



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS SOCS Y SHP1-2 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE STAT3
EN MACRÓFAGOS DURANTE LA INFECCIÓN CON *Taenia crassiceps*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SANDY REYES MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX., SEPTIEMBRE 2020



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS SOCS Y SHP1-2 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE STAT3
EN MACRÓFAGOS DURANTE LA INFECCIÓN CON *Taenia crassiceps*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SANDY REYES MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/478/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 2 de marzo de 2020 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **REYES MARTÍNEZ SANDY**, con número de cuenta **411078896** con la tesis titulada **“Papel de las proteínas SOCS y SHP1-2 sobre la activación de STAT3 en macrófagos durante la infección con *Taenia crassiceps*.”**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ
Vocal: DR. JOSÉ LUIS REYES HERNÁNDEZ
Secretario: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO
Suplente: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de agosto de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACyT por la beca otorgada durante la maestría, con número de CVU 742855.

Al proyecto IN220316 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA-UNAM.

A mi tutor principal, el Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por el apoyo que me ha brindado durante este proyecto y por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo.

A los miembros del comité tutor integrado por el Dr. Federico Ávila Moreno y el Dr. Abraham Landa Piedra, por apoyarme con sus valiosas aportaciones durante el proyecto y sus sugerencias en la mejora de este trabajo.

Agradecimientos a título personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Al laboratorio de Inmunoparasitología en la Unidad de Biomedicina por brindarme el espacio para desarrollar el presente proyecto, así como al bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

A los miembros del Jurado: Dr. E. Galileo Escobedo González, Dr. José Luis Reyes Hernández, Dra. Lourdes A. Arriaga Pizano y Dra. M. Magdalena Aguirre García, por su disposición y tiempo al leer mi trabajo de tesis, por sus observaciones, correcciones y apoyo en la edición este.

A mi madre y mi padre, que siempre me han apoyado incondicionalmente y me han formado como la persona que soy.

A mis hermanos, por su apoyo y por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

A cada uno de los seres que compartieron momentos especiales conmigo durante esta etapa de mi vida académica y por motivarme a ser mejor cada día.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Aspectos evolutivos de las infecciones por parásitos helmintos.	3
2. Activación de la respuesta inmune por parásitos helmintos.	4
3. Regulación de la respuesta inmune por <i>Taenia crassiceps</i> .	6
4. Importancia de las vías de señalización en la activación de la respuesta inmune.	9
5. Vía de señalización JAK-STAT	10
a. Receptores	11
b. Dominios	12
c. Proteínas de la vía JAK-STAT	13
d. Proteínas reguladoras de la vía JAK-STAT	16
6. Activación de STAT3 y su regulación	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
MÉTODOS	24
1. Animales de experimentación	24
2. Infección experimental	25
3. Obtención y cultivo de células de exudado peritoneal (PECs)	25
4. Estimulación de macrófagos in vitro y obtención/determinación de proteínas	25
5. Western blot	26
5.1 Electroforesis	
5.2 Inmunodetección	
6. Análisis estadístico	27

RESULTADOS

1. Activación de la proteína SOCS3 durante la infección con *Taenia crassiceps*. **28**
 - 1.1. La infección a corto y largo plazo con *Taenia crassiceps* induce mayores niveles de la molécula supresora SOCS3 en macrófagos peritoneales. **29**
 - 1.2. La fosforilación de STAT3 y los niveles de la proteína supresora SOCS3 son inhibidos por el ácido zoledrónico en macrófagos peritoneales de la infección a largo plazo con *Taenia crassiceps*. **31**
2. Activación de las proteínas SHP1 y SHP2 en macrófagos provenientes de la infección con *Taenia crassiceps*. **33**
 - 2.1 La infección a largo plazo con *Taenia crassiceps* induce el incremento en los niveles de la fosfatasa SHP1 en macrófagos peritoneales. **34**
 - 2.2 La infección a corto y largo plazo con *Taenia crassiceps* induce el incremento en los niveles de la fosfatasa SHP2 en macrófagos peritoneales. **36**
 - 2.3 La inhibición de SHP2 con ortovanadato de sodio permite el incremento de la fosforilación de STAT3 en macrófagos peritoneales. **37**
3. Activación de la proteína PIAS3 frente a *Taenia crassiceps*. **40**
 - 3.1 La infección a largo plazo con *Taenia crassiceps* no induce el incremento significativo en los niveles de PIAS3 en macrófagos peritoneales. **40**

DISCUSIÓN **42**

CONCLUSIONES **49**

PERSPECTIVAS **50**

LITERATURA CITADA **51**

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Respuesta inmune en mamíferos activada por infecciones con microparásitos y macroparásitos.	6
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Taenia crassiceps</i>	7
Figura 3. Conformación de los componentes de la vía JAK-STAT.	15
Figura 4. Modelo estructural de SHP-1 y SHP-2.	17
Figura 5. Señalización de IL-6 e IL-10 a través de STAT3	20
Figura 6. Mecanismo de regulación de SOCS3 sobre la vía JAK/STAT	28
Figura 7. Niveles de la proteína supresora SOCS3 en macrófagos peritoneales de infección a corto y largo plazo con <i>Taenia crassiceps</i>	30
Figura 8. Fosforilación de STAT3 y niveles de la molécula supresora SOCS3 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con <i>Taenia crassiceps</i>	32
Figura 9. Mecanismos de regulación negativa de SHP1 y SHP2	33
Figura 10. Niveles de la fosfatasa SHP1 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con <i>Taenia crassiceps</i>	35
Figura 11. Niveles de la fosfatasa SHP2 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con <i>Taenia crassiceps</i>	37
Figura 12. Fosforilación de STAT3 y niveles de la fosfatasa SHP2 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con <i>Taenia crassiceps</i>	38
Figura 13. Fosforilación de STAT3 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con <i>Taenia crassiceps</i>	39
Figura 14. Mecanismos de regulación negativa de PIAS3	40
Figura 15. Niveles de la proteína PIAS3 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con <i>Taenia crassiceps</i>	41
Figura 16. Propuesta de los efectos inmunomodulatorios sobre los mecanismos reguladores negativos de la vía JAK-STAT frente a <i>Taenia crassiceps</i> .	48
Tabla 1. Citocinas que actúan a través de receptores que señalizan por la vía JAK- STAT	11
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en Western blot	27

INDICE DE ABREVIATURAS

aaMΦ's	Alternatively activated macrophages (Macrófagos activados alternativamente)
Ab	Anticuerpo
Arg1	Arginasa-1
BSA	Bovine serum albumin (Albúmina sérica bovina)
caMΦ's	Classically activated macrophages (Macrófagos clásicamente activados)
CLC	Citocina similar a cardiotrofina
CNTF	Ciliary neurotrophic factor (Factor neurotrófico ciliar)
C-terminal	Extremo carboxi-terminal
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)
FIZZ1	Found in inflammatory zone (Familia de moléculas tipo resistina)
GAS	Gamma-Activated Sequence (Secuencia activada por Gamma)
HRP	Horseshoe peroxidase (Peroxidasa de rábano)
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
i.p.	intraperitoneal
IFN- γ	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
ISRE	Interferon-Stimulated Response Elements (Elementos de respuesta estimulados por interferón)
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (Sintasa de óxido nítrico inducible)

mA	Miliamperes
MΦ's	Macrófagos
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sodio
NO	Nitric Oxide (Óxido nítrico)
N-terminal	Extremo amino-terminal
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (Patrones moleculares asociados a patógenos)
PBS	Phosphate buffered saline (Amortiguador de fosfatos)
PD-L	Programed Death-Ligand
PECs	Peritoneal exudate cells (Células totales de exudado peritoneal)
PEST	Motivos en proteínas SOCS ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina
PIAS	Protein inhibitors of activated STATs (Proteínas inhibidoras de la activación de STATs)
p.i.	post-infección
PVDF	Polyvinylidene fluoride (Polivinilideno fluoruro)
RI	Respuesta inmune
RPM	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)
ROS	Reactive oxygen species (Especies reactivas de oxígeno)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico)
SHP	Protein tyrosine phosphatase specific of SH2 (Fosfatasas de tirosinas específicas del dominio SH2)
SOCS	Suppressors of cytokine signalling (Supresores de la señalización de citocinas)
SSF	Solución salina fisiológica

STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Transductores de Señales y Activadoras de la Transcripción)
Th1	T helper 1 (Células T cooperadoras tipo 1)
Th2	T helper 2 (Células T cooperadoras tipo 2)
TLR	Toll like receptor (Receptores tipo Toll)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha (Factor de Necrosis Tumoral alfa)
TcES	Productos excretados/secretados de <i>Taenia crassiceps</i>
V	Voltio
Ym1	Factor quimiotáctico de eosinófilos
ZA	Ácido zoledrónico

RESUMEN

Los parásitos helmintos son organismos eucariontes que tienen la capacidad de modular la respuesta inmune de sus huéspedes a través de distintos mecanismos. La infección por *T. crassiceps*, así como sus productos excretados/secretados (TcES), pueden modular específicamente la vía de las Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción (JAK-STAT). En estudios previos se ha observado que los macrófagos de ratones infectados por este parásito expresan altos niveles del Supresor de las señales de citocina 3 (SOCS3), y el Transductor y activador de las señales de transcripción 3 (STAT3) muestra diferentes respuestas de fosforilación frente a las interleucinas 6 y 10. En el presente estudio se analizó como la infección con *T. crassiceps* inducía diferentes patrones de activación del Supresor de las señales de citocina 3 (SOCS3), las Fosfatasa 1 y 2 que contienen el dominio de la región de homología 2 de Src (SHP1-2) y la Proteína inhibidora de activación de STAT3 (PIAS3) que modulan la activación de STAT3. Se infectaron alrededor de 20 ratones BALB/c hembras de seis a ocho semanas de edad i.p. con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. Se obtuvieron las células de exudado peritoneal de ratones no infectados e infectados de dos y ocho semanas. Después de 24 h en cultivo, las células no adherentes se eliminaron y las células adherentes restantes se estimularon con la adición de IL-6 e IL-10. La inhibición de fosfatasa SHP2 se realizó añadiendo ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) y la de SOCS3 con ácido zoledrónico (ZA), ambos previos al estímulo con IL-6 e IL-10. La concentración de proteína se determinó con ensayo de Bradford. Se realizó un análisis por Western blot de los niveles de SOCS3, SHP1, SHP2, PIAS3 y STAT3-P. Se encontró que en respuesta a IL-6 e IL-10 los macrófagos de ratones infectados a las dos y ocho semanas con *T. crassiceps* mostraron altos niveles de SOCS3, SHP1, SHP2 y STAT3-P. La inhibición de la actividad fosfatasa de SHP2 por ortovanadato permitió el incremento de la respuesta de los macrófagos a IL-6 e IL-10 al verse aumentada la fosforilación de STAT3 y sin afectar la activación de SOCS3. Estos datos sugieren que la fosforilación de STAT3 está regulada durante la infección por esta fosfatasa. Los macrófagos de ratones infectados con *T. crassiceps* expuestos al ácido zoledrónico (ZA) expresaron bajos niveles de SOCS3 y STAT3-P. La exposición a este fármaco mostró que el efecto de la disminución en los niveles de proteína SOCS3 probablemente fue en respuesta a la disminución de la fosforilación de STAT3. En conjunto, estos datos sugieren que la infección por helmintos puede apuntar a la manipulación de vías intracelulares como SHP2 y SOCS3 con la finalidad de regular la respuesta de los macrófagos a citocinas como IL-6 e IL-10.

ABSTRACT

Helminth parasites are eukaryotic organisms with the ability to modulate the immune response of their hosts with mechanisms. *Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products (TcES) can modulate specifically the Janus kinases-Signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway. Previous studies have shown that macrophages from *T. crassiceps*-infected mice expressed high levels of the suppressor of cytokine signalling (SOCS3) and different phosphorylation patterns of the Signal transducer and activator of transcription protein 3 (STAT3) in response to interleukins IL-6 and IL-10. In this work, we wanted to study whether the infection with *T. crassiceps* could induce different activation patterns of the regulatory proteins as Suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3), the phosphatase Src-homology 2 domain (SH2)-containing (SHP1-2) and the Protein inhibitors of activated STAT3 (PIAS3) that in turn may modulate STAT3 activation. Six to eight week old female BALB/c mice were intraperitoneally infected with 10 cysticerci of *T. crassiceps*. The peritoneal exudate cells (PECs) were obtained from uninfected mice, as well as from two and eight weeks *T. crassiceps*-infected mice. After 24 h in culture, non-adherent cells were removed and the remaining adherent cells were stimulated by adding recombinant murine IL-6 and IL-10. SHP2 phosphatase inhibition was performed by adding sodium orthovanadate and SOCS3 inhibition with Zoledronic acid (ZA) prior to cytokine stimuli with IL-6 and IL-10. The protein concentration was determined with Bradford assay. Western blot analysis was performed to analyze protein levels of SOCS3, SHP1, SHP2, PIAS3 and phospho-STAT3. We found that macrophages obtained from acute and chronic *T. crassiceps*-infected mice exposed to IL-6 and IL-10 displayed high expression levels of SOCS3, SHP1, SHP2 and phospho-STAT3. Nevertheless, the inhibition of the phosphatase activity of SHP2 by orthovanadate restored the macrophage response to IL-6 and IL-10 by increasing STAT3 phosphorylation without affecting SOCS3 expression. These data suggest that STAT3 phosphorylation is regulated by phosphatases instead of SOCS3. Furthermore, macrophages from *T. crassiceps*-infected mice exposed to Zoledronic acid (ZA) expressed low levels of SOCS3 as well as phospho-STAT3. The exposure to this drug showed that reduction of SOCS3 protein levels was probably due to decrease of STAT3 phosphorylation. Together these data suggest that helminth infections may target intracellular pathways such as SHP2 and SOCS3 in order to manipulate macrophage responses to IL-6 and IL-10.

