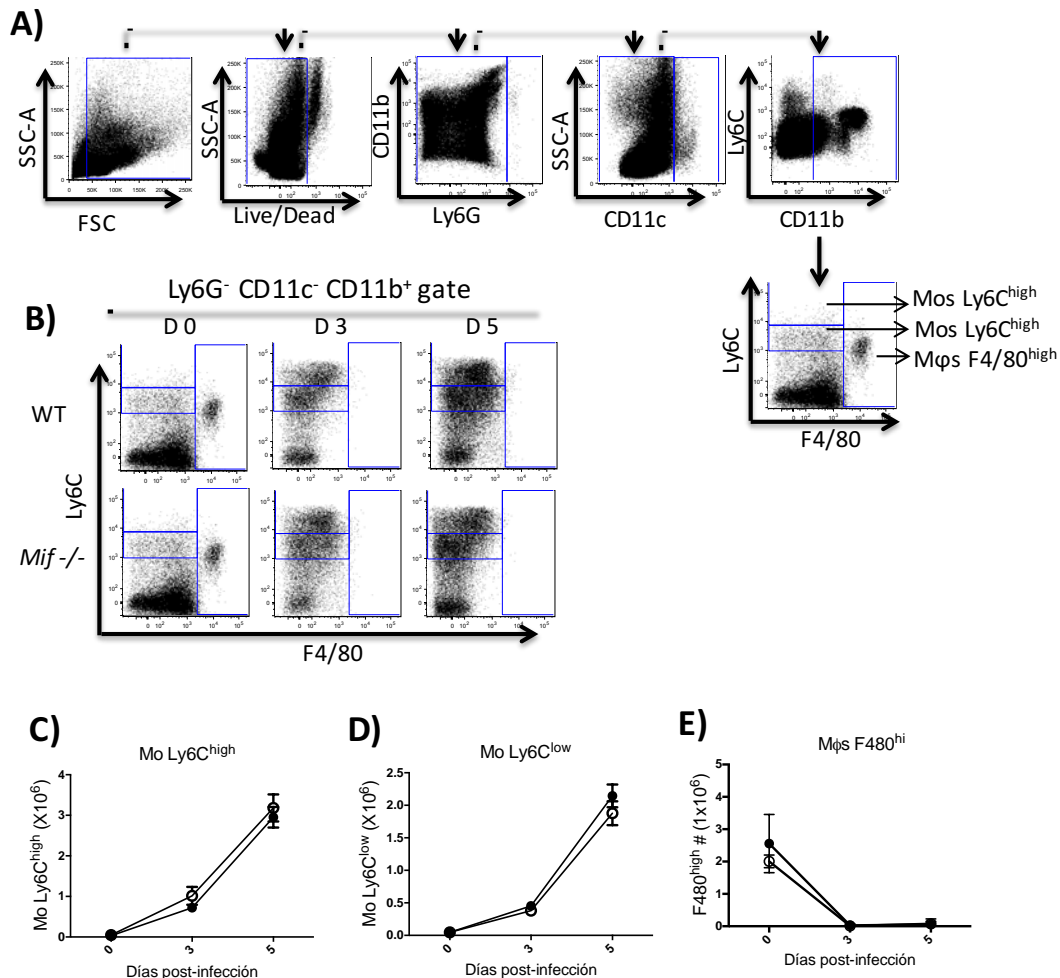


Fig.- 17 Las poblaciones de $M\phi s\ F4/80^{high}$ y $Mos\ (Ly6C^{high}\ y\ Ly6C^{low})$ de la cavidad peritoneal de ratones WT (○) y *Mif*^{-/-} (●), fueron analizadas a los tiempos 0, 3 y 5 dpi con *T. gondii* por medio de la técnica de citometría de flujo. (A) Estrategia de selección de las poblaciones de $M\phi s\ F4/80^{high}$ y $Mos\ (Ly6C^{high}\ y\ Ly6C^{low})$. (B) Dotplots representativos de la cinética de las poblaciones de $M\phi s$ y Mos durante la infección aguda con *T. gondii*. (C) Números absolutos de monocitos $Ly6C^{high}$, (D) $Ly6C^{low}$ y (E) $M\phi s\ F4/80^{high}$ en el curso de la infección. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media \pm SE *p< 0.05 prueba "t" student.

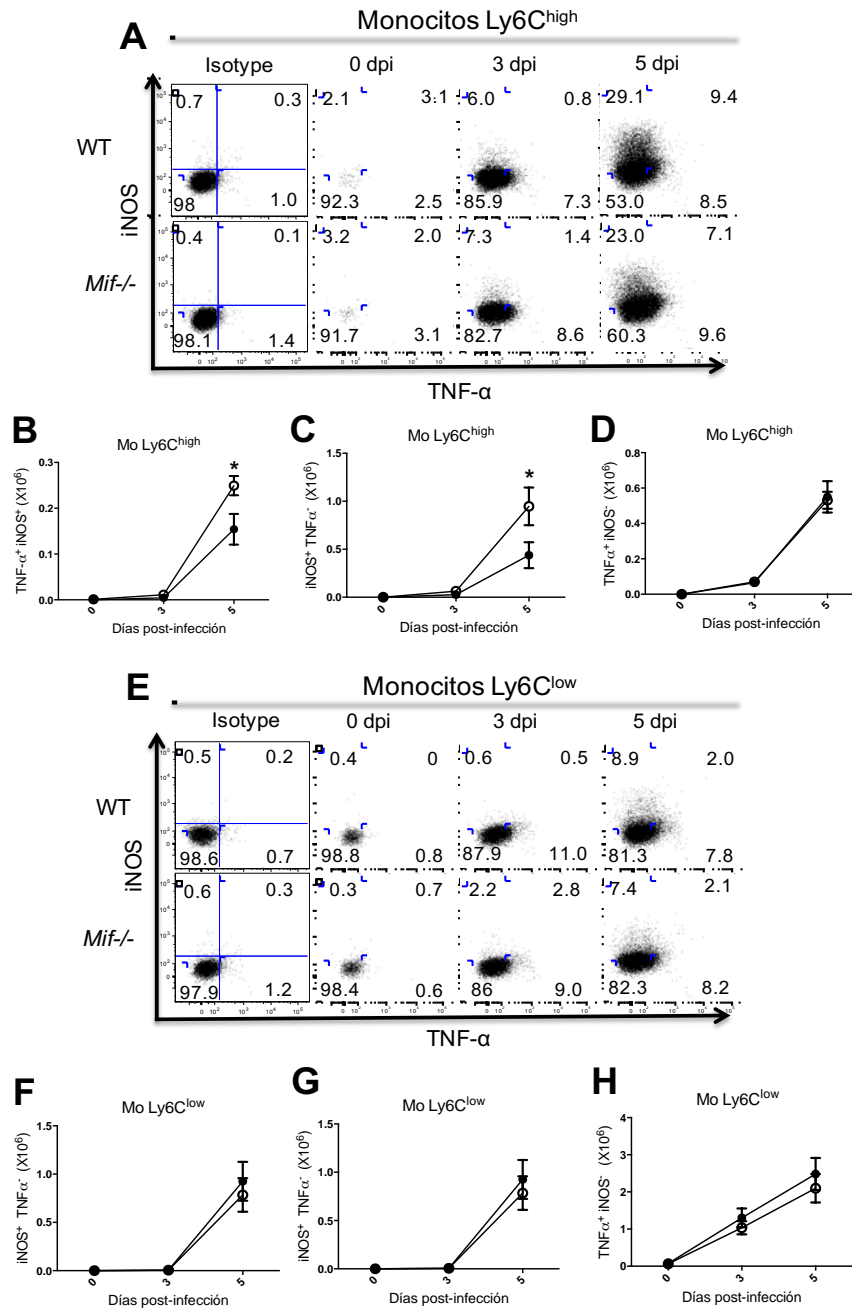


Fig.- 18 Monocitos (Ly6C^{high} y Ly6C^{low}) de ratones WT (○) y Mif^{-/-} (●) infectados con *T. gondii* fueron analizados a los tiempos 0, 3 y 5 dpi con *T. gondii*. (A) Dotplots representativos de Mos Ly6C^{high} productores de iNOS/TNF- α . (B) Cinética de los números absolutos de Mos Ly6C^{high} iNOS⁺ TNF- α ⁺, (C) iNOS⁺ TNF- α ⁻ y (D) iNOS⁻ TNF- α ⁺. (E) Dotplots representativos de Mos Ly6C^{low} productores de iNOS/TNF- α . (F) Cinética de los números absolutos de Mos Ly6C^{low} iNOS⁺ TNF- α ⁺, (G) iNOS⁺ TNF- α ⁻ y (H) iNOS⁻ TNF- α ⁺. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media \pm SE *p< 0.05 prueba “t” student.