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos evolutivos de las infecciones por parásitos helmintos.

El sistema inmune es uno de los sistemas más complejos y diversos de un organismo vivo. El sistema inmunológico ha demostrado estar muy bien adaptado a su función, ya que de lo contrario los organismos multicelulares de larga vida probablemente no sobrevivirían frente a los numerosos parásitos con los que interactúa. Sin embargo, algunas de las respuestas inmunes no siempre son eficientes, pues varían entre especies y frente a diversos factores como la etapa del ciclo de vida del parásito o huésped, la infección por otros tipos de parásitos (coinfecciones), la disponibilidad de recursos y los cambios ambientales (Schmid-Hempel, 2003; Vale *et al.* 2011). Además, la capacidad de generar una respuesta inmune o la inmunocompetencia genera costos infringidos por el parasitismo. Con respecto a las defensas inmunitarias, existen costos energéticos por parte de los huéspedes para implementar o desarrollar una respuesta inmune eficiente. Del mismo modo, los parásitos no siempre pueden ejercer la máxima virulencia porque implica costos y esfuerzos energéticos (Guivier *et al.*, 2016; Kirschman *et al.*, 2017).

En general, entre el parásito y el huésped se establece una relación dinámica en las enfermedades infecciosas, donde, de manera progresiva, el primero reduce la esperanza de vida del hospedador explotándolo de acuerdo a sus necesidades evitando llevarlo a su muerte. A su vez, los segundos intentan minimizar los daños y pérdida de su capacidad biológica causada por el parásito. La mayoría de los patógenos se han visto en la necesidad de desarrollar una amplia gama de estrategias para permanecer y sobrevivir dentro de sus huéspedes; no obstante, éstos últimos han evolucionado para adquirir adaptaciones que los hagan capaces de contrarrestar la proliferación de estos agentes extraños, así como evitar el daño patológico que implica su presencia. Éstos hechos son evidencia de que el sistema inmune posee muchos signos de coevolución con los parásitos siendo que la mayoría de las especies vivas son parásitas (Caljon *et al.*, 2016; Van Valen, 1989).

Los parásitos helmintos son organismos metazoarios que generalmente establecen infecciones a largo plazo en su huésped, esto demuestra su gran capacidad de regular activamente la respuesta inmune y conducir a una homeostasis fisiológica e inmunológica diferente para crear un entorno favorable para su reproducción y crecimiento (Coakley *et al.*, 2016, Maizels *et al.*, 2004). Para mantener esta capacidad de regulación inmunológica, los parásitos se ven obligados a adaptarse continuamente a la evolución de las respuestas

inmunitarias y el entorno genético de sus huéspedes, y como resultado han desarrollado un conjunto notable de adaptaciones moleculares que inhiben, activan o manipulan diferentes células o vías del huésped para garantizar el éxito del parásito (Coakley *et al.*, 2016; Hewitson *et al.*, 2009).

Los helmintos son gusanos parásitos pertenecientes a los phyla Nematoda (nematodos, gusanos redondos) y Platyhelminthes (platelmintos, gusanos planos); son de gran relevancia en áreas como la medicina, la veterinaria y la agrícola al representar graves problemas de salud y de impacto socioeconómico. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de dos mil millones de personas están infectadas con este tipo de patógenos y muchas más se encuentran en riesgo de contraer algún tipo de helmintiasis, principalmente en países subdesarrollados (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Una amplia variedad de especies de helmintos es capaz de colonizar diferentes nichos y organismos hospedadores, y en cada caso logran evitar mecanismos de defensa y expulsión por parte del huésped. Realmente se ha considerado que la estrategia de los helmintos no es precisamente superar el sistema inmune mediante su rápida multiplicación o variación antigénica, como se observa en otro tipo de patógenos, sino que manipulan y modulan la inmunidad para desactivar las defensas inmunitarias, lo que impide que el huésped logre eliminar a estos parásitos (Maizels *et al.*, 2012). Los helmintos logran su objetivo inactivando los sistemas de detección del huésped y posteriormente induciendo un aumento en la tolerancia de los antígenos del parásito por el sistema inmune, lo cual también atenuaría las respuestas a los antígenos que desencadenan diferentes alergias o la autoinmunidad (Johnstone *et al.*, 2014).

2. Activación de la respuesta inmune por parásitos helmintos.

La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa de un organismo durante una infección, teniendo un papel crucial en el reconocimiento temprano y la posterior activación de una respuesta pro-inflamatoria ante los patógenos invasores (Perrigoue *et al.*, 2008). El reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) es un elemento clave para la defensa inmunológica contra los parásitos (Tetreau *et al.*, 2017). Los macrófagos reconocen los PAMPs por medio de receptores que presentan en la superficie de su membrana, los receptores de tipo toll (TLRs). Cuando esto pasa, se liberan grandes cantidades de citocinas importantes para iniciar la inflamación y el

reclutamiento celular. Además, la capacidad efectora de los macrófagos puede ser potencializada por las células del sistema inmune adaptativo (Sanz *et al.*, 2013).

La interacción parásito-huésped inicialmente tiene lugar entre la superficie del parásito (en la mayoría de casos de parásitos unicelulares) o con las moléculas contenidas en las excreciones y secreciones de parásitos multicelulares y el sistema inmunológico de su huésped, principalmente a nivel de las moléculas involucradas en la defensa, por lo que se esperaría que los parásitos hayan desarrollado formas de interacción a este mismo nivel. La superficie de la mayoría de parásitos presenta biomoléculas como glucoproteínas y glucolípidos que son reconocidos específicamente por receptores del sistema inmune del huésped, representando blancos importantes para activar la respuesta inmune frente a los helmintos (Mogensen, 2009; Schmid-Hempel, 2008; Tetreau *et al.*, 2017).

Para que el establecimiento de la infección y la supervivencia de los parásitos se efectúen, éstos deben lograr la evasión de la respuesta inmune utilizando formas de mimetismo molecular, promoviendo su variación antigénica, afectando la presentación y/o procesamiento de antígenos o manipulando la red de señalización del sistema inmune. Por otro lado, los parásitos pueden explotar al huésped a su beneficio con la finalidad de obtener ventajas como el crecimiento o la reproducción del mismo. Un claro ejemplo se presenta cuando el patógeno logra tener el control sobre hormonas o factores de crecimiento del huésped que promueven su rápido establecimiento, así como el aumento de las tasas de crecimiento y reproducción. Además, las hormonas del hospedador tienen la capacidad de afectar la respuesta inmunológica dirigida contra agentes patógenos (Escobedo *et al.*, 2005; Hammerschmidt y Kurtz, 2005).

Por su parte, la respuesta inmune adaptativa incluye diferentes subconjuntos de efectores dirigidos a diferentes tipos de parásitos (intra y extracelulares) (Figura 1). Estos conducen a la polarización T-helper 1 (Th1) y T-helper 2 (Th2) del sistema inmune adaptativo, dos vías que tienden a ser antagonistas entre sí (Gordon & Martinez 2010; Guivier *et al.*, 2016). La respuesta Th1 generalmente confiere protección contra parásitos intracelulares, mientras que la mayor parte de infecciones por parásitos extracelulares, como los helmintos, desencadena una respuesta inmune Th2, donde los linfocitos T CD4 responden con la producción de interleucinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. A su vez, se presenta una mayor producción de inmunoglobulinas IgE e IgG1 por las células B y existe un aumento en el reclutamiento de basófilos, eosinófilos y mastocitos. Esta respuesta permite la reducción de la respuesta inmune pro-inflamatoria y se asocia con la supervivencia del

parásito (Donnelly *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009). Otra característica de la respuesta inmune de tipo Th2 es su capacidad de promover la reparación y regeneración de daños tisulares, principalmente a través de los macrófagos activados alternativamente (aaMΦ). También existen evidencias que han demostrado que las respuestas inflamatorias dirigidas contra antígenos no relacionados con los parásitos pueden ser inhibidos por las infecciones por helmintos, disminuyendo el daño ocasionado por alguna respuesta inmune exacerbada (Chen *et al.*, 2012; Klotz *et al.*, 2011; Reyes & Terrazas, 2007).

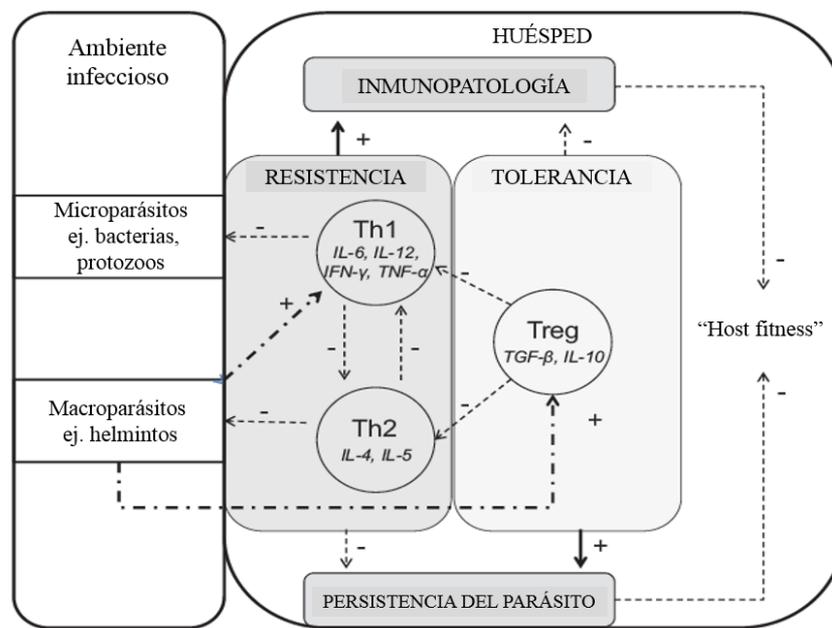


Figura 1. Respuesta inmune en mamíferos activada por infecciones con microparásitos y macroparásitos. La respuesta Th1 y las citocinas en cursiva se activan generalmente en respuesta a microparásitos. Por su parte, la respuesta Th2 proporciona protección contra macroparásitos. Los efectores Th1 inhiben la respuesta Th2 y viceversa. Aunque la respuesta inmune sostenida ayuda a resolver la infección, ésta puede causar daño inmunopatológico, por lo que existe una tercera población de células T (T reg) que desempeña un papel regulador. Muchos parásitos helmintos pueden interferir con la respuesta inmune, lo que favorece su persistencia en el huésped. Tomado y traducido de Guivier *et al.*, 2016.

3. Regulación de la respuesta inmune por *Taenia crassiceps*.

Taenia crassiceps (Zeder, 1800) es un platelminto de la clase Cestoda que cumple su ciclo de vida en roedores (hospedadores intermediarios) durante su etapa larvaria y en cánidos (hospedadores definitivos) en su etapa adulta. El parásito adulto tiene una longitud media de 14 cm y las larvas o metacéstodos son vesículas ovoides transparentes de 4 a 5 mm de longitud. El hospedador intermediario puede ser ingerido por el hospedador definitivo,

en el cual, al llegar al duodeno de éste, algún metacéstodo puede desarrollarse hasta gusano adulto, reproducirse, formar huvecillos y éstos liberarse junto con los proglótidos en las excretas del cánido, representado un nuevo foco de infección para otros roedores (Maillard *et al.*, 1998; Willms y Zurabian, 2010) (Figura 2). En los roedores existe una variante de este metacéstodo desarrollada en el laboratorio, que puede multiplicarse asexualmente por gemación, el cual constituye un excelente modelo para estudiar la relación huésped-parásito.

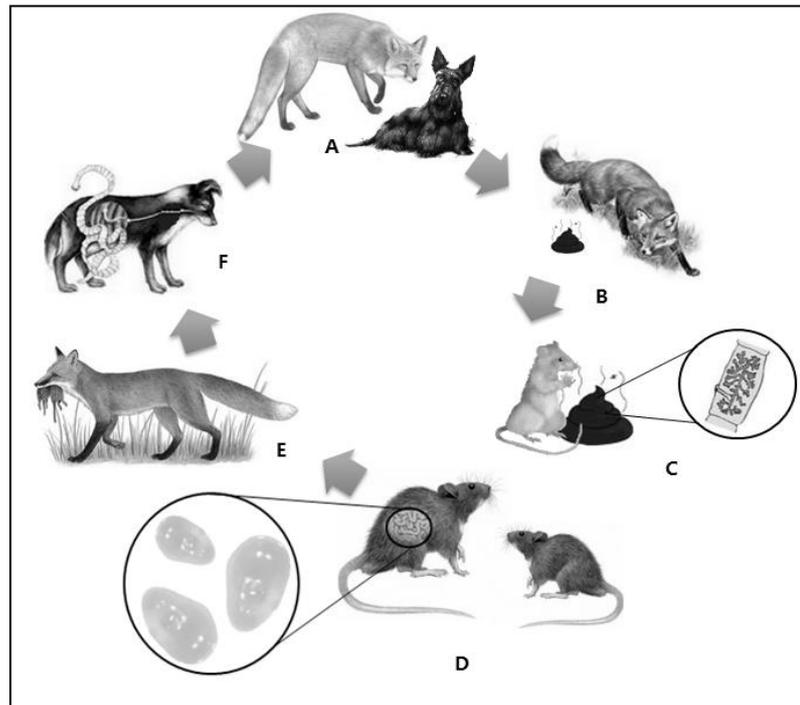


Figura 2. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*. A) Cánidos, los huéspedes definitivos. B) Heces de huésped infectado al aire libre. C) Ingestión de huevos y/o proglótidos grávidos por el huésped intermediario. D) Las larvas crecen en el huésped intermediario. E) El huésped intermediario es ingerido por un huésped carnívoro definitivo. F) Desarrollo del gusano adulto en el duodeno del huésped carnívoro definitivo.

En diversos estudios previos han desarrollado distintos modelos con parásitos helmintos de fácil manejo en el laboratorio. La cisticercosis murina experimental efectuada con la forma larvaria de *T. crassiceps* ha sido utilizada para el análisis y estudio de elementos involucrados en la respuesta inmune contra la infección (Terrazas *et al.*, 2010).

Las formas larvarias de la cepa ORF de *T. crassiceps* son utilizadas en experimentación y se realizan múltiples pases al ser recolectadas e inyectadas en la cavidad peritoneal de ratones de la cepa BALB/c; éstos parásitos se reproducen asexualmente en dicha cavidad y son utilizados para el estudio y análisis de células del sistema inmune que entran en contacto con el parásito, ya que la estructura externa del metacéstodo presenta un

complejo sistema de antígenos con la habilidad de inducir una respuesta inmunológica particular. Además, como el metacésto tiene la capacidad de secretar y excretar antígenos al medio circundante, éstos son utilizados para el estudio de fenómenos inmuno-regulatorios o para el análisis de las vías de señalización molecular inducidas por éstos. Existe evidencia que demuestra que los carbohidratos presentes en los antígenos solubles de este parásito tienen la capacidad de dirigir la respuesta inmune a un perfil de tipo Th2 en ratones, los cuales presentan un aumento significativo de IgG1 e IgE en suero, así como una mayor producción de IL-4, IL-5 e IL-10 de las células esplénicas; opuesto a lo observado en células de ratones tratados con peryodato sódico que altera la estructura de los carbohidratos (Arruda *et al.*, 2005; Gómez-García 2006; Reyes *et al.*, 2013).

Respecto al efecto inmunomodulador que ejercen los metacésto de *T. crassiceps* ha sido reportado que durante la etapa aguda de la infección predomina un ambiente de tipo Th1 caracterizado por una sobreproducción de Interferón gamma (IFN γ), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la enzima Sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), asociado también a los altos niveles de anticuerpos de la clase IgG2a. En etapas a largo plazo, esta respuesta declina, la carga parasitaria incrementa exponencialmente y se genera simultáneamente una respuesta Th2, en la cual predominan altas concentraciones de citocinas como IL-4 e IL-13, de anticuerpos IgG1 e IgE sistémicos y de prostaglandina E2 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2003; Terrazas *et al.*, 1999,).

Existen también cambios en las poblaciones celulares durante el transcurso de la infección, presentándose macrófagos con una activación clásica (caM Φ) durante las primeras semanas y macrófagos con un perfil de activación alternativa (aaM Φ) que expresan genes característicos como Arginasa 1 (Arg-1), el gen encontrado en zona de inflamación 1 (FIZZ1) y el Factor quimiotáctico de eosinófilos (YM1), así como una mayor producción de IL-10 durante las etapas a largo plazo (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002). Respecto a su actividad supresora, se ha demostrado que los aaM Φ s, reclutados por la infección con *T. crassiceps*, poseen altos niveles de expresión del Ligando de muerte programada 1 (PD-L1), y que al ser bloqueado PD-L1 o su ligando PD-1, se elimina la capacidad de inhibir la proliferación celular por parte de los aaM Φ s (Terrazas, *et al.*, 2005).

Es importante mencionar la complejidad de las condiciones *in vivo* donde hay una gran diversidad de estados de activación de los macrófagos que surgen en respuesta a diferentes estímulos y ambientes, por lo que es necesario considerar su origen, los factores

activadores empleados en su diferenciación y los marcadores específicos dependiendo su estado de activación (Murray *et al.*, 2014).

En los vertebrados, los macrófagos son células fagocíticas que forman parte del sistema inmune innato y que pueden activar otras células del sistema inmune adaptativo como los linfocitos T. Los parásitos han evolucionado de diferentes maneras para evadir a los macrófagos y otras células inmunitarias, por ejemplo, modulando el citoesqueleto de la célula hospedera para bloquear la fagocitosis adecuada, induciendo apoptosis, deteniendo el desarrollo del fagosoma, evadiendo los efectos antimicrobianos mediante la modificación de las señales de activación que son cruciales en los macrófagos, entre otros (Schmid-Hempel, 2008).

4. Importancia de las vías de señalización en la activación de la respuesta inmune.

La capacidad de las células para recibir y responder a señales de su entorno es un aspecto esencial en cualquier sistema biológico. Múltiples funciones y procesos celulares son activados y regulados por estímulos extracelulares a través de proteínas como citocinas, factores de crecimiento y hormonas. Estos factores solubles son reconocidos principalmente por receptores específicos ubicados en las membranas celulares de las células blanco, que a su vez activan vías de señalización de transducción de señales intracelulares, las cuales se caracterizan por la activación o inactivación en cascada de proteínas efectoras con un objetivo específico que ejercerá alguna función biológica (Berishaj *et al.*, 2007; Heneghan *et al.* 2013).

Como se ha mencionado anteriormente, la activación clásica de los macrófagos es promovida por características específicas del ambiente y la etapa de la infección. Tanto Interferón gamma ($IFN\gamma$) como el Factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) permiten que estas células se tornen a un fenotipo con capacidad microbicida y tumoricida, debido a la producción de citocinas pro-inflamatorias, aniones superóxido y radicales de nitrógeno donde la arginina se metaboliza por la iNOS. Por el contrario, los macrófagos activados alternativamente se generan en respuesta a interleucina IL-4 e IL-13. Ambas citocinas permiten que el fenotipo de los macrófagos promueva la cicatrización del tejido a través de la inducción de la actividad de la arginasa y conducen a la producción de altos niveles de la citocina inmunosupresora IL-10 (Maizels y Hewitson, 2016). Sin embargo, para que se puedan llevar a cabo todas estas funciones y cambios en el perfil de las poblaciones celulares es importante la activación y participación de vías de señalización que permitan la

transducción del mensaje emitido por las citocinas. En el caso de los aaMΦ's, estas células son inducidas a este perfil a través de las interleucinas IL4/IL-13 por medio del factor de transducción de señales STAT6; en contraste, las células activadas de la forma clásica lo logran gracias a la presencia de interleucina IL-12 e Interferón gamma (IFN γ), citocinas que activan los factores de transducción STAT4 y STAT1, respectivamente (Passos *et al.*, 2017; Persky *et al.*, 2005). La relación entre los caMΦ con la respuesta inmune Th1 y los aaMΦ con la respuesta Th2 se fundamenta con estudios donde se analiza la activación diferencial de macrófagos provenientes de animales infectados con *T. crassiceps* con ausencia de los Transductores de la señal y activadores de la transcripción 6 y 4 (STAT6 y STAT4). Rodríguez-Sosa y colaboradores en el 2002 reportaron que la molécula STAT6 inhibe el control de la cisticercosis experimental murina pues es fundamental para la supresión de la respuesta inmune Th1, además las citocinas producidas en la respuesta Th2 favorecían la susceptibilidad frente al parásito; en 2004, Rodríguez-Sosa y colaboradores demostraron que ratones deficientes de STAT4 no desarrollaban una respuesta Th1 tornándose altamente susceptibles a la infección por *T. crassiceps*, aunado a la baja capacidad de los macrófagos para producir citocinas pro-inflamatorias y óxido nítrico.

5. Vía de señalización JAK-STAT

La vía de señalización JAK-STAT fue inicialmente descrita en la década de 1990 por Darnell y Stark con el estudio de los mecanismos de inducción de expresión génica de la familia de los interferones. Esta vía de señales intracelulares utiliza como mecanismo de transmisión la fosforilación secuencial en residuos de tirosina y/o serina de dos grupos de proteínas, las Janus-cinasas (JAK) y los Transductores de la señal y activadores de la transcripción (STAT) (Heneghan *et al.*, 2013).

Una de las características de esta vía es su velocidad de activación, siendo la máxima rapidez de respuesta en expresión génica de 15 a 30 minutos tras su estimulación frente a interferón (Bromberg y Darnell, 2000; Niemand *et al.*, 2003). Además, varias de las señales que actúan de forma simultánea o secuencial en esta vía pueden inducir respuestas diversas en diferentes tipos celulares, sistemas biológicos o situaciones fisiológicas. El funcionamiento de esta vía es como un código binario que se fundamenta en el estado *fosforilado* o *no fosforilado* de residuos específicos de tirosina (Liongue y Ward, 2013). La complejidad de esta respuesta y su especificidad se sustentan sobre el tipo de citocina o

factor de crecimiento que la active, la distribución de los receptores en los diferentes grupos celulares y por la compleja maquinaria intracelular que transmite las señales entre los receptores y el núcleo.

a) RECEPTORES. De acuerdo a sus similitudes estructurales, los receptores de citocinas han sido clasificados en diferentes grupos. En función de esto, también se da una recepción diferencial en respuesta a los más de 40 polipéptidos que induzcan la activación génica a través de ellos. La clase I de éstos receptores incluyen aquellos que no tienen actividad enzimática intrínseca, como actividad de cinasa o fosfatasa; responden a la mayoría de interleucinas incluyendo aquellas que utilizan la subunidad gp130 o familia de la IL-6 que incluye a IL-11, IL-31, al factor inhibidor de leucemia (LIF), a oncostatina M (OSM), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), a cardiotrofina-1 (CT-1) y a la citocina similar a cardiotrofina (CLC); la subunidad γ C o familia del receptor de IL-2 y los receptores que utilizan la cadena β (Ahmed y Ivashkiv, 2000; O'Shea & Murray, 2008).

Por otro lado, existen los receptores para citocinas clase II que responden a las citocinas de la familia del interferón (Interferón alfa, beta y gamma - IFN α , IFN β , IFN γ) e interleucina 10 (IL-10). Todas estas citocinas representan los principales estímulos que activan la vía JAK-STAT, incluyendo algunas que actúan en receptores con actividad cinasa intrínseca, entre otros (Tabla 1).

Tabla 1. Citocinas que actúan a través de receptores que señalizan por la vía JAK-STAT

Receptores de citocinas tipo I	
<i>Receptores sin actividad cinasa intrínseca</i>	
Comparten la cadena común γ : IL2, IL4, IL7, IL9, IL13, IL15	
Comparten la cadena común β : IL3, IL5, GM-CSF	
Comparten la cadena gp130 o cadenas asociadas: IL6, IL11, IL12, IL-23, CT-1, CNTF, G-CSF, leptina, LIF, OSM	
<i>Receptores con actividad cinasa intrínseca</i>	
SCF, PDGF, EGF, CSF-1, trombopoyetina, eritropoyetina	
Receptores de citocinas tipo II	
IFN α , IFN β , IFN γ , IL10	
Receptores hormonales	GH, prolactina
Otros	Anti-CD3, anti-CD2, ligando del CD40, ligandos del CD28, angiotensina, inmunoglobulinas de superficie de los linfocitos B, CMH-I

b) **DOMINIOS.** Cada elemento de la vía JAK-STAT se compone de diferentes dominios de proteínas con diferentes funciones que en conjunto le proporcionan propiedades funcionales únicas y distintas. Por ello, es importante conocer cuáles son estos dominios proteicos y como se unen para dar lugar a cada elemento de la vía (Liongue y Ward, 2012) (Figura 3).