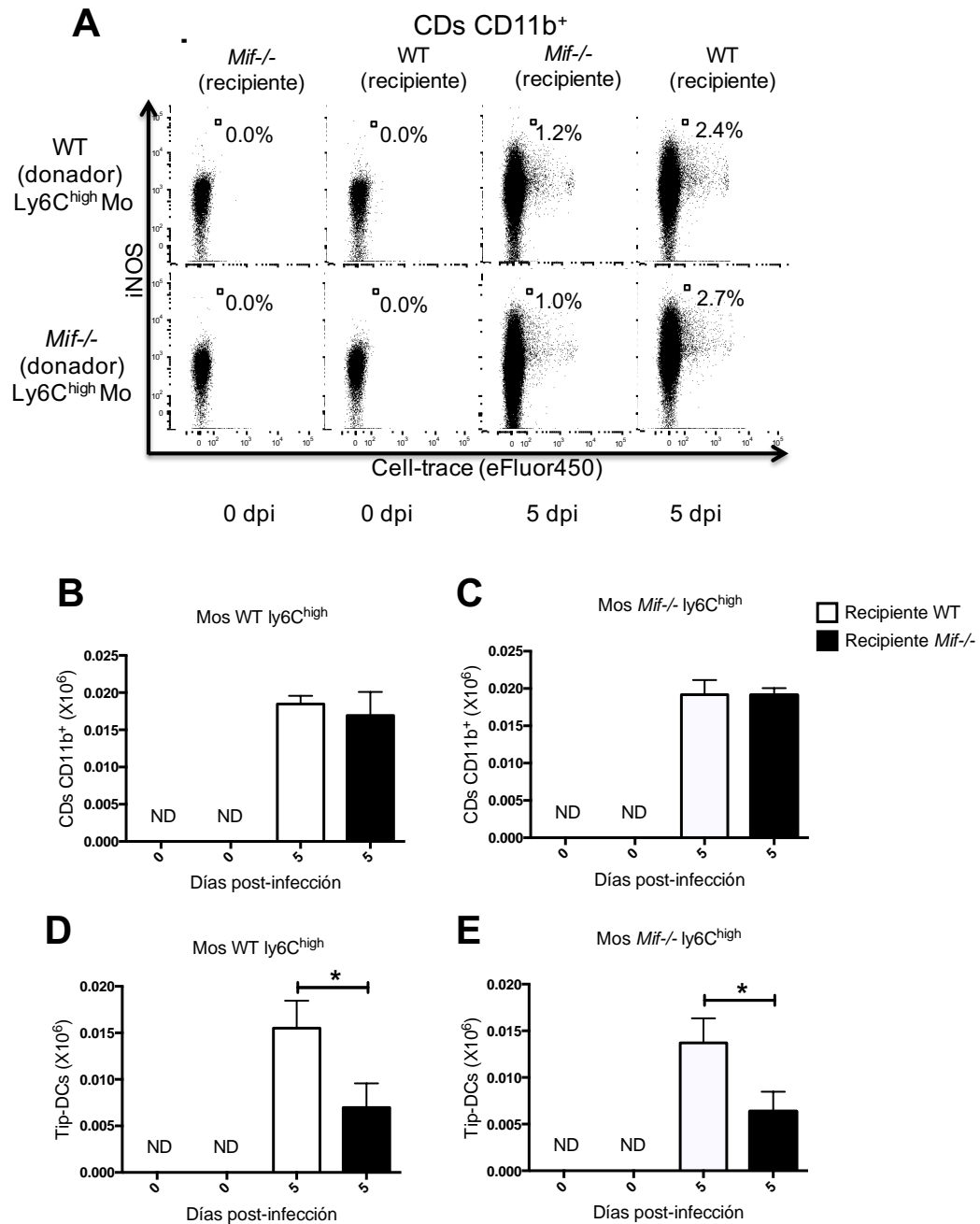


Fig.- 19 Mos Ly6C^{high} de ratones WT o *Mif*^{-/-} (donadores) fueron transferidos a ratones WT o *Mif*^{-/-} (recipientes) infectados con *T. gondii* y cosechados de la cavidad peritoneal a 5 dpi para su análisis por citometría de flujo. (A) Dot plots representativos de la población de CDs CD11b⁺ de ratones recipientes WT o *Mif*^{-/-} a 0 y 5 dpi con *T. gondii*. (B) Número absoluto de CDs CD11b⁺ derivadas de Mos WT transferidos (Cell-trace+). (C) Número absoluto de CDs CD11b⁺ derivadas de Mos *Mif*^{-/-} transferidos (Cell-trace+). (D) Número absoluto de TipDCs derivadas de Mos WT transferidos (Cell-trace+). (E) Número absoluto de TipDCs derivadas de Mos *Mif*^{-/-} transferidos (Cell-trace+). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media \pm SE *p< 0.05, **P< 0.01 prueba "t" student.

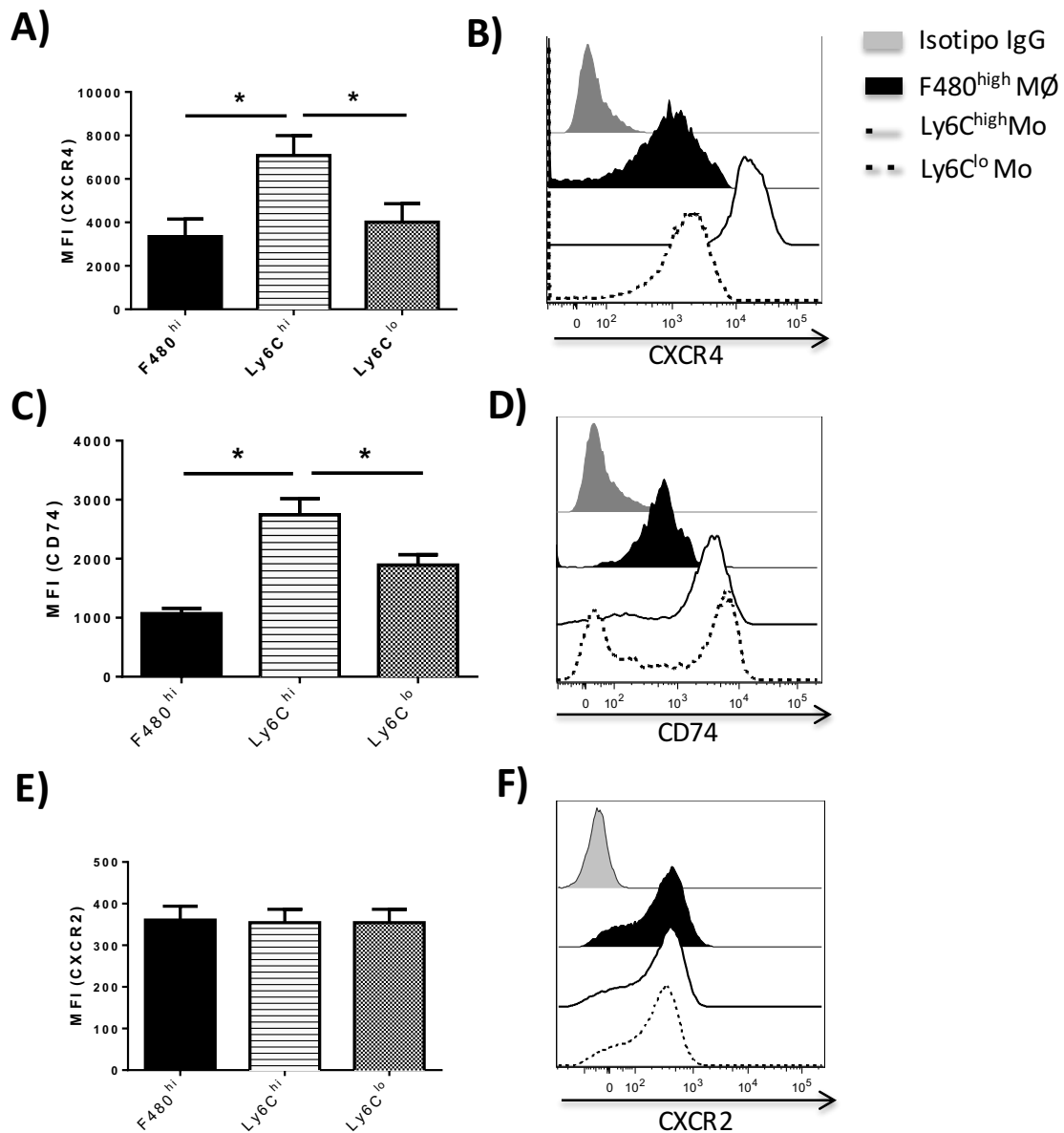


Fig.- 20 Análisis de la expresión de los receptores CXCR4, CD74 y CXCR2 en M ϕ s F480^{high} (0 dpi) y Mos Ly6C^{high} y Ly6C^{low} (5 dpi) de la cavidad peritoneal de ratones WT. (A) Gráfico de barras del IFM de los receptores CXCR4, (C) CD74 y (E) CXCR2 de M ϕ s residentes F480^{high} a 0 dpi y monocitos (Ly6C^{high} y Ly6C^{low}) de ratones WT infectados a 5 dpi. (B) Histogramas representativos del MFI de CXCR4, (D) CD74 y (F) CXCR2 de M ϕ s residentes F480^{high} a 0 dpi y monocitos (Ly6C^{high} y Ly6C^{low}) de ratones WT infectados a 5 dpi. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media \pm SE *p< 0.05 prueba "t" student.