Dominio PTK (Proteína tirosina cinasa). Está conformado de aproximadamente 250 a 300 aminoácidos, tiene un sitio de unión a ATP y una región catalítica. Puede fosforilar residuos de tirosina con cierta especificidad basándose en la secuencia de aminoácidos dada por la otra proteína (X-Y Fu, 1999).

Dominio PTP (Proteína tirosina fosfatasa). Consta de alrededor de 280 residuos de aminoácidos, es capaz de desfosforilar residuos de fosfotirosina de manera eficaz (Xu y Qu, 2008).

Dominio SH2 (Src homologo 2). Está constituido por alrededor de 100 aminoácidos. Este dominio es el más conservado en la familia de Transductores de la señal y activadores de la transcripción (STAT), permite la unión de esta molécula al receptor de citocina fosforilado de manera específica y dependiente a los residuos que se encuentran alrededor de las tirosinas, principalmente los ubicados río abajo; este dominio también es fosforilado en residuos tirosina conservados por las tirosin cinasas, lo que permite la formación de dímeros entre Transductores de la señal y activadores de la transcripción (STATs) (Filippakopoulos *et al.*, 2009; Schindler, 2002).

Entre las funciones accesorias en la señalización de la vía JAK-STAT también se encuentran componentes como:

Dominio FERM (Four point one, Ezrin, Radixin, Moesin). Formada por tres subdominios F1-F3, puede controlar las interacciones entre proteína-proteína interviniendo con la unión de receptor con las citocinas, así como la unión a proteínas de membrana (Chishti *et al.*, 1998).

Dominio de unión al ADN. Está presente en proteínas STAT y es conformado por aproximadamente 170 aminoácidos; posee una estructura similar a los dominios de tipo inmunoglobulina que regula la unión a secuencias específicas en el ADN, dos principalmente: AGTTTNCNTTTCC, correspondiente al motivo llamado ISRE o *Interferon-Stimulated Response Elements*; y TTCNNGAA, nombrado motivo GAS o *Gamma-Activated Sequence* (Martínez, 2004).

Caja SOCS. Es un dominio de alrededor de 40 aminoácidos que controla las interacciones con los componentes de la ruta de degradación proteosomal, particularmente ubiquitina ligasas, regulando así la vida media de las proteínas (Kile *et al.*, 2002).

Dominio de transactivación (TAD). Es variable tanto en la secuencia como en la longitud de aminoácidos que los componen en las diferentes proteínas de transductores de la señal y activadores de la transcripción (STAT). Es importante para el reclutamiento de cofactores y respuestas transcripcionales. Algunos de los residuos de serina localizados en este dominio también pueden ser fosforilados promoviendo la actividad transcripcional (Liongue *et al.*, 2012).

c) **PROTEÍNAS DE LA VÍA JAK-STAT.** Todos los dominios antes mencionados, ensamblados de manera específica, conforman cada una de las proteínas que llevan a cabo la señalización a través de la vía Janus-cinasa/Transductores de la señal y activadores de la transcripción (JAK-STAT). Esta especificidad de unión entre distintos elementos es lo que permite a las células reaccionar de diferente manera ante una diversa gamma de estímulos externos e internos.

Proteínas JAK (Janus cinasas). Las proteínas Janus cinasas tienen dominios FERM y SH2 en el extremo N-terminal. Tienen un dominio de pseudo-cinasa ubicado en el centro con homología a los dominios PTK sin función catalítica, además de contar con un dominio PTK en el extremo C-terminal.

Actualmente en diferentes estudios han reportado cuatro miembros de la familia Janus cinasas (JAK) en mamíferos: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2, todos conformados por aproximadamente mil aminoácidos y con pesos moleculares de 120 a 140 kDa. Son activadas cuando algún receptor acoplado a sus dominios PTK se une a su ligando, favoreciendo un cambio conformacional al hacer que se fosforilen, debiendo estar en

estrecha proximidad para que sea posible dicha fosforilación. Una vez fosforiladas éstas tienen diferentes sustratos sobre los que ejercen su función de cinasa, como las proteínas STAT (Galdiero et al., 2006; Heneghan *et al.*, 2013; Liongue *et al.*, 2012).

Proteínas STAT (Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción).

Se componen de cuatro dominios conservados en común y un quinto que le da especificidad a cada una de las STAT.

En sus extremos N-terminal se localiza el dominio de interacción dímero-dímero que favorece la dimerización de las STATs, posteriormente tienen una estructura en espiral enrollada que les otorga la capacidad de exportación nuclear y la regulación de la fosforilación de tirosina. También cuentan con un dominio de unión a ADN que se encarga del reconocimiento de secuencias específicas, un dominio SH2 para el reconocimiento y acoplamiento a fosfotirosinas en los receptores de citocinas, proteínas JAK y otras STAT.

Finalmente, en el extremo C-terminal poseen un dominio TAD que media la transactivación y representa la región variable en las STATs.

En mamíferos en diversas investigaciones han descrito siete de estos factores de transcripción siendo STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6. Sus pesos moleculares oscilan entre los 75 a los 95 kDa, con alrededor de 750 a 850 aminoácidos (Lang *et al.*, 2005; Vogt *et al.*, 2011).

Estos factores de transcripción se encuentran latentes en el citoplasma y entran en el núcleo en función a la fosforilación de la tirosina y su dimerización con otras STATs. (Heneghan *et al.*, 2013).

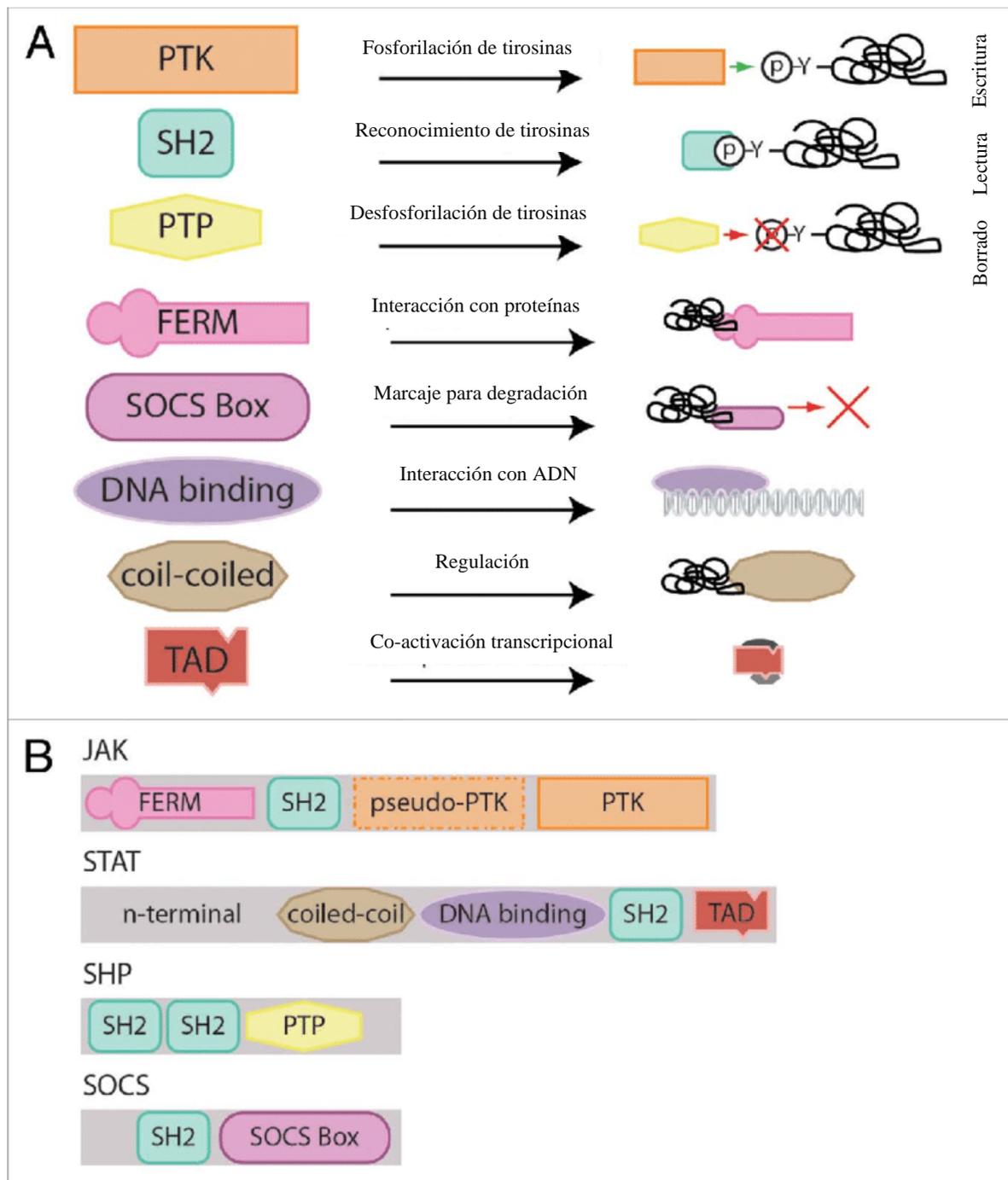


Figura 3. Conformación de los componentes de la vía JAK-STAT. (A) Dominios de los componentes de la vía JAK-STAT y su función. Los dominios PTK, SH2 y PTP contribuyen a las funcionalidades de escritura, lectura y borrado respectivamente, los otros tienen funciones accesorias. (B) Componentes de la vía JAK-STAT y sus respectivos dominios. Tomada y traducida de Liongue y Ward, 2013.

d) PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA VÍA JAK-STAT

Así como la activación diferencial y específica de cada uno de los componentes de la vía JAK-STAT produce una respuesta precisa gracias a la participación de cada complejo receptor de citocinas y dominios que conforman proteínas intermediarias y factores de transcripción, es importante mencionar que una parte indispensable de esta compleja red de sistemas de señalización es la presencia de mecanismos reguladores de la señalización JAK-STAT. Estos reguladores negativos incluyen miembros específicos del dominio SH2 que poseen tirosina fosfatasas (SHP), los inhibidores de las proteínas STAT (PIAS) y los supresores de las familias de señalización de citocinas (SOCS).

Proteínas SOCS (Supresores de la señalización de citocinas). Cada una de estas proteínas está conformada por un dominio SH2, un dominio N-terminal de longitud variable y un dominio conservado o caja SOCS en el extremo C-terminal, que interactúa con elementos del proteosoma. Este grupo de proteínas está conformado por ocho componentes: SOCS1-SOCS7 y CIS. (Alexander, 2002; Tamiya *et al.*, 2011; Yoshimura *et al.*, 2007).

Estas moléculas regulan negativamente la vía JAK-STAT a través de su asociación con residuos de tirosina fosforilados de las proteínas JAK, bloqueando y suprimiendo su actividad. También interactúan con la maquinaria de ubiquitinación celular a través de la caja SOCS y dirigen proteínas asociadas, como JAKs o receptores, para su degradación proteosomal mediada por ubiquitina. Aún no está claro si las proteínas SOCS también son objeto de degradación a través de este mecanismo, pero representaría una explicación válida para comprender la eliminación de las SOCS después de haber actuado y así permitan que la estimulación de citocinas posteriores se complete. Estas proteínas también influyen sobre otras proteínas pertenecientes a diferentes vías de señalización, tales como ERK, PI3K, Notch, MAPK, y NF- κ B. Además, ha sido comprobado que regulan negativamente tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa y que no se expresan en altas concentraciones en los tejidos o células no estimuladas, pero son codificadas por genes que se transcriben rápidamente después de ser inducidos por citocinas que señalizan a través de la vía JAK-STAT (Alexander, 2002; Liongue *et al.*, 2012; Wilson, 2014).

Las proteínas SOCS1 y SOCS3 son capaces de inhibir directamente la actividad tirosina cinasa de las proteínas JAKs, a través de su región inhibidora de kinasa (KIR), que se compone de 12 aminoácidos. También ambas moléculas han sido caracterizadas

ampliamente con respecto a su papel en la polarización de macrófagos de M1 a M2 (Babon et al., 2012; Qin et al., 2012).

Además de participar en la regulación de la vía de señalización JAK-STAT, existen muchas otras actividades de las proteínas SOCS en diferentes procesos biológicos, como en la maduración de células dendríticas, en la diferenciación de linfocitos T, en la polarización de macrófagos o en la inhibición de respuestas virales (Yoshimura *et al.*, 2007).

Fosfatasa de tirosinas específicas con dominio SH2 (SHP). Las proteínas tirosina fosfatasa (PTP) participan activamente en el control de activación de la vía JAK-STAT. A este grupo pertenecen SHP1 o PTPN6 y SHP2 o PTPN11. La primera se expresa predominantemente en células hematopoyéticas en todas sus etapas de maduración y se encuentra en bajos niveles en células epiteliales; por su parte, SHP2 se expresa de forma ubicua. Ambas fosfatasa están compuestas por dos dominios SH2 en su extremo N-terminal, un dominio catalítico central, y un extremo C-terminal con regiones de fosforilación de tirosina y en SHP2 una región rica en prolina (Figura 4) (Huang *et al.*, 2017; Lorenz, 2009).