6.7. La administración de rMIF restablece la resistencia de los ratones *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii*

Los resultados obtenidos hasta ahora indican que MIF es importante para la inducir la producción de IFN- γ en los niveles requeridos para la activación y diferenciación de los monocitos inflamatorios hacia TipCDs. Estos datos fueron confirmados mediante la administración diaria (1-5 días) de rMIF (0.5 μ g) a ratones *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii*. La figura 21 demuestra que la administración de rMIF reconstituyó los niveles de IFN- γ en suero (Fig. 21A) y el número de TipCDs (Fig. 21B) en peritoneo. Además, la administración de rMIF reestableció la resistencia a la infección con *T. gondii* en ratones *Mif*^{-/-}, los cuales alcanzaron 100% de supervivencia, mientras que ratones infectados *Mif*^{-/-} tratados con PBS presentaron una supervivencia del 40% (Fig. 21C). El efecto protector del rMIF en ratones *Mif*^{-/-}, estuvo asociado con una reducción en el número de quistes en cerebro (Fig. 21D). Estas evidencias indican que los niveles de MIF inducidos durante la infección aguda con *T. gondii*, tienen un papel crucial en la resistencia y el desarrollo de la respuesta inmune celular hacia el parásito.

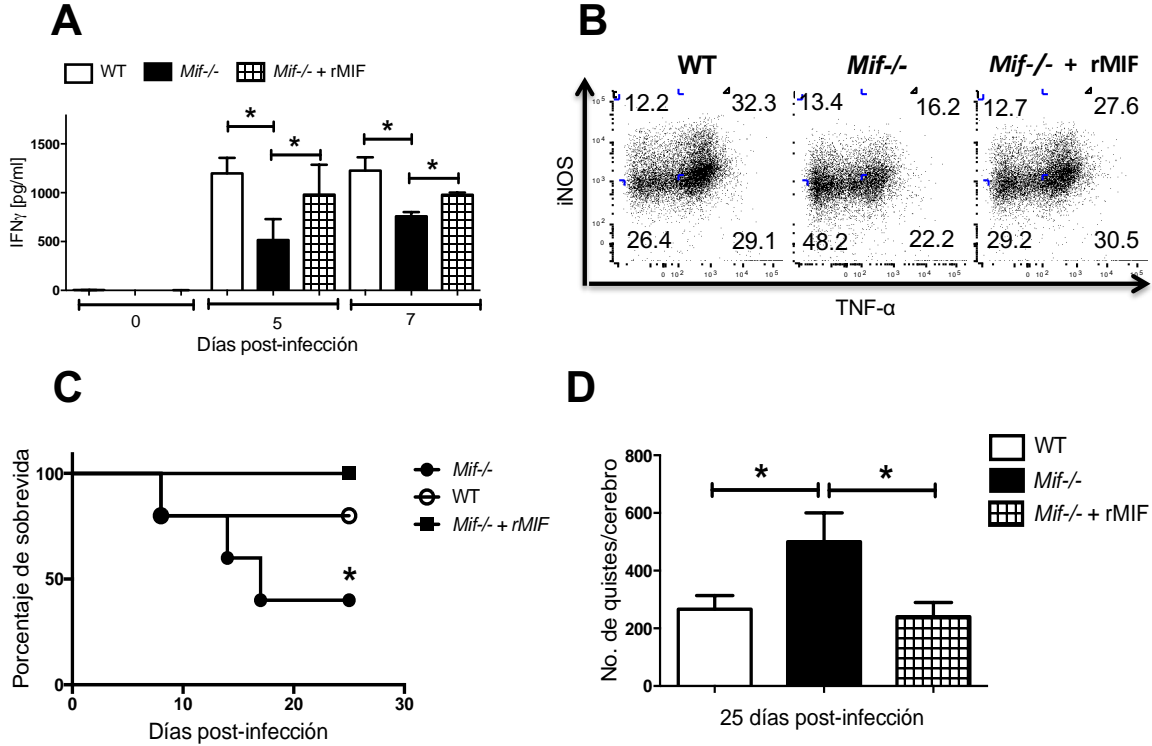


Fig.- 21 Ratones *Mif*^{-/-} que recibieron diariamente 0.5 µg de rMIF en el curso de la infección aguda (1-5 dpi) con *T. gondii*, fueron comparados con ratones infectados WT y *Mif*^{-/-} tratados con PBS diariamente (5 dpi). (A) Niveles de IFN-γ en suero de ratones infectados a 0, 5 y 7 dpi. (B) Dot plots representativos de TipCDs en el sitio de infección (cavidad peritoneal) a los 5 dpi. (C) Supervivencia de ratones infectados con *T. gondii*. (D) Número de quistes en cerebro de ratones infectados a 25 dpi. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=3 animales en cada tiempo de infección) y mostrados como la media ± SE *p< 0.05 prueba “t” de student o log Rank test en el caso de la gráfica de supervivencia.

7. DISCUSIÓN

La toxoplasmosis es una de las enfermedades oportunistas más comunes y potencialmente fatales en pacientes inmuno-comprometidos, quienes presentan una deficiente respuesta inmune celular para el control de la replicación y eliminación del parásito *T. gondii* [3]. Actualmente los fármacos empleados para el control de la toxoplasmosis (sulfadiazina y pirimetamina) eliminan eficientemente la fase de taquizoito del parásito, pero no remueven la fase enquistada del mismo (bradizoitos) [5], por lo que es necesario investigar los mecanismos de la respuesta inmune protectora hacia la infección con *T. gondii*.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que MIF favorece la resistencia a la infección *in vivo* con *T. gondii*, a través de inducir la producción de citocinas inflamatorias en suero como IL-12 e IFN- γ , las cuales son citocinas esenciales para el control de la infección aguda y crónica del parásito [51]. Además, MIF participa en la maduración de células CD11c⁺ induciendo en esta población la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) y la producción de IL-12 durante la infección aguda con el parásito [52]. Estas referencias sugieren que MIF favorece la respuesta inmune celular hacia *T. gondii*, a través de inducir la maduración de CDs en el curso de la infección con el parásito. Sin embargo, diferentes subpoblaciones de CDs así como de macrófagos, son capaces de expresar la integrina de membrana CD11c [55, 56], por lo que en este proyecto se evaluó el papel de MIF en la maduración de las subpoblaciones de CDs CD8 α ⁺ y CD11b⁺, caracterizadas previamente como esenciales para la resistencia a la toxoplasmosis experimental [15, 16] [20].

Los resultados obtenidos en este proyecto demostraron que los niveles de MIF se incrementaron en suero de ratones WT desde el primer día de infección con *T. gondii*, alcanzando un pico máximo a los 3 y 5 dpi, y disminuyendo eventualmente a niveles basales a los 7 dpi (Fig. 9A). Como era de esperarse, no se detectaron niveles de MIF en suero de ratones *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii* (Fig. 9A). Acorde con estudios previos realizados en nuestro laboratorio [51], los niveles de otras citocinas inflamatorias en suero (IL-12, IFN- γ , IL-6 y TNF- α) se vieron disminuidos en ausencia de MIF (Fig. 5 B-F). Estas evidencias indican que el incremento temprano de los niveles de MIF en suero, promueve la respuesta inmune inflamatoria en la fase aguda de la infección con *T. gondii*.

Las subpoblaciones de CDs CD8 α ⁺ y CD11b⁺, tienen un papel crucial en el reconocimiento del parásito intracelular *T. gondii* por medio de los TLRs (11 y 12) y el receptor de quimiocinas CCR5 [17, 18]. El reconocimiento de antígenos de *T. gondii*, en conjunto con el estímulo inducido por citocinas inflamatorias como el IFN- γ , promueve en estas subpoblaciones de CDs un proceso de maduración caracterizado por la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y la producción IL-12p70 [16, 90] [20]. Las CDs maduras son capaces de inducir la activación de los linfocitos T hacia un perfil de tipo Th1, lo que lleva a la producción de niveles sistémicos de IFN- γ , requeridos para la activación de los mecanismos microbicidas hacia *T. gondii* [91-95].

Nuestros resultados demuestran que los ratones WT y *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii* presentaron números similares de CDs CD11b⁺ y CD8 α ⁺ en el sitio de infección (Fig. 10B y 10C), lo que indica que MIF no participa en el reclutamiento

de estas subpoblaciones de CD8 α ⁺ durante la infección aguda con el parásito. No obstante, las CD8 α ⁺ de ratones *Mif*^{-/-} infectados presentaron una maduración deficiente caracterizada por una menor producción de IL-12p70 intracelular (Fig. 10D) y una menor expresión de la molécula co-estimuladora CD86 (Fig. 11A y 11B), comparado con CD8 α ⁺ de ratones WT infectados. No se observaron diferencias significativas en CD8 α ⁺ (Fig. 10E y 11C). Estos resultados sugieren que MIF participa en el desarrollo de la respuesta inmune innata hacia *T. gondii*, promoviendo la maduración de CD8 α ⁺ esenciales para la resistencia a la infección. Adicionalmente, las CD8 α ⁺ presentaron una mayor expresión de los receptores de MIF (CXCR2, CXCR4 y CD74) comparado con CD8 α ⁺ (Fig. 13A-D). Lo que sugiere que las CD8 α ⁺ son más sensibles al estímulo de MIF comparado con CD8 α ⁺.

Para determinar la participación de MIF en la maduración de las CD8 α ⁺ *in vitro*, se trataron CD8 α ⁺ derivadas de médula ósea de ratones WT y *Mif*^{-/-}, por 24 h con diferentes estímulos (rMIF, LPS, STAg, PMA + Ionomicina). Se observó que el estímulo con rMIF no induce de forma directa la maduración de estas CD8 α ⁺, caracterizada por la expresión de CD86 y la producción de IL-12 (Anexo 1, Fig. 22B y 23A). Además, al ser estimuladas con STAg o STAg + MIF, las CD8 α ⁺ de ratones *Mif*^{-/-} presentaron un estado de maduración similar al de CD8 α ⁺ de ratones WT (Anexo 1, Fig. 22B y 23A), lo que indica que en CD8 α ⁺ estimuladas *in vitro* con antígenos de *T. gondii*, la presencia de MIF no tiene un papel importante para la maduración de las mismas. Resultados similares fueron encontrados con el tratamiento con PMA + Ionomicina (Anexo 1, Fig. 22B y

23A). Por el contrario, el estímulo con LPS indujo una mayor expresión y producción de CD86 e IL-12p70, respectivamente, en CDs CD11b⁺ WT comparado con CDs CD11b⁺ *Mif*^{-/-}. Estos resultados fueron confirmados analizando la vía de la MAPK p-38, una de las vías más importantes para la maduración de CDs en la infección con *T. gondii* [96], donde se observó que el estímulo con rMIF no induce la activación de p38 en CDs CD11b⁺ (Anexo 1, Fig. 23C y 23E). Mientras tanto, el tratamiento con LPS, PMA + Ionomicina y STAg, indujo un incremento en la fosforilación de la MAPK p-38 en CDs CD11b⁺. Sin embargo, solo se observaron diferencias significativas entre CDs WT y *Mif*^{-/-} al ser estimuladas con LPS (Anexo 1, Fig. 23C y 23E). Estos resultados fueron corroborados por la técnica de western blot (Anexo 1, Fig. 24). Estas evidencias indican que debido a que MIF es capaz de regular la expresión del TLR4 [36], las CDs de ratones *Mif*^{-/-} responden en menor medida al estímulo con LPS comparado con CDs WT. Sin embargo, debido a que el STAg es reconocido principalmente por los TLRs 11 y 12 [17, 18] y el PMA + Ionomicina inducen vías dependientes de PKC [97] y liberación de calcio intracelular [98], respectivamente, estos estímulos inducen la maduración de CDs CD11b⁺ en una vía independiente de MIF. En resumen, los estudios preliminares *in vitro*, sugieren que MIF no induce directamente la maduración de CDs CD11b⁺ ante el estímulo con el STAg y probablemente en la infección con *T. gondii*. Estos resultados complementan los datos publicados recientemente en nuestro artículo [99], donde se sugiere que MIF podría actuar de manera directa al ser reconocido por sus receptores o de manera indirecta a través de inducir el reclutamiento de linfocitos NK para promover la maduración de CDs CD11b⁺.

MIF presenta un efecto pleiotrópico en diferentes modelos de inflamación e infección [41, 42] [43, 44] [45] [50]. Esta propiedad sugiere que MIF es capaz de inducir la maduración de CD^s directamente al ser reconocido por sus receptores o indirectamente induciendo mecanismos importantes para la activación de las CD^s.

Estudios hechos por Goldszmid *et al*, han señalado que la maduración de las CD^s CD11b⁺ durante la infección aguda con *T. gondii*, depende principalmente del estímulo con IFN- γ producido por los linfocitos NK, en contraste con CD^s CD8 α ⁺ cuyo proceso de maduración es dependiente principalmente de la señalización inducida por los TLRs [20].

Para determinar la participación de MIF en la producción de IFN- γ de células NK o el reclutamiento de esta población de linfocitos, en este proyecto se determinó la producción de IFN- γ intracelular de células NK de ratones WT y *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii*. Los ratones *Mif*^{-/-} infectados presentaron un menor número de linfocitos NK (CD3⁻ CD49⁺) productores de IFN- γ , comparado con linfocitos NK provenientes de ratones WT infectados (Fig. 17 B). Esta reducción en el número de linfocitos NK IFN- γ ⁺ de ratones *Mif*^{-/-} infectados estuvo asociada a un menor número de linfocitos NK totales en peritoneo (Fig. 17C y 17D), lo que indica que MIF promueve el reclutamiento de linfocitos NK en el sitio de infección con *T. gondii*. En relación a esto, estudios realizados por Hsieh C. Y. *et al* han demostrado que MIF favorece la respuesta inflamatoria de tipo Th1 en el modelo murino de psoriasis, a través de inducir el reclutamiento de linfocitos NKT productores de IFN- γ [69]. Estas evidencias sugieren que en la respuesta inmune hacia *T. gondii*, MIF promueve de manera indirecta la maduración de CD^s

CD11b⁺, a través de promover el reclutamiento temprano de linfocitos NKs productores de IFN- γ en el sitio de infección.

El mecanismo por el cual MIF induce la migración de linfocitos NK en el sitio de infección con *T. gondii*, será determinado en futuros proyectos de investigación. Sin embargo, se ha demostrado que MIF promueve la migración de linfocitos NKT a través de los receptores CD74 y CXCR2, lo sugiere que MIF podría utilizar este mecanismo para inducir el reclutamiento de NKs en la toxoplasmosis experimental.

Las Infecciones parasitarias y microbianas con *Trypanosoma brucei* [72, 73] y *Listeria monocytogenes* [70], respectivamente, inducen CDs CD11b⁺ productoras de iNOS y TNF- α (TipCDs) [70-73]. La generación de estas TipCDs depende principalmente del IFN- γ producido por linfocitos NK, el cual promueve la activación y conversión de los monocitos inflamatorios hacia TipCDs [72, 73]. Aunque estudios previos han demostrado que en la infección con *T. gondii* las CDs CD11b⁺ IL-12⁺ son dependientes del IFN- γ producido por linfocitos NKs [20], no se ha demostrado si estas CDs son capaces de producir iNOS y TNF- α , los cuales son factores importantes para el control y eliminación de *T. gondii*. Además, debido a que MIF participa en el reclutamiento de linfocitos NK productores de IFN- γ en la infección aguda con el parásito, MIF podría regular indirectamente la activación y conversión de los monocitos inflamatorios hacia TipCDs a través de este mecanismo, por lo que en este proyecto se estudió la presencia de TipCDs en ratones WT y *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii*. Los resultados demostraron que en el curso de la infección aguda, una población de TipCDs se incrementó

gradualmente tanto en ratones WT como *Mif*^{-/-} (Fig. 18A). Sin embargo, los ratones *Mif*^{-/-} infectados presentaron un menor número de TipCDs comparado con ratones WT infectados (Fig. 18B).

Es importante mencionar que aunque el término TipCDs se ha aceptado ampliamente en la literatura para referirse a CDs CD11b⁺ productoras de iNOS y TNF- α , algunos reportes han argumentado que dicho término no define necesariamente a una subpoblación distintiva de CDs, sino a CDs que responden a su microambiente produciendo iNOS y TNF- α , es decir a un estado particular de maduración [71]. Por lo tanto, debido a que el número total de CDs CD11b⁺ no se vio alterado en ausencia de MIF (Fig. 10B), pero un menor número de TipCDs fue observado en ratones *Mif*^{-/-} infectados (Fig. 15B), estos datos sugieren que MIF promueve la producción de iNOS y TNF- α en CDs CD11b⁺ y por lo tanto su maduración hacia TipCDs, probablemente a través del reclutamiento de linfocitos NK productores de IFN- γ en la respuesta inmune hacia *T. gondii*. El número disminuido de TipCDs en ratones *Mif*^{-/-} infectados estuvo asociado a un mayor número de taquizoitos de *T. gondii* en la cavidad peritoneal (Fig. 16), lo que indica un menor control de la infección en ratones *Mif*^{-/-} comparado con ratones WT.

Por otra parte, la subpoblación de CDs CD8 α ⁺ presentó un incremento en su producción de TNF- α mas no de INOS, durante la infección aguda con *T. gondii* (Fig. 15E-H), lo que indica que únicamente las CDs CD11b⁺ son capaces de madurar hacia TipDCs durante la toxoplasmosis aguda, probablemente debido a su origen monocítico como se ha demostrado anteriormente [20]. No se

observaron diferencias en la producción de TNF- α de CD8 α^+ entre ratones infectados WT y *Mif*^{-/-} (Fig. 15E-H).

Las poblaciones de monocitos inflamatorios tienen un papel importante en el control de la infección con *T. gondii* [83-87], y son los principales precursores de TipDCs en infecciones parasitarias [70, 73], por lo que en este proyecto se evaluó el papel de MIF en la activación y conversión de los monocitos inflamatorios hacia TipDCs durante la infección aguda con *T. gondii*. Los resultados demostraron que las subpoblaciones de monocitos Ly6C^{high} y Ly6C^{low}, son reclutadas en la cavidad peritoneal de ratones infectados de manera independiente de MIF (Fig. 17B-D). Sin embargo, la subpoblación de monocitos Ly6C^{high} de ratones *Mif*^{-/-} infectados presentó una menor producción de iNOS y TNF- α (marcadores de activación clásica y factores importantes para la eliminación de *T. gondii*) comparado con monocitos Ly6C^{high} de ratones WT infectados (Fig. 18B y 18C). Así mismo, la transferencia adoptiva *v.i.* de monocitos Ly6C^{high} WT o *Mif*^{-/-} (donadores) en ratones infectados WT o *Mif*^{-/-} (recipientes) demostró que los monocitos provenientes de ratones *Mif*^{-/-} presentan un habilidad similar a la de monocitos de ratones WT para diferenciarse hacia CD11b⁺ (CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺) o TipCDs (CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺ iNOS⁺) al ser transferidos a ratones WT infectados con *T. gondii* (Fig. 19A y 19B). Estos resultados indican que la presencia de MIF en los monocitos Ly6C^{high} no es requerida para su diferenciación hacia CD11b⁺ o TipCDs. Sin embargo, tanto monocitos WT como *Mif*^{-/-}, presentaron una menor capacidad para convertirse en TipCDs al ser transferidos a ratones *Mif*^{-/-} infectados (Fig. 19D y 19E). No se observaron diferencias

significativas en la habilidad de estos monocitos para diferenciarse hacia CDs CD11b⁺ en ratones *Mif*^{-/-} infectados (Fig. 19B y 19C). Estos resultados indican que los niveles sistémicos de MIF, son biológicamente más importantes para la conversión de los monocitos Ly6C^{high} hacia TipCDs, que los niveles de MIF producidos/liberados por la población de monocitos.