SHP-1 regula negativamente la transducción de señales de citocinas por desfosforilación de JAK1 y JAK2 y está asociado a la cadena β del receptor de IL-13 y de eritropoyetina. En contraste, SHP-2 puede inhibir la señalización de citocinas a través del receptor gp130, así como regular negativamente a JAK cinasas y STAT a nivel citoplasmático (Liongue *et al.*, 2012; Wormald y Hilton, 2004). SHP2 es necesaria para activar la vía RAS-ERK. Sin embargo, dependiendo del tipo de célula o tejido, SHP2 propicia o regula negativamente la activación de PI3K-AKT y RHO, aumenta la fosforilación de STAT5 o disminuye la fosforilación de STAT3, además de poder afectar directamente la función de NF- κ B (Huang *et al.*, 2017).

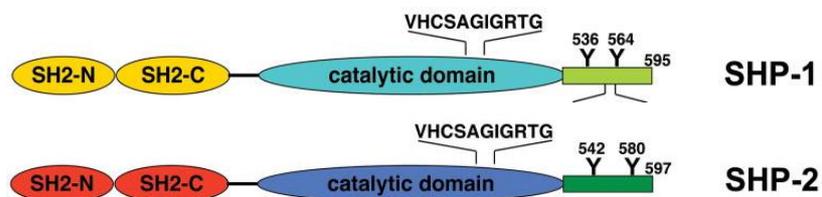


Figura 4. Modelo estructural de SHP-1 y SHP-2. Se muestran los dos dominios SH2 en su extremo N-terminal, un dominio catalítico central (con su secuencia característica VHCSAGIGRTG) y su extremo C-terminal con los posibles sitios de fosforilación de tirosina. Tomada y modificada de Lorenz, 2019.

Proteínas inhibidoras de la activación de STAT (PIAS). Cuatro moléculas son las que conforman la familia de las proteínas inhibidoras PIAS en mamíferos: PIAS1, PIAS3, PIASx y PIASy.

PIAS1 es un inhibidor específico de la activación de la transcripción mediada por STAT1, fue la primer proteína identificada y descrita dentro de este grupo. Por su parte, existe evidencia que demuestra que PIAS3 y PIASx pueden inhibir a STAT3 y STAT4 respectivamente, lo que muestra una clara especificidad de estos inhibidores por ciertas proteínas STAT.

Diversos experimentos han dilucidado los mecanismos por los cuales las proteínas PIAS pueden inhibir la actividad de STAT. Dichos mecanismos parecen diferir de unas proteínas con respecto a otras; PIAS1 y PIAS3 se unen a STAT1 y STAT3 respectivamente para inhibir la asociación con el ADN, mientras que PIASx y PIASy impiden la función de las STATs sin afectar la unión al ADN (Liongue *et al.*, 2012; Wormald y Hilton, 2004).

6. Activación de STAT3 y su regulación

La activación de un factor de transducción inicia con el estímulo de citocinas, factores de crecimiento u hormonas. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular (~25 kD) que son producidas por una gran variedad de tipos celulares en respuesta a un estímulo activador. Sus acciones pueden ser autocrinas, paracrinas y endocrinas e inducen respuestas mediante la unión a sus receptores específicos (Janeway *et al.*, 2009).

Para que se pueda activar STAT3 es necesario el estímulo de citocinas que se unan a los receptores asociados a este transductor de señal, entre ellas las interleucinas IL-6 e IL-10. La primera es una glicoproteína de 21 kDa producida por monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y células epiteliales intestinales. Es una citocina multifuncional que desempeña múltiples papeles tanto en las respuestas inmunes innatas y durante el desarrollo de la inmunidad adquirida contra los agentes patógenos invasores. Junto con otras citocinas de homología estructural, conforman la familia gp130, que usan una vía común de transducción de señales que involucra la fosforilación de las proteínas intracelulares Janus cinasas y en consecuencia las STAT a través del receptor heterodímero IL-6R/gp130. IL-6 promueve la fosforilación activa de STAT3 y en menor proporción la de STAT1 (Hirano *et al.*, 2000; Saavedra *et al.*, 2011).

La interleucina 10 es una proteína no glucosilada de 18 kDa producida por linfocitos T y macrófagos activados. Regula la diferenciación y proliferación de células inmunes como las células T, células B y granulocitos; se caracteriza por sus mecanismos inmunorreguladores ejercidos al inhibir varias respuestas funcionales de células T, monocitos, macrófagos y neutrófilos, reduciendo la producción de IFN- γ , IL-2, TNF- α y NO. Estas funciones se ejercen a través de la unión a su receptor IL-10R, el cual pertenece a la familia de receptores de citocina de clase II (similar a receptores de interferones), conduciendo a la activación de JAK1 y a la fosforilación del factor de transcripción STAT3 (Benkhart *et al.*, 2000; Berlato *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2002).

Después de la dimerización de los receptores inducidos por los ligandos IL-6 o IL-10, las cinasas asociadas, JAK1 y JAK2, se unen a los residuos de tirosina de las subunidades del receptor gp130 o IL-10R. El dominio SH2 de STAT3 se une a las tirosinas recientemente fosforiladas, procedido de la fosforilación de la tirosina Y705 de STAT3. Dos monómeros de STAT3 fosforilados se dimerizan y translocan al núcleo, donde activan la transcripción de distintos genes con actividad biológica diversa. SOCS3, el principal regulador negativo de la señalización dependiente de IL-6, es altamente inducido por STAT3 activado, inhibiendo fuertemente la fosforilación de STAT3 y participando activamente con otros mecanismos reguladores negativos adicionales para evitar la activación excesiva de STAT3 y la expresión de genes que promueva (Figura 5) (Wang *et al.*, 2013).

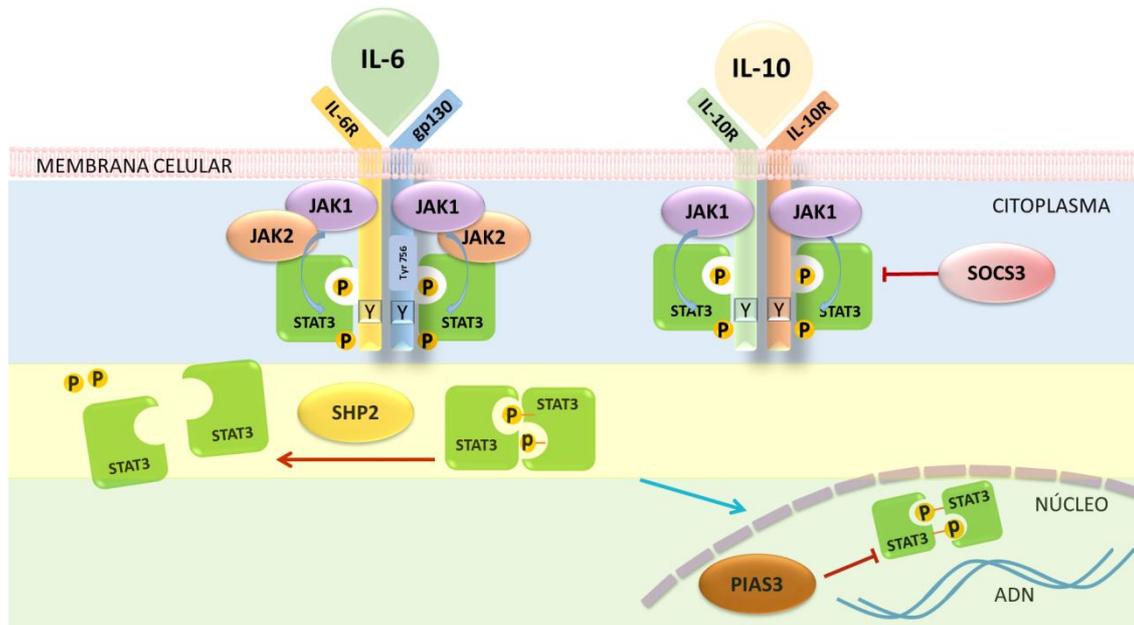


Figura 5. Señalización de IL-6 e IL-10 a través de STAT3. La citocina IL-6 se une a su receptor compuesto por IL-6R α y gp130. Posteriormente se activan JAK1, JAK2 o TYK2 y promueven la fosforilación de STAT3. En contraste, el receptor de unión a IL-10 está compuesto por las subunidades IL-10RI y II, la primera se asocia a JAK1 y es la que participa principalmente en la señalización a través de STAT3. SOCS3 suprime directamente a JAK1, JAK2 y TYK2 bloqueando la capacidad enzimática del dominio JH1, además puede unirse a la tirosina fosforilada de la subunidad gp130 (Tyr759) inhibiéndola. SHP2 es una fosfatasa con capacidad de desfosforilar los homodímeros de STAT3 haciéndolos incapaces de traslocar al núcleo. PIAS3 modula la expresión de genes liderada por STAT3 al inhibir su unión directa al ADN.

JUSTIFICACIÓN

Taenia crassiceps es un parásito capaz de modular la respuesta inmune desencadenando cambios evidentes en cuanto a poblaciones celulares se refiere, en una infección a corto plazo los macrófagos muestran una activación clásica y a largo plazo una activación alternativa donde producen altos niveles de IL-10 asociados a una respuesta TH2, caracterizada por alta producción de IL4, IL-13 e IL-5. Muchas de estas respuestas son gracias a la activación de la vía JAK-STAT, principalmente mediante la activación de STAT3. No obstante, así como tan importante es su activación también lo es su control y regulación, por ello es necesario conocer cómo podrían verse alteradas las proteínas reguladoras negativas durante la infección por *T. crassiceps*, y así conocer más detalladamente los mecanismos de inmuno-modulación generados por este helminto.

Además, la comprensión de las estrategias de supervivencia y mecanismos de modulación de la respuesta inmune por los parásitos ofrece una visión única de la interacción entre patógenos y sus hospedadores, lo cual puede conducir al desarrollo de nuevas herramientas para controlar enfermedades infecciosas o para aprovechar a los parásitos contra de patologías inflamatorias, representando una alternativa al uso de medicamentos preexistentes que en su mayoría muestran efectos secundarios en los pacientes.

HIPÓTESIS

La infección experimental de ratones con el parásito *Taenia crassiceps* tendrá un efecto regulador en el proceso de activación de las proteínas reguladoras SOCS3, SHP1-2 y PIAS3 las cuales, a su vez, controlan la inhibición de STAT3.

OBJETIVOS

Objetivo general

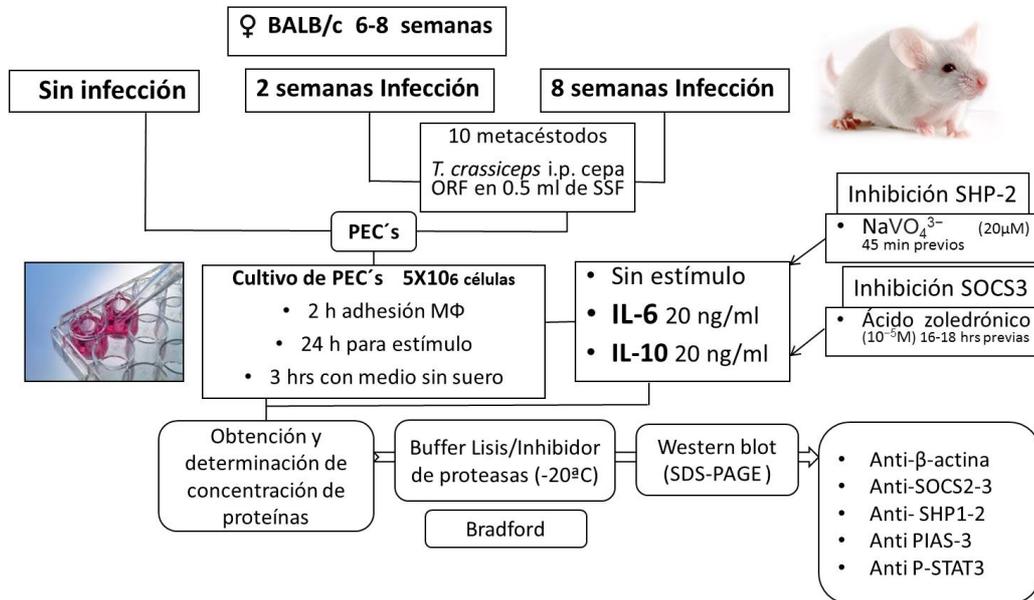
Caracterizar el perfil de activación por su nivel de producción y/o fosforilación de las proteínas reguladoras negativas SOCS3, SHP1-2 y PIAS3, así como su efecto en la fosforilación de STAT3 en macrófagos peritoneales durante la infección con *Taenia crassiceps* en ratones.