Finalmente, para corroborar el papel de MIF en la respuesta inmune inflamatoria hacia *T. gondii*, se administró rMIF en ratones *Mif*^{-/-} infectados, los cuales se compararon con ratones *Mif*^{-/-} o WT infectados que recibieron PBS. La figura 21 demuestra que la administración de rMIF restableció los niveles en suero de IFN- γ (Fig. 21A), el número de TipCDs en peritoneo (Fig. 21B) y la resistencia a la infección con *T. gondii* en ratones *Mif*^{-/-} (Fig. 21C). Además, el grupo de ratones infectados *Mif*^{-/-} tratados con rMIF, presentó un menor número de quistes en cerebro en comparación con ratones infectados *Mif*^{-/-} que recibieron PBS (Fig. 21D). Estos datos indican que el tratamiento con rMIF favorece el desarrollo de la respuesta inmune celular y consecuentemente el control de la infección por *T. gondii*.

8. CONCLUSIONES

- Los niveles de MIF se incrementan en suero desde el primer día de infección con el parásito *T. gondii*.
- MIF no participa en el reclutamiento de las subpoblaciones de CDs CD11b⁺ y CD8 α ⁺ en el sitio de infección con *T. gondii*.

- MIF promueve la maduración de CD^s CD11b⁺ en el curso de la infección aguda con *T. gondii*.
- Las CD^s CD11b⁺ presentan una mayor expresión de los receptores de MIF comparado con CD^s CD8α⁺, durante la infección aguda con *T. gondii*.
- MIF no induce directamente la maduración en CD^s CD11b⁺ derivadas de médula ósea (*in vitro*).
- Las CD^s CD11b⁺ mas no CD8α⁺, son capaces de madurar hacia TipCD^s durante la toxoplasmosis experimental.
- MIF promueve el reclutamiento temprano de linfocitos NKs productores de IFN-γ en la infección aguda con *T. gondii*.
- MIF participa en la inducción de TipCD^s en la fase aguda de la toxoplasmosis experimental.
- Los ratones *Mif*^{-/-} infectados con *T. gondii*, presentan un control deficiente de la infección comparado con ratones WT infectados.
- Las subpoblaciones de monocitos Ly6C^{high} y Ly6C^{low}, son reclutadas en la cavidad peritoneal de ratones infectados de manera independiente de MIF.
- MIF promueve la polarización de los monocitos Ly6C^{high} más no de los Ly6C^{low}, hacia un perfil de tipo M1 y su conversión hacia TipCD^s.
- La presencia de MIF en los monocitos Ly6C^{high} no es requerida para su conversión hacia TipCD^s.

- Los niveles sistémicos de MIF son más importantes para la conversión de los monocitos Ly6C^{high} hacia TipCDs, que el MIF liberado/producido por la población de monocitos durante la infección aguda con *T. gondii*.
- La administración de rMIF en el sitio de infección con *T. gondii* restablece los niveles en suero de IFN- γ , el número de TipCDs en peritoneo y la resistencia a la infección en ratones *Mif*^{-/-}.

9. Anexo 1 - Resultados complementarios no publicados

9.1. Determinación de la vía de activación inducida por MIF, para la maduración de CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea

Para determinar el mecanismo por el cual MIF promueve la maduración de las CDs CD11b⁺ durante la infección con *T. gondii*, se determinó la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 y los niveles de IL-12p70 en sobrenadantes de cultivos de CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea, estimuladas *in vitro* por 24 h con los diferentes estímulos rMIF, LPS, PMA + ionomicina o antígeno soluble de *T. gondii* (STAg).

Los resultados demostraron que las CDs CD11b⁺ de ratones WT o *Mif*^{-/-} estimuladas con rMIF presentaron niveles de expresión de CD86 similares al de CDs CD11b⁺ en condiciones basales, no estimuladas (Fig. 22B y D).

Cuando las CDs CD11b⁺ WT o *Mif*^{-/-} fueron estimuladas con PMA + ionomicina o STAg, presentaron una mayor expresión de CD86 comparado con CDs CD11b⁺ basales, sin estímulo ($p < 0.05$, Fig. 22B y D), pero no se observaron diferencias

entre los grupos WT y *Mif*^{-/-}. Esto sugirió que el estímulo MIF por sí mismo no influye de manera directa en la expresión de CD86 en las CDs CD11b⁺.

El estímulo con LPS de las CDs CD11b⁺ WT favoreció significativamente la expresión de CD86 comparadas con las CDs CD11b⁺ de ratones *Mif*^{-/-} ($P = 0.0269$; Fig. 22B y D). Esto acorde con la observación de que MIF regula la expresión positiva del receptor para LPS, el TLR4 [36]. En ausencia de MIF este receptor estaría subexpresado y las células responderían con menor intensidad al estímulo del LPS. Esto no se observó con los estímulos de PMA + Ionomicina o STAg debido a que estos estímulos utilizan vías independientes a la de TLR4 para inducir la activación celular [17, 18, 98] [97].

Estudios previos han demostrado que los principales patrones de reconocimiento hacia *T. gondii* o el STAg son los TLRs 11 y 12 [17, 100], por lo que el papel de MIF induciendo la expresión del TLR4 podría estar limitado o no influir significativamente para promover la maduración de CDs CD11b⁺ estimuladas con STAg.

La posibilidad de que MIF presente un efecto sinérgico con el STAg para inducir la maduración de las CDs fue explorada cuando CDs CD11b⁺ *Mif*^{-/-} fueron estimuladas *in vitro* con rMIF+STAg. Los resultados demostraron que CDs *Mif*^{-/-} estimuladas *in vitro* con rMIF+STAg presentaron una expresión similar de CD86 a la de CDs *Mif*^{-/-} o WT estimuladas con STAg. Estos resultados demostraron que MIF no sinergiza con el estímulo del STAg para inducir la expresión de CD86 en las CDs CD11b⁺.

La expresión de CD86 fue dependiente de la vía de la MAPK p38, ya que al adicionarse el inhibidor de esta vía se redujo significativamente la expresión de CD86, con todos los estímulos probados (figura 22C y 22D).

Tendencias similares a la expresión de CD86 fueron observadas en los niveles de IL-12p70 en sobrenadante de CDs CD11b⁺ estimuladas (Fig. 23A).

La producción de IL-12 fue dependiente de la vía de la MAPK p38, cuando se adicionó el inhibidor de ésta vía se redujeron significativamente los niveles de IL12, con todos los estímulos probados (Fig. 23B).

Estos resultados fueron confirmados evaluando la activación (fosforilación) de la MAPK p38 a través de la técnica de fosfo-flow en CDs estimuladas *in vitro* a los 30 m (Fig. 23C-D). En la figura 23C se observa que con los diferentes estímulos, mencionados anteriormente, con excepción del rMIF, se indujo la activación de la MAPK p38 en las CDs CD11b⁺. Adicionalmente, solo se observaron diferencias significativas en la fosforilación de p38 entre CDs WT y *Mif*^{-/-} estimuladas con LPS ($P = 0.038$).

La activación de la vía de señalización de la MAPK p38, fue corroborada por la técnica de Westernblot. La figura 24 demuestra que el estímulo con STAg induce la expresión de MAPK p38, pero no se observaron diferencias significativas en la fosforilación relativa de la MAPK p38 entre CDs CD11b⁺ WT y *Mif*^{-/-} a los 0, 5, 15 (Fig.24A y B) y 30 m (Fig. 24C y D) post-estímulo con STAg.