Objetivos particulares

- ❖ Analizar los niveles de producción y fosforilación de las proteínas supresoras SOCS3, SHP1-2 y PIAS3 de macrófagos peritoneales provenientes de la infección a las dos y ocho semanas con *T. crassiceps*.
- ❖ Determinar si la activación de STAT3 frente a IL-6 e IL-10 presenta diferencias al ser inhibida la proteína SOCS3 en macrófagos peritoneales provenientes de la infección.
- ❖ Evaluar si la inhibición de fosfatasa en macrófagos provenientes de ratones infectados con *T. crassiceps* ejerce un efecto en la síntesis de las proteínas supresoras SHP1-2 y si esto a su vez tiene un impacto en la fosforilación de STAT3

MÉTODOS

Diseño experimental



1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de seis a ocho semanas de edad, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; donde se mantuvieron en condiciones estériles estándares durante el tiempo requerido hasta su sacrificio. Se formaron tres grupos de cinco ratones cada uno, conformando un grupo control al que no se le indujo la infección, un grupo de infección a corto plazo con el parásito (dos semanas de infección) y un tercer grupo de infección a largo plazo (ocho semanas de infección).

La infección experimental se sincronizó de tal manera que coincidieran las fechas de sacrificio de los tres grupos, llevándose a cabo en cámaras de CO₂ siguiendo los procedimientos de cuidado y manejo de animales bajo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

2. Infección experimental

Los ratones se infectaron con 10 metacístodos de *T. crassiceps* (cepa ORF) i. p. utilizando como vehículo 0.5 ml de SSF. Los cisticercos se extrajeron previamente de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c con ocho a diez semanas de infección. Los parásitos se lavaron cuatro veces con SSF y fueron seleccionados aquellos que no presentaran gemas y con un tamaño menor a dos milímetros.

3. Obtención y cultivo de células de exudado peritoneal (PECs)

Se colectó el exudado de células por lavado de la cavidad peritoneal de los tres grupos de ratones inyectando cinco a seis mililitros de SSF. El exudado obtenido se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, la pastilla se resuspendió y se agregó uno a dos ml de medio de cultivo RPMI completo (medio suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina/estreptomicina). La viabilidad celular se evaluó por exclusión con azul de Tripano y las células se contaron con una cámara de Neubauer. Las células se ajustaron a 5×10^6 células/ml y se sembraron en placas de seis pozos (Sarstedt) con un mililitro de medio RPMI. Se dejaron dos horas en la incubadora a 37 °C con un ambiente de CO₂ al 5 %, para permitir que los macrófagos se adhirieran a la placa de cultivo. Transcurrido este tiempo, se removieron las células no adherentes lavando las placas con SSF y posteriormente se agregó medio de cultivo fresco y se mantuvieron en las mismas condiciones hasta la experimentación.

4. Estimulación de macrófagos *in vitro* y obtención/determinación de proteínas

Se hizo un lavado de las células con SSF a 37 °C 24 horas después del lavado de células no adherentes, luego se agregó 1 ml de medio RPMI sin suero a cada pozo y se mantuvieron en incubación por tres horas, esto con la finalidad de disminuir probabilidad de efectos de las proteínas contenidas en el suero adicionado en el medio sobre la activación de las proteínas a evaluar. Posteriormente se efectuó el estímulo con IL-6 recombinante murina (20 ng/ml, PeproTech) e IL-10 (20 ng/ml, PeproTech) por 20 minutos a 37°C, concentraciones determinadas previamente a través de una curva temporal (Reyes, 2015). La inhibición de la fosfatasa SHP2 se efectuó con 20 μ M de ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) 45 minutos previos al estímulo con las citocinas (Becerra & Terrazas, 2014), la viabilidad celular se corroboró al microscopio con azul Tripano.

Para la inhibición de SOCS3 se utilizó ácido zoledrónico (ZA), 10^{-5} M por 16–18 hrs previas al estímulo con las interleucinas. Después de este tiempo se retiró el estímulo y se lisaron las células utilizando buffer de lisis frío (20mM Tris-HCl pH=8, 2mM EDTA, 137mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100 y 1% de inhibidor de proteasas/fosfatasas). Se colectaron los lisados, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y se mantuvieron a -70 °C hasta su análisis.

5. Western blot

5.1 Electroforesis. Se efectuó la electroforesis de proteínas en SDS-PAGE con geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, colocando 30 μ g de proteína por carril. La electroforesis se realizó utilizando cámaras Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) en buffer de corrida (Tris 25 mM, SDS 0.1%, glicina 250 mM) a 90 V, 150 mA por dos horas. En todas las corridas electroforéticas se utilizaron marcadores de peso molecular de amplio rango Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

5.2 Inmunodetección. Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas en cámara húmeda Mini omniPAGE Sub Blot (Cleaver Scientific Ltd) a membranas de PVDF (Millipore). Previamente, tanto el gel, la membrana como las almohadillas de transferencia fueron equilibrados en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20 %) y el proceso se llevó a cabo durante 100 min a 80 V.

Se eliminaron las uniones inespecíficas incubando las membranas durante dos horas a 37 °C en una solución de leche descremada al 5 % en PBS (bloqueo). Se incubaron con una dilución de Ab primarios (Tabla 2) toda la noche a 4 °C y después se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween 20 al 0.1 %. Posteriormente se incubó con una dilución del Ab secundario acoplado a HRP anti ratón o conejo, dependiendo del Ab primario utilizado, por dos horas a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas en las condiciones previamente descritas. Para la detección de las proteínas de interés se usó el reactivo quimioluminiscente West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) de acuerdo al protocolo detallado por el fabricante y se visualizó mediante luminiscencia en el equipo LI-COR C-DiGit Blot Scanner.

Para todas las muestras, la cantidad de proteína colocada en el gel se relativizó a su correspondiente control de carga (actina). El parámetro semicuantitativo utilizado fue la intensidad de la banda, que se cuantificó por densitometría utilizando el Software LI-COR Image Studio 4.0.

Para determinar la presencia de otras moléculas en los extractos celulares, las membranas fueron lavadas con Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) de 15-30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron nuevamente en el bloqueo.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en Western blot.

Anticuerpo	Isotipo	Marca	Dilución
Anti- β -actina	Rabbit IgG	Biolegend	1:1000
Anti-STAT3 total	Rabbit IgG	Biolegend	1:500
Anti- STAT3 fosforilado	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:2000
Anti-SOCS3	Mouse IgG2	Biolegend	1:5000
Anti-SHP1 fosforilado	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:2000
Anti-SHP2 fosforilado	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:2000
Anti-PIAS3	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
HRP Donkey anti-rabbit IgG	Donkey Ig	Biolegend	1:5000
HRP Goat anti-mouse IgG	Goat Ig	Biolegend	1:10000

Se muestran las cantidades de anticuerpo utilizadas para la inmunodetección de la proteína de interés.

6. Análisis estadístico. Los datos fueron analizados comparando el grupo de células provenientes de ratones sin infección y dos grupos de células provenientes de ratones con dos y ocho semanas de infección con los diferentes estímulos de recombinantes (Interleucinas IL-6 e IL-10), ácido zoledrónico y ortovanadato de sodio. Por cada grupo la n fue de 10 individuos con 3 repeticiones por experimento. El análisis estadístico se efectuó mediante la prueba estadística paramétrica de ANOVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar los grupos entre los que hubo diferencias significativas (*P<0,05; **P<0,01) con el programa GraphPad Prisma 6. El análisis y procesamiento digital densitométrico se efectuó mediante el Software LI-COR Image Studio 4.0.

RESULTADOS

Las proteínas reguladoras negativas que tienen actividad sobre el factor de transducción STAT3 son principalmente SOCS3, SHP1, SHP2 y PIAS3. El presente estudio se enfocó en la caracterización del perfil de activación de dichas proteínas en macrófagos murinos obtenidos durante la infección con *Taenia crassiceps*. Para analizar la respuesta de activación de estas moléculas en función de su activación celular se desarrolló un modelo de infección murina a corto y largo plazo para obtener los macrófagos peritoneales que se reclutan al sitio de infección. Las citocinas candidatas para evaluar la activación de dichas proteínas fueron IL-6 e IL-10, las cuales inducen la fosforilación de STAT3.

1. Activación de la proteína SOCS3 durante la infección con *Taenia crassiceps*.

La primera parte de este trabajo consistió en analizar los niveles de la proteína SOCS3, la cual, en orden de participación a nivel celular en la vía de señalización, es la primera en actuar para inhibir la activación de STAT3 (Figura 6).

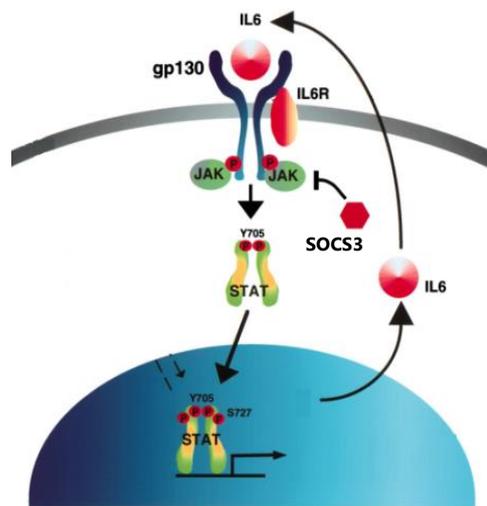


Figura 6. Mecanismo de regulación de SOCS3 sobre la vía JAK/STAT. Los miembros de la familia SOCS se unen con residuos de tirosina fosforilados de las proteínas JAK, bloqueando y suprimiendo su actividad. Interactúan con la maquinaria de ubiquitinación celular a través de la caja SOCS y a las JAKs o receptores para su degradación proteosomal. Tomado y modificado de Greenhalgh, C. & Hilton, D. 2001.

1.1 La infección a corto y largo plazo con *Taenia crassiceps* induce mayores niveles de la molécula supresora SOCS3 en macrófagos peritoneales.

Estudios previos en tejidos y células deficientes en SOCS3 han mostrado que la activación prolongada de STAT3 inducida por IL-6 son evidencia convincente de que SOCS3 es un regulador fisiológico clave de la señalización de IL-6, como en el caso de células hepáticas *in vivo* y macrófagos en cultivo (Crocker *et al.* 2003). Para conocer cuál es el efecto que ejerce *Taenia crassiceps* sobre la señalización de IL-6 a través de STAT3 en macrófagos peritoneales murinos se determinaron los niveles de SOCS3 por western blot en estas células. También se analizó el efecto del parásito sobre SOCS3 en respuesta a IL-10, otra citocina que también ejerce sus funciones a través del mismo factor de transducción, aunque con diferentes funciones sobre las células. Observamos niveles basales de SOCS3 en células de ratones sanos, dichos niveles no se modifican por el estímulo con las citocinas IL-6 e IL-10. En cambio, las proteínas provenientes de macrófagos de ratones con dos y ocho semanas de infección, mostraron un aumento en los niveles de la proteína SOCS3 en condiciones basales y no presentaron diferencias significativas entre grupos estimulados por las citocinas (Figura 7).

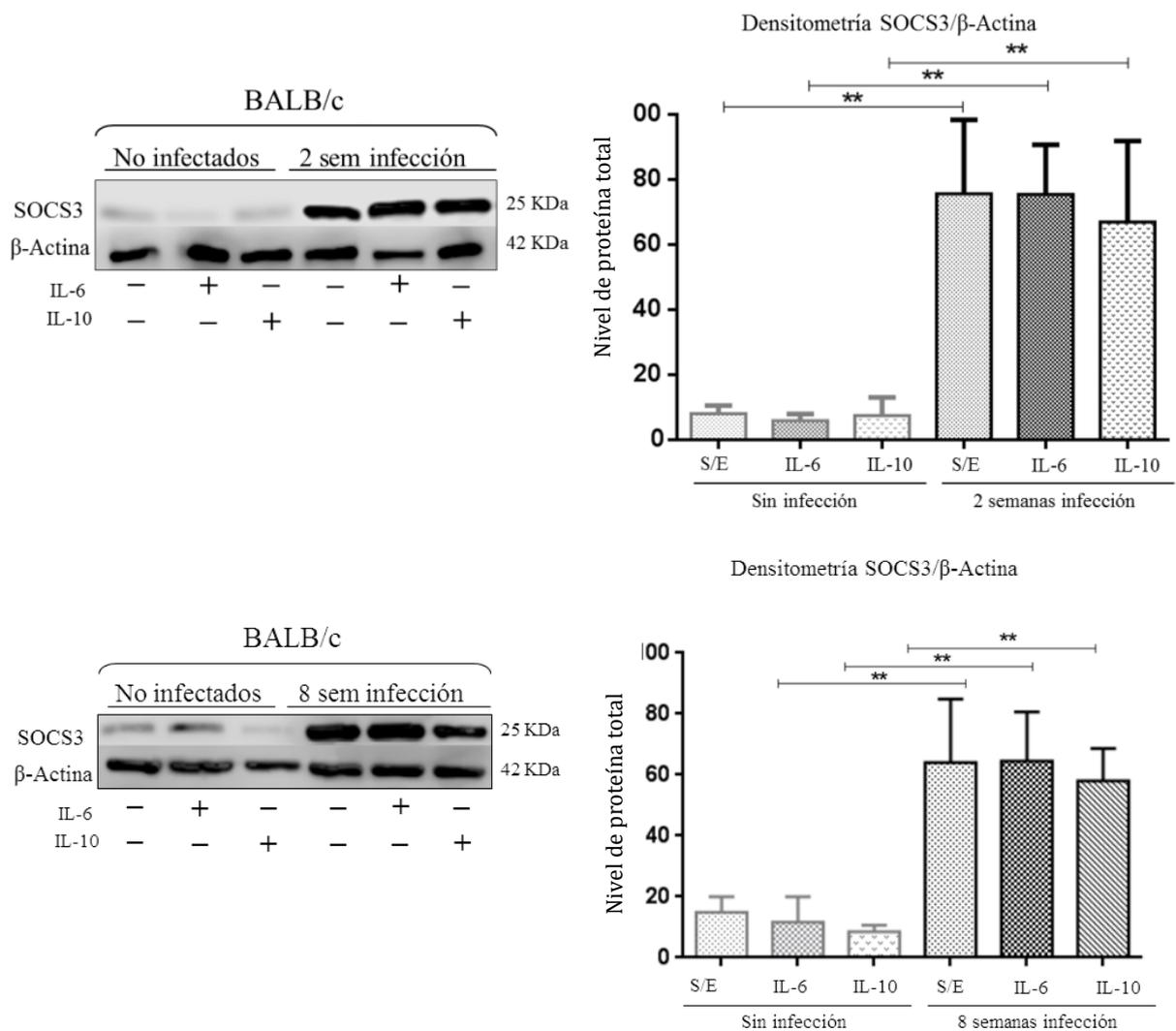


Figura 7. Niveles de la proteína supresora SOCS3 en macrófagos peritoneales de infección a corto y largo plazo con *Taenia crassiceps*. Los macrófagos fueron tratados con IL-6 (20ng/ml) e IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó por western blot la presencia de SOCS3 y actina como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes; ** $P < 0,01$; por ANOVA y post-test de Tukey.

1.2 La fosforilación de STAT3 y los niveles de la proteína supresora SOCS3 son inhibidos por el ácido zoledrónico en macrófagos peritoneales de la infección a largo plazo con *Taenia crassiceps*.

Para valorar que los altos niveles de SOCS3 no se debieron al aumento de la fosforilación de STAT3 se prosiguió a inhibir esta proteína reguladora para analizar su efecto sobre dicho factor de transducción. El ácido zoledrónico es un medicamento que pertenece a la clase de los llamados bisfosfonatos, esta droga ha sido utilizada en el tratamiento de osteoporosis y previamente se ha evaluado su acción sobre los niveles de SOCS3 en macrófagos (Scheller *et al.* 2011). Al utilizar 18 horas previas el ácido zoledrónico sobre los macrófagos *in vitro* logramos observar un efecto en la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-6 e IL-10 en proteínas provenientes de macrófagos de ratones infectados con *T. crassiceps* a las ocho semanas. Esta disminución significativa tuvo efecto directo sobre la disminución de los niveles de SOCS3 en las mismas células, dado que SOCS3 es inducido por la acumulación de STAT3-P en el núcleo y al no estar fosforilada se imposibilita su traslación a dicho orgánulo (Figura 8).

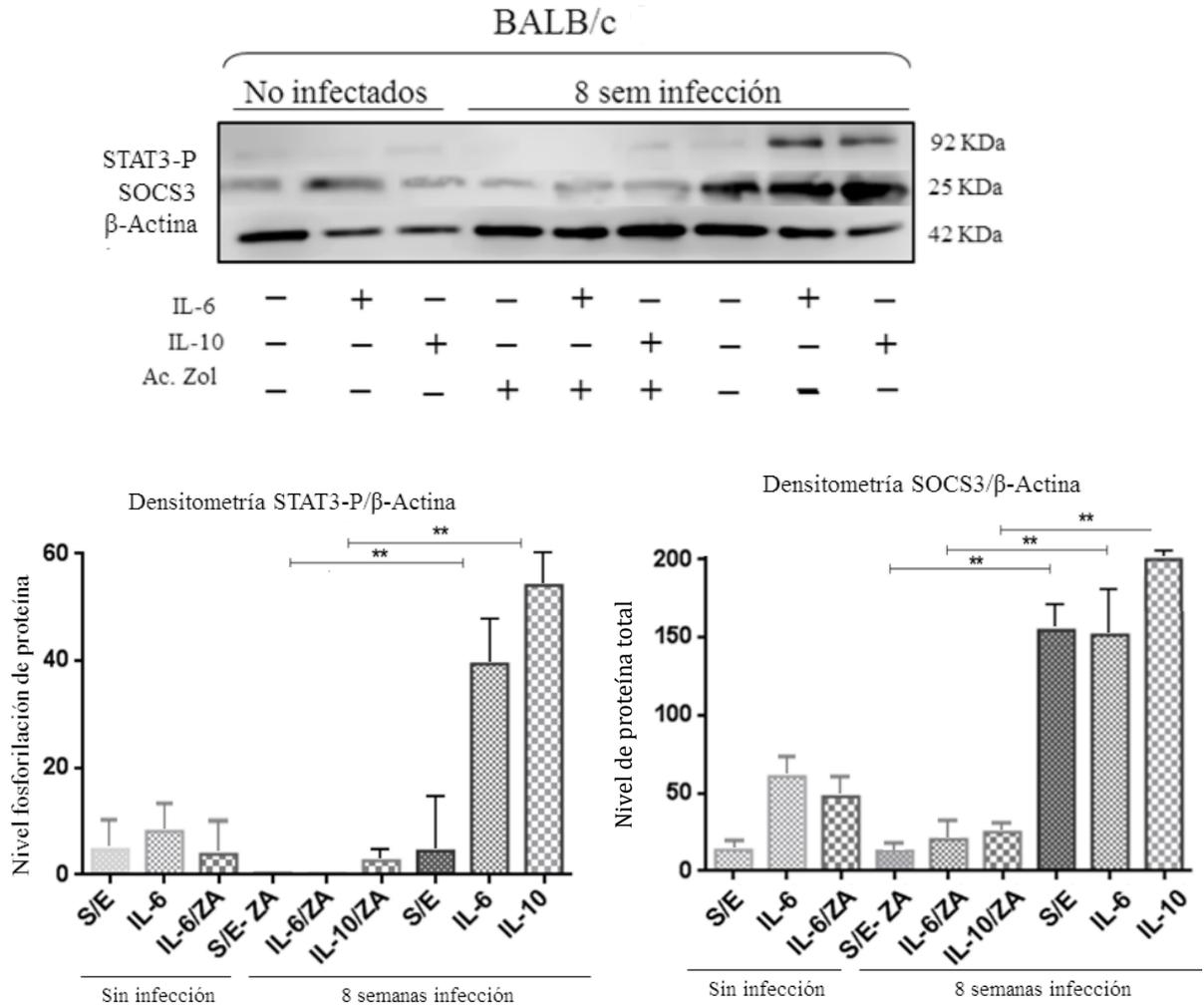


Figura 8. Fosforilación de STAT3 y niveles de la molécula supresora SOCS3 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con *Taenia crassiceps*. Los macrófagos fueron tratados 18 hrs previas con ácido zoledrónico (ZA) 10^{-5} M, posteriormente con IL-6 (20ng/ml) e IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó por western blot STAT3P, SOCS3 y actina como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes; ** $P < 0,01$; por ANOVA y post-test de Tukey. (S/E = Sin estímulo)

2. Activación de las proteínas SHP1 y SHP2 en macrófagos provenientes de la infección con *Taenia crassiceps*.

En la segunda etapa de este trabajo se evaluaron los niveles de activación de las moléculas inhibitoras tirosin fosfatasas SHP1 y SHP2. Como se mencionó anteriormente, estas proteínas tienen especificidad por las proteínas JAK y especialmente SHP2 actúa directamente sobre la vía activada por STAT3. Su participación es a nivel citoplasmático, impidiendo la fosforilación sostenida de STAT3 y en consecuencia inhibe la formación de homodímeros de este factor de transcripción (Figura 9).

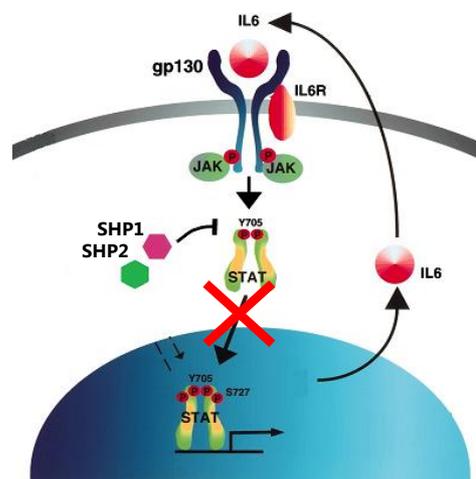


Figura 9. Mecanismos de regulación negativa de SHP1 y SHP2. SHP-1 regula negativamente por defosforilación de JAK1 y JAK2. SHP-2 puede inhibir la señalización de citocinas a través de defosforilación del receptor gp130, así como sobre JAK cinasas y STAT3 a nivel citoplasmático, impidiendo la translocación del homodímero de STAT3 al núcleo. Tomado y modificado de Greenhalgh, C. & Hilton, D. 2001.

2.1 La infección a largo plazo con *Taenia crassiceps* induce el incremento en los niveles de la fosfatasa SHP1 en macrófagos peritoneales.

La fosforilación y defosforilación de tirosinas en distintas proteínas representan eventos reguladores clave en diferentes vías de transducción. Dicha regulación está determinada por la actividad de las proteínas tirosina cinasas y las proteínas tirosina fosfatasas. En esta parte del estudio se analizó el efecto que tiene el parásito sobre las proteínas tirosina fosfatasas SHP1 Y SHP2 que actúan en la vía JAK-STAT, ya que representan un blanco idóneo para poder manipular la respuesta inmune de los macrófagos, favoreciendo así su establecimiento en el huésped.

En la figura 10 se muestra el análisis de los niveles de fosforilación de SHP1 por medio de western blot. Se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones sanos y de ocho semanas de infección, posteriormente se obtuvieron los lisados totales y se determinó la presencia de dicha fosfatasa. Se observó que la infección a largo plazo con *T. crassiceps* indujo el incremento de la proteína SHP1 en los macrófagos peritoneales, en contraste con el grupo control. El estímulo con IL-6 e IL-10 en macrófagos de ratones sanos no hubo diferencias significativas; la estimulación con las mismas citocinas en macrófagos provenientes de animales infectados no indujo cambios en los niveles de SHP1.

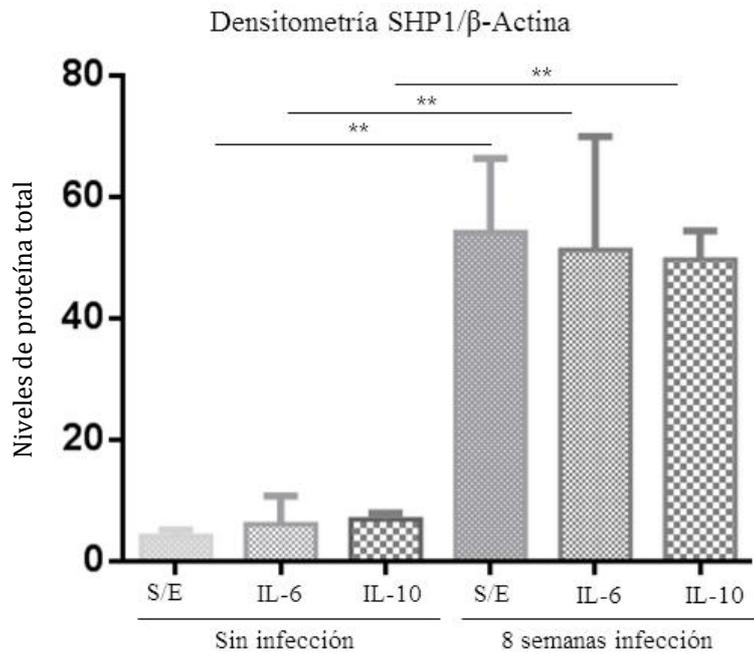
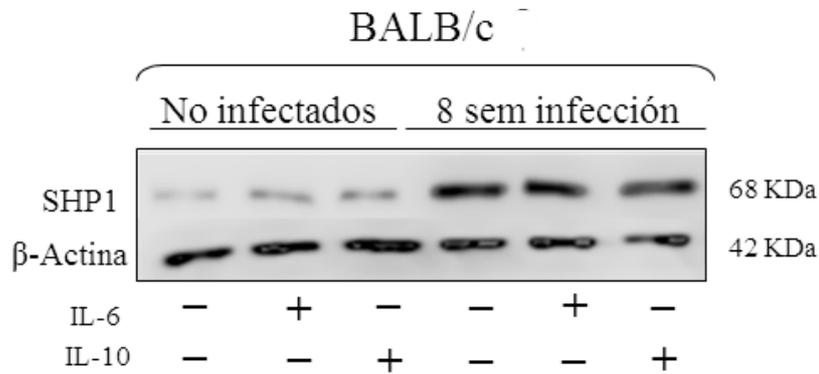


Figura 10. Niveles de la fosfatasa SHP1 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con *Taenia crassiceps*. Los macrófagos fueron tratados con IL-6 (20ng/ml) e IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó por western blot la presencia de SHP1 y actina como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes; **P<0,01; por ANOVA y post-test de Tukey.