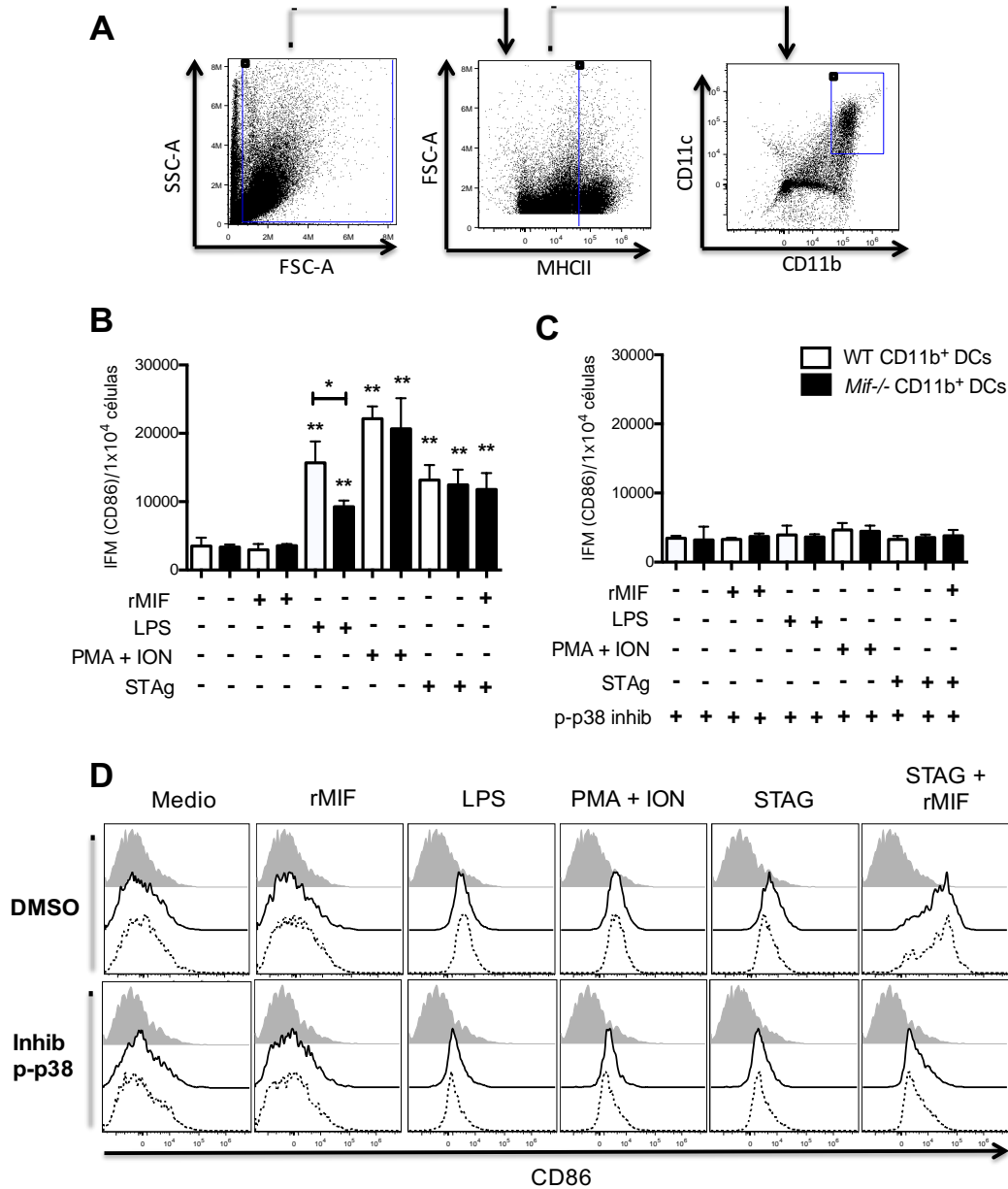


Fig. 22 Análisis de la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea de ratones WT o *Mif*^{-/-} a 24 h de incubación con los estímulos: rMIF (100 ng/ml), LPS (100 ng), STAg (5 µg), PMA (50 ng) mas Ionomicina (1 µg) y STAg (10 µg), pre-tratadas por 2 h con el inhibidor de p-p38 (SB 203580, 10 µM) o DMSO. (A) Estrategia de selección de CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea (MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺) por citometría de flujo. (B) Gráfico de barras representativo de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD86 en CDs CD11b⁺ WT (barras blancas) o *Mif*^{-/-} (barras negras) pre-tratadas con DMSO. (C) Gráfico de barras representativas de la IFM de CD86 en CDs CD11b⁺, pre-tratadas con el inhibidor de p-38. (D) Histogramas representativos de la IFM de CD86 en CDs CD11b⁺ WT (línea sólida) o *Mif*^{-/-} (línea punteada) e isotipo (Histograma gris). Los datos son representativos de 1 experimento (n=3 en cada tiempo de infección) y mostrados como mean ± SE *p< 0.05 prueba "t" de student.

El estímulo con rMIF no incrementó significativamente la fosforilación relativa de p38 en CDs *Mif*^{-/-}, y no se observaron diferencias significativas entre CDs tratadas con STAg y CDs tratadas con STAg + rMIF (Fig. 24E y 24F). La eficiencia del inhibidor de p-38 se puede apreciar en las figuras 24G y 24H. Estos resultados indican que MIF no participa directamente en la maduración *in vitro* de CDs CD11b⁺, caracterizada por la expresión de CD86 y la producción de IL-12p70. Los resultados en la infección *in vivo* sugieren que MIF influye en esta maduración, de manera indirecta a través del reclutamiento de células NKs que puedan influir en la activación de las CDs CD11b⁺ a través de la producción de IFN- γ . Estos resultados fueron de un solo experimento y deberán confirmarse.

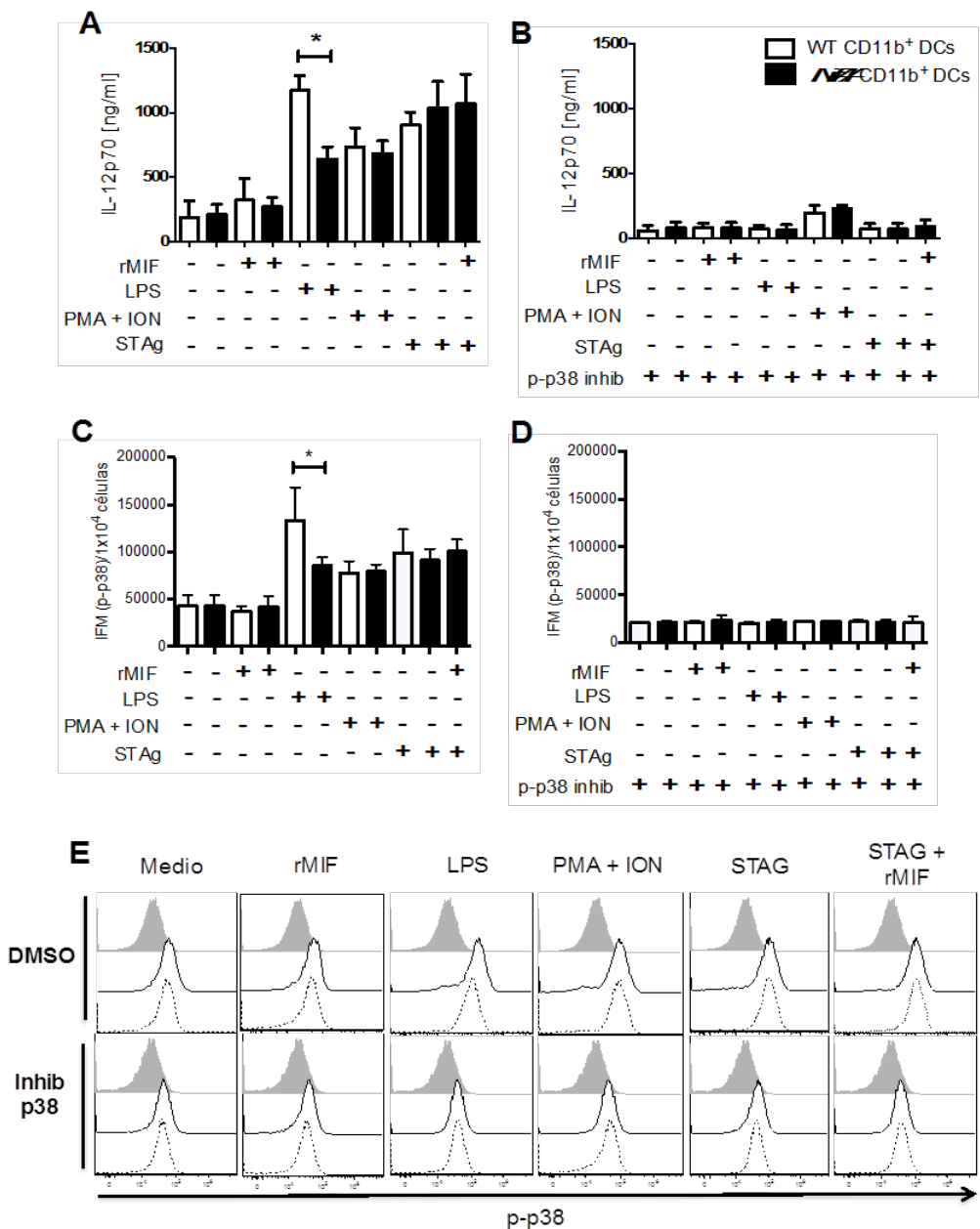


Fig. 23 (A) Gráfico de barras representativo de la concentración de IL-12p70 en sobrenadantes de cultivos de CDs CD11b⁺ (MHCII⁺CD11C⁺CD11b⁺) derivadas de médula ósea de ratones WT (barras blancas) o *Mif*^{-/-} (barras negras), a 24 h de incubación con los estímulos: rMIF (100 ng/ml), LPS (100 ng), STAg (5 μg), PMA (50 ng) e Ionomicina (1 μg), pre-tratadas por 2 h con DMSO o (B) el inhibidor de p38 (SB 203580, 10 μM). (C) Barras representativas de la fosforilación (IFM) de la MAPK p-38 en CDs CD11b⁺ a 30 min de incubación con los estímulos mencionados anteriormente, en ausencia o (D) presencia del inhibidor de p-p38. (E) Histogramas representativos de la fosforilación (IFM) de la MAPK p-38 en CDs CD11b⁺ e isotipo a los 30 min de tratamiento con los estímulos mencionados anteriormente. Los datos son representativos de 1 experimento (n=3 en cada tiempo de infección) y mostrados como mean ± SE *p< 0.05 prueba “t” student.

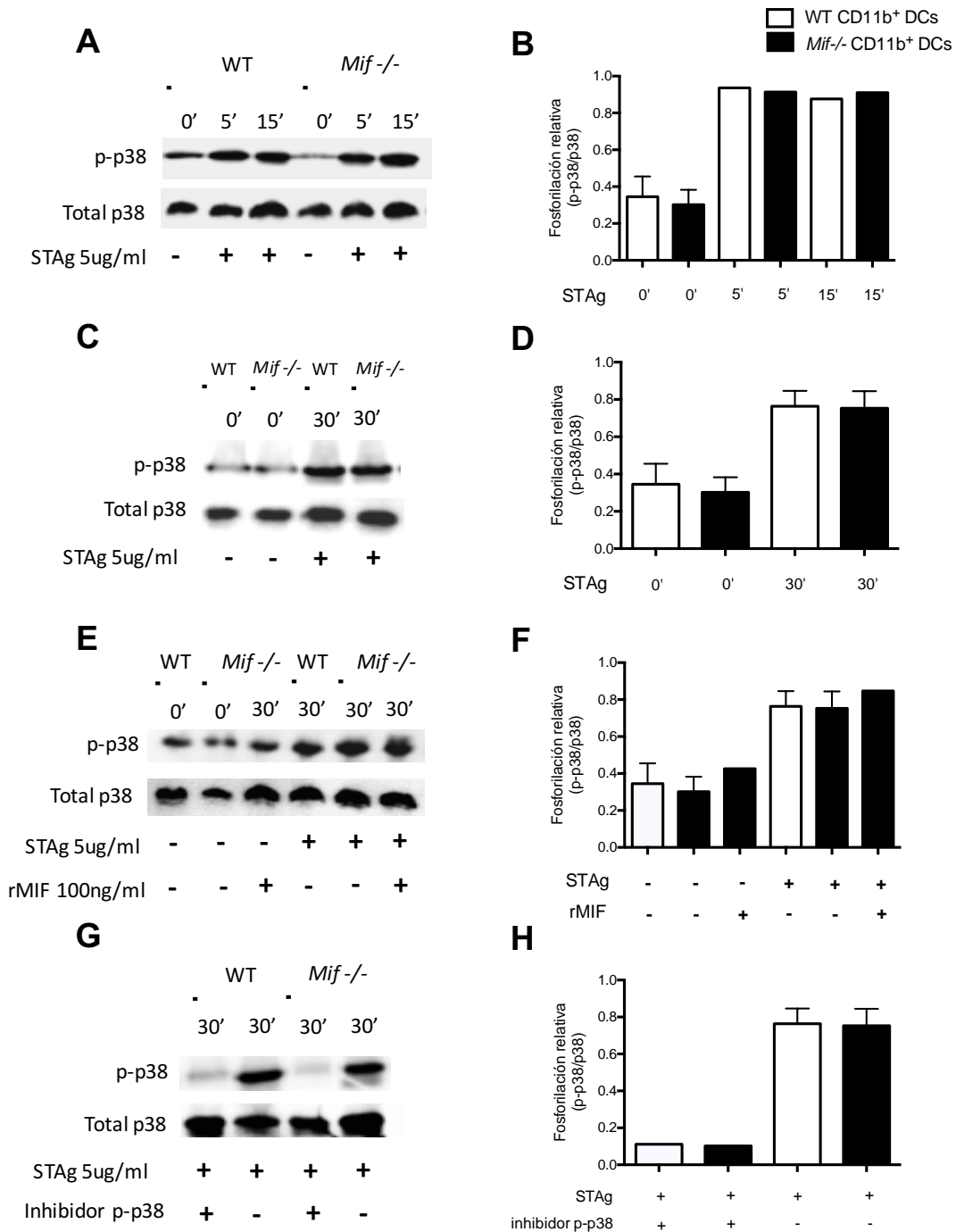


Fig.- 24 (A) Westernblot y (B) gráfico de barras de la fosforilación relativa de la MAPK p38 de de CDs CD11b⁺ derivadas de médula ósea estimuladas a 30 min con STAg (5µg). (C) Westernblot y (D) gráfico de barras de la fosforilación relativa de la MAPK p38 de CDs CD11b⁺ a 0, 5 y 15 min con STAg (5 µg). (E) Westernblot y (F) barras representativas de la fosforilación relativa de la MAPK p38 en CDs CD11b⁺ a 0 y 30 min de estímulo con STAg (5 µg) y/o rMIF (100 ng). (G) Westernblot y (H) gráfico de la fosforilación relativa de la MAPK p38 de CDs CD11b⁺ pre-tratadas con el inhibidor de p38 o DMSO y estimuladas por 30 min con STAg (5 µg). Los datos son representativos de 1 experimentos (n=1-3) y son mostrados como la media ± SE *p<0.05 prueba “t” de student.

10. APÉNDICES

10.1. Apéndice 1

Buffer de lisis (Laird W. P. et al. 1991 Simplified mammalian DNA isolation procedure, Nucleic Acids Research Vol. 19 Num 15, 4293)

200 mM NaCl (J.T Baker)

5 mM de Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA) (J.T Baker)

0.2% Dodecil sulfato de sodio (SDS) (J.T Baker)

100 mM Tris HCl, pH 8.5 (ICN Biomedicals Inc.)

Aforar a 1 Lt con agua destilada

10.2. Apéndice 2

Los primers utilizados para la amplificación del gen de MIF fueron los siguientes:

MIF F-AGA CCA CGT TAG CTG AG. R-GCA TCG CTA CCG GTG GAT AA.

NEO F-ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC. R-CGT CCA GAT CCT GAT C.

La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo
94°C	3 min
94°C	30 seg
58°C	30 seg
72°C	30 seg
72°C	2 min
10°C	10 min

10.3. Apéndice 3

Buffer TBE 10x

Tris base (890mM, Sigma Chemicals)

Ácido Bórico (890mM, J.T Baker)

40 ml de 0.5 M Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA) disódico (J.T Baker)

Se ajusta a pH 8.0 y se afora a 500 ml con agua destilada.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hill, D.E., S. Chirukandoth, and J.P. Dubey, *Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals*. Anim Health Res Rev, 2005. **6**(1): p. 41-61.
2. Pappas, G., N. Roussos, and M.E. Falagas, *Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis*. Int J Parasitol, 2009. **39**(12): p. 1385-94.
3. Luft, B.J. and J.S. Remington, *Toxoplasmic encephalitis in AIDS*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(2): p. 211-22.
4. Holliman, R.E., *Congenital toxoplasmosis: prevention, screening and treatment*. J Hosp Infect, 1995. **30 Suppl**: p. 179-90.
5. Halonen, S.K. and L.M. Weiss, *Toxoplasmosis*. Handb Clin Neurol, 2013. **114**: p. 125-45.
6. Dubey, J.P., D.S. Lindsay, and C.A. Speer, *Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(2): p. 267-99.
7. Montoya, J.G. and O. Liesenfeld, *Toxoplasmosis*. Lancet, 2004. **363**(9425): p. 1965-76.
8. Hill, D.E., et al., *Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of Toxoplasma gondii tissue cysts in pork loin*. J Food Prot, 2004. **67**(10): p. 2230-3.
9. Esch, K.J. and C.A. Petersen, *Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(1): p. 58-85.
10. Black, M.W. and J.C. Boothroyd, *Lytic cycle of Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(3): p. 607-23.
11. Howe, D.K. and L.D. Sibley, *Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease*. J Infect Dis, 1995. **172**(6): p. 1561-6.
12. Sibley, L.D., et al., *Genetic diversity of Toxoplasma gondii in animals and humans*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1530): p. 2749-61.
13. Hunter, C.A. and L.D. Sibley, *Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(11): p. 766-78.
14. Miller, C.M., et al., *The immunobiology of the innate response to Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol, 2009. **39**(1): p. 23-39.
15. John, B., et al., *Dynamic Imaging of CD8(+) T cells and dendritic cells during infection with Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000505.

16. Mashayekhi, M., et al., *CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by Toxoplasma gondii tachyzoites*. *Immunity*, 2011. **35**(2): p. 249-59.
17. Raetz, M., et al., *Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to Toxoplasma gondii profilin*. *J Immunol*, 2013. **191**(9): p. 4818-27.
18. Aliberti, J., et al., *CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(1): p. 83-7.
19. Yarovinsky, F., et al., *TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein*. *Science*, 2005. **308**(5728): p. 1626-9.
20. Goldszmid, R.S., et al., *NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection*. *Immunity*, 2012. **36**(6): p. 1047-59.
21. Baugh, J.A. and R. Bucala, *Macrophage migration inhibitory factor*. *Crit Care Med*, 2002. **30**(1 Suppl): p. S27-35.
22. Calandra, T., et al., *The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor*. *J Exp Med*, 1994. **179**(6): p. 1895-902.
23. Daryadel, A., et al., *Apoptotic neutrophils release macrophage migration inhibitory factor upon stimulation with tumor necrosis factor-alpha*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(37): p. 27653-61.
24. Popa, C., et al., *MIF production by dendritic cells is differentially regulated by Toll-like receptors and increased during rheumatoid arthritis*. *Cytokine*, 2006. **36**(1-2): p. 51-6.
25. Roger, T., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4)*. *J Endotoxin Res*, 2003. **9**(2): p. 119-23.
26. Bacher, M., et al., *Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(1): p. 235-46.
27. Calandra, T., et al., *MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production*. *Nature*, 1995. **377**(6544): p. 68-71.
28. Mitchell, R.A., et al., *Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(25): p. 18100-6.
29. Mitchell, R.A., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 345-50.
30. Bacher, M., et al., *An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(15): p. 7849-54.
31. Donnelly, S.C., et al., *Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome*. *Nat Med*, 1997. **3**(3): p. 320-3.
32. Makita, H., et al., *Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **158**(2): p. 573-9.
33. Bozza, M., et al., *Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis*. *J Exp Med*, 1999. **189**(2): p. 341-6.
34. Bernhagen, J., et al., *Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF)*. *Biochemistry*, 1994. **33**(47): p. 14144-55.
35. Calandra, T. and R. Bucala, *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system*. *Crit Rev Immunol*, 1997. **17**(1): p. 77-88.