2.2 La infección a corto y largo plazo con *Taenia crassiceps* induce el incremento en los niveles de la fosfatasa SHP2 en macrófagos peritoneales.

SHP2 es una fosfatasa que tiene mayor afinidad por el transductor de señal STAT3, por ello su análisis aportó datos más específicos sobre los efectos directos sobre este transductor de señal. En la figura 10 se muestra la fosforilación de SHP2 analizada por western blot. Se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones sanos, de dos y de ocho semanas de infección con *Taenia crassiceps*, posteriormente se obtuvieron las proteínas de los lisados totales y se determinó la concentración de la fosfatasa SHP2.

La infección a corto y largo plazo con *T. crassiceps* indujo un incremento de la proteína SHP2 en los macrófagos peritoneales en contraste con el grupo control. El estímulo con IL-10 en macrófagos de ratones sanos indujo un leve aumento de SHP2, pero en macrófagos provenientes de la infección estimulados con IL-6 o IL-10 no se produjo ningún cambio significativo en sus niveles. También se observó aumento en los niveles de esta fosfatasa en macrófagos expuestos a ocho semanas de infección frente a los de dos semanas a nivel basal (es decir, sin ser estimulados con las interleucinas recombinantes) (Figura 11).

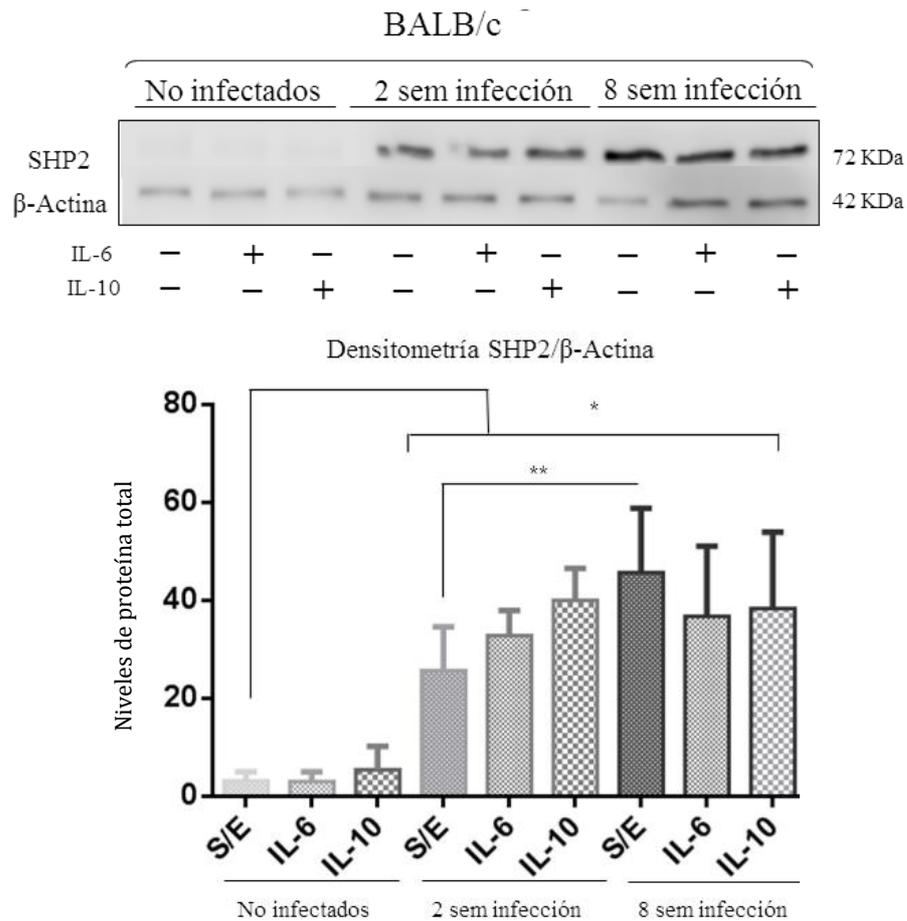


Figura 11. Niveles de la fosfatasa SHP2 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con *Taenia crassiceps*. Los macrófagos fueron tratados con IL-6 (20ng/ml) e IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó por western blot la presencia de SHP2 y actina como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes; *P<0,05, **P<0,01; por ANOVA y post-test de Tukey.

2.3 La inhibición de SHP2 con ortovanadato de sodio permite el incremento de la fosforilación de STAT3 en macrófagos peritoneales.

El ortovanadato de sodio es un compuesto de vanadio que tiene dentro de sus funciones la inhibición de proteínas tirosina fosfatasas, como SHP1 y SHP2. Ambas han sido implicadas como reguladores clave de la fosforilación en tirosina de diferentes proteínas. En la figura 12 se observa el efecto que el ortovanadato ejerció sobre los niveles de SHP2. El ortovanadato de sodio se agregó 45 minutos previos al estímulo con IL-6. La disminución de los niveles de SHP2 se observó a partir de los 40 minutos de exposición a IL-6. Además, se observó un incremento en la fosforilación de STAT3 al estar inhibida la

fosfatasa, dicho incremento es más evidente a los 20 minutos de estímulo con IL-6. Esto sugiere que el punto principal de regulación de fosforilación de STAT3 es por SHP2.

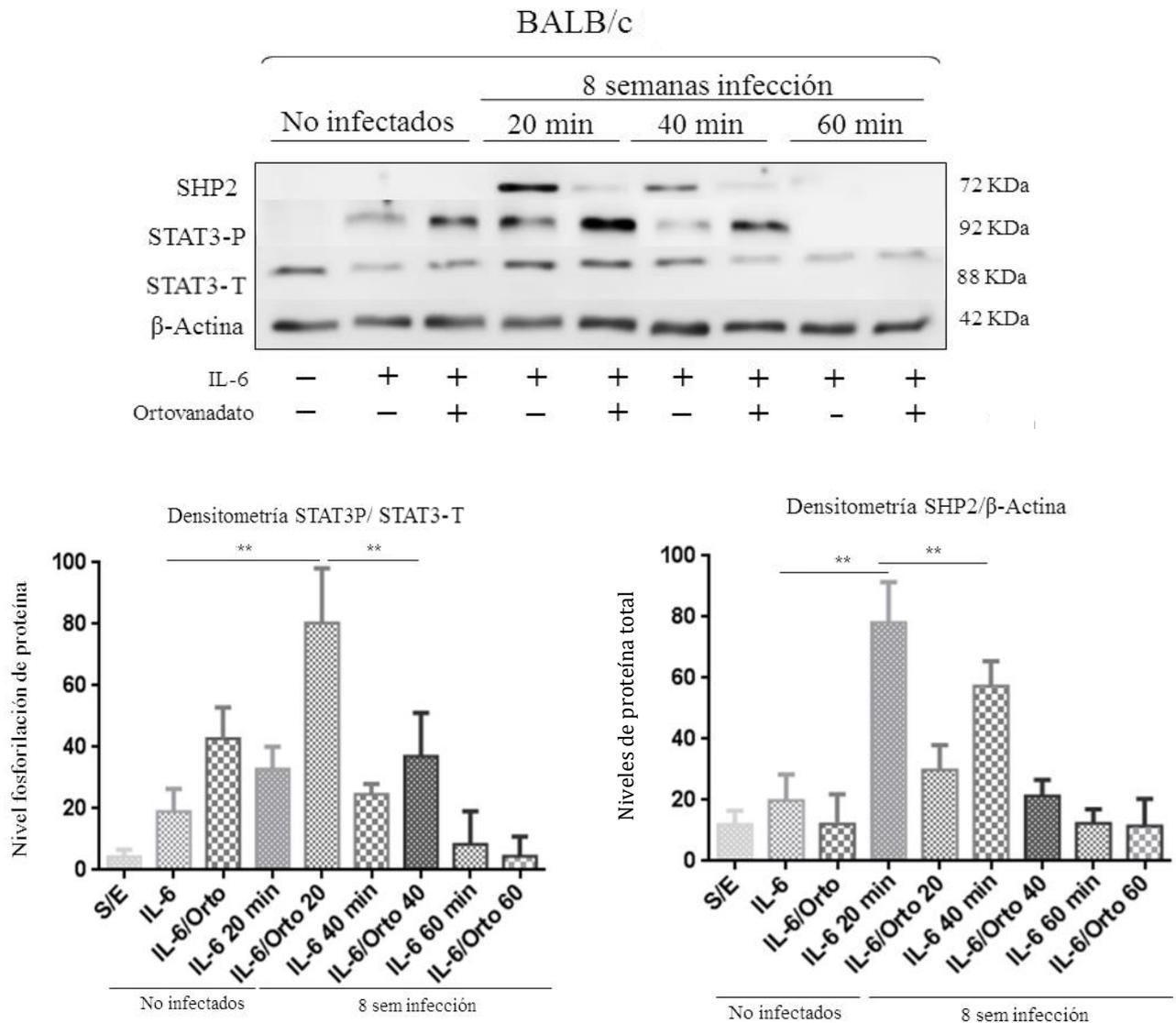


Figura 12. Fosforilación de STAT3 y niveles de la fosfatasa SHP2 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con *Taenia crassiceps*. Los macrófagos fueron tratados 40 min previos con ortovanadato de sodio (20μM), posteriormente con IL-6 (20ng/ml) e IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó por western blot STAT3P, SHP2 y STAT3 total o actina como control de carga respectivamente. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes; *P<0,05; **P<0,01; por ANOVA y post-test de Tukey.

El mismo fenómeno se observó con el estímulo de la citocina IL-10, presentando un incremento significativo en la fosforilación de STAT3 con esta citocina en comparación con el observado con IL-6 (Figura 13).

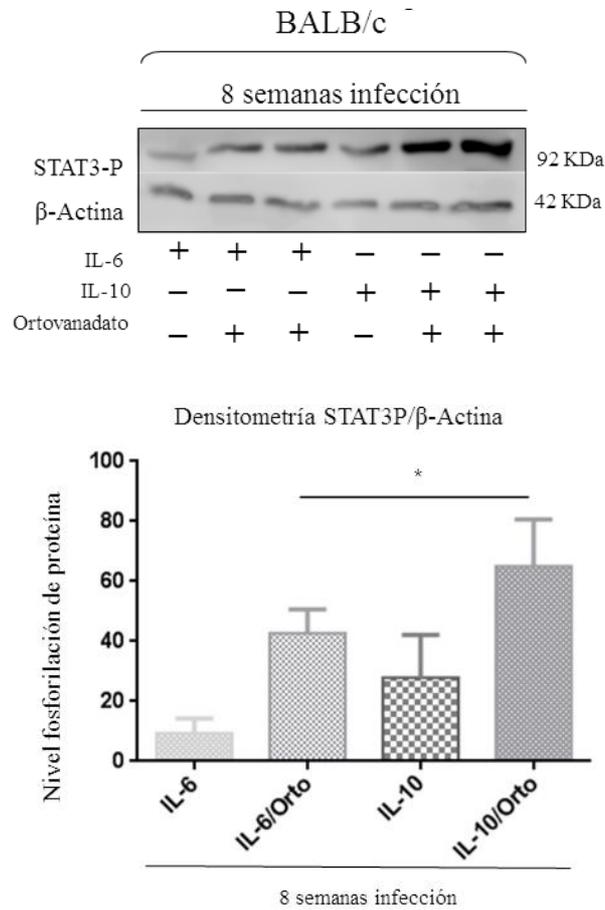


Figura 13. Fosforilación de STAT3 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con *Taenia crassiceps*. Los macrófagos fueron tratados 40 min previos con ortovanadato de sodio (20 μ M), posteriormente con IL-6 (20ng/ml) e IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó por western blot la fosforilación de STAT3 y actina como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes; *P<0,05; por ANOVA y post-test de Tukey.

3. Activación de la proteína PIAS3 frente a *Taenia crassiceps*.

Finalmente se evaluó los niveles de activación de la molécula inhibidora PIAS3. Como se mencionó anteriormente, esta proteína