36. Roger, T., et al., *MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4*. Nature, 2001. **414**(6866): p. 920-4.
37. Hou, G., et al., *In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor prevents skin graft destruction after indirect allorecognition*. Transplantation, 2001. **72**(12): p. 1890-7.
38. Demir, Y., et al., *Cardiac allograft rejection in the absence of macrophage migration inhibitory factor*. Transplantation, 2003. **76**(1): p. 244-7.
39. Huang, X.R., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is an important mediator in the pathogenesis of gastric inflammation in rats*. Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 619-30.
40. Ferro, E.A., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of Toxoplasma gondii, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants*. Am J Pathol, 2008. **172**(1): p. 50-8.
41. Lan, H.Y., et al., *The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1455-65.
42. Boyce, N.W., P.G. Tipping, and S.R. Holdsworth, *Lymphokine (MIF) production by glomerular T-lymphocytes in experimental glomerulonephritis*. Kidney Int, 1986. **30**(5): p. 673-7.
43. Mikulowska, A., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice*. J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5514-7.
44. Leech, M., et al., *Regulation of p53 by macrophage migration inhibitory factor in inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(7): p. 1881-9.
45. Denking, C.M., et al., *In vivo blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing the homing of encephalitogenic T cells to the central nervous system*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1274-82.
46. Pollak, N., et al., *Improved resistance to bacterial superinfection in mice by treatment with macrophage migration inhibitory factor*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6488-92.
47. Calandra, T., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11383-8.
48. de Jong, Y.P., et al., *Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1061-6.
49. Ohkawara, T., et al., *Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis*. Clin Exp Immunol, 2005. **140**(2): p. 241-8.
50. Rosado Jde, D. and M. Rodriguez-Sosa, *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(9): p. 1239-56.
51. Flores, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against Toxoplasma gondii*. FASEB J, 2008. **22**(10): p. 3661-71.
52. Terrazas, C.A., et al., *Toxoplasma gondii: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection*. Exp Parasitol, 2010. **126**(3): p. 348-58.
53. de Oliveira Gomes, A., et al., *Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with Toxoplasma gondii depends on gestational age*. Am J Pathol, 2011. **178**(6): p. 2792-801.
54. Castro, A.S., et al., *Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control Toxoplasma gondii infection*. Placenta, 2013. **34**(3): p. 240-7.

55. Juttner, S., et al., *Migration inhibitory factor induces killing of Leishmania major by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2383-90.
56. Blasius, A.L., et al., *Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2561-8.
57. Laird, P.W., et al., *Simplified mammalian DNA isolation procedure*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(15): p. 4293.
58. Saavedra, R., et al., *Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP2 protein antigen of Toxoplasma gondii*. Infect Immun, 1996. **64**(9): p. 3858-62.
59. Saavedra, R., et al., *Human T cell clone identifies a potentially protective 54-kDa protein antigen of Toxoplasma gondii cloned and expressed in Escherichia coli*. J Immunol, 1991. **147**(6): p. 1975-82.
60. Inaba, K., et al., *Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1693-702.
61. Lee, Y.U., et al., *Implantation of inferior vena cava interposition graft in mouse model*. J Vis Exp, 2014(88).
62. Gonzalez-Calixto, C., et al., *AealRACK1 expression and localization in response to stress in C6/36 HT mosquito cells*. J Proteomics, 2015. **119**: p. 45-60.
63. Tan, J.K. and H.C. O'Neill, *Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(2): p. 319-24.
64. Leng, L., et al., *MIF signal transduction initiated by binding to CD74*. J Exp Med, 2003. **197**(11): p. 1467-76.
65. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 587-96.
66. Tarnowski, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(10): p. 1328-43.
67. Hunter, C.A., et al., *Production of gamma interferon by natural killer cells from Toxoplasma gondii-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha*. Infect Immun, 1994. **62**(7): p. 2818-24.
68. Denkers, E.Y., et al., *Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to Toxoplasma gondii in MHC class I-deficient mice*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1465-72.
69. Hsieh, C.Y., et al., *Macrophage migration inhibitory factor triggers chemotaxis of CD74+CXCR2+ NKT cells in chemically induced IFN-gamma-mediated skin inflammation*. J Immunol, 2014. **193**(7): p. 3693-703.
70. Serbina, N.V., et al., *TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 59-70.
71. Schmid, M., A.K. Wege, and U. Ritter, *Characteristics of "Tip-DCs and MDSCs" and Their Potential Role in Leishmaniasis*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 74.
72. Williams, M., et al., *IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 1107-18.
73. Bosschaerts, T., et al., *Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001045.

74. Schluter, D., et al., *Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in Toxoplasma gondii-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in T. gondii-resistant BALB/c mice*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3512-8.
75. Kang, K.M., et al., *Effects of iNOS inhibitor on IFN-gamma production and apoptosis of splenocytes in genetically different strains of mice infected with Toxoplasma gondii*. Korean J Parasitol, 2004. **42**(4): p. 175-83.
76. Deckert-Schluter, M., et al., *Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3427-36.
77. Takacs, A.C., I.J. Swierzy, and C.G. Luder, *Interferon-gamma restricts Toxoplasma gondii development in murine skeletal muscle cells via nitric oxide production and immunity-related GTPases*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45440.
78. Haque, S., et al., *Protection against lethal toxoplasmosis in mice by an avirulent strain of Toxoplasma gondii: stimulation of IFN-gamma and TNF-alpha response*. Exp Parasitol, 1999. **93**(4): p. 231-40.
79. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
80. Bieber, K. and S.E. Autenrieth, *Insights how monocytes and dendritic cells contribute and regulate immune defense against microbial pathogens*. Immunobiology, 2015. **220**(2): p. 215-26.
81. Auffray, C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
82. Sunderkotter, C., et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
83. Dunay, I.R., A. Fuchs, and L.D. Sibley, *Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with Toxoplasma gondii in mice*. Infect Immun, 2010. **78**(4): p. 1564-70.
84. Neal, L.M. and L.J. Knoll, *Toxoplasma gondii profilin promotes recruitment of Ly6Chi CCR2(+) inflammatory monocytes that can confer resistance to bacterial infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(6): p. e1004203.
85. Cohen, S.B., et al., *CXCR3-dependent CD4(+) T cells are required to activate inflammatory monocytes for defense against intestinal infection*. PLoS Pathog, 2013. **9**(10): p. e1003706.
86. Dunay, I.R., et al., *Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen Toxoplasma gondii*. Immunity, 2008. **29**(2): p. 306-17.
87. Biswas, A., et al., *Ly6Chigh Monocytes Control Cerebral Toxoplasmosis*. J Immunol, 2015. **194**(7): p. 3223-35.
88. Goldszmid, R.S., et al., *NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection*. Immunity, 2012. **36**(6): p. 1047-59.
89. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.
90. Liu, C.H., et al., *Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against Toxoplasma gondii infection in mice*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 31-5.
91. Nathan, C.F., et al., *Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity*. J Exp Med, 1983. **158**(3): p. 670-89.

92. Pfefferkorn, E.R., *Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 908-12.
93. Scharton-Kersten, T.M., et al., *Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen Toxoplasma gondii*. J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1261-73.
94. Collazo, C.M., et al., *Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 181-8.
95. Taylor, G.A., et al., *Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 751-5.
96. Kim, L., et al., *p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4178-84.
97. Allo, S.N., et al., *Phorbol ester stimulation of protein kinase C activity and ribosomal DNA transcription. Role in hypertrophic growth of cultured cardiomyocytes*. J Biol Chem, 1991. **266**(32): p. 22003-9.
98. Morgan, A.J. and R. Jacob, *Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane*. Biochem J, 1994. **300 (Pt 3)**: p. 665-72.
99. Juan de Dios Ruiz-Rosado, J.E.O., Imelda Juárez-Avelar, Rafael Saavedra, Luis I. Terrazas, Frank H. Robledo-Avila, Alicia Vazquez-Mendoza, Jacqueline Fernández, Abhay R. Satoskar, Santiago Partida-Sánchez, Miriam Rodríguez-Sosa, *MIF Promotes Classical Activation and Conversion of Inflammatory Ly6Chigh Monocytes into TipDCs during Murine Toxoplasmosis*. Mediators of Inflammation, 2016. **2016**
100. Andrade, W.A., et al., *Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to Toxoplasma gondii in mice*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(1): p. 42-53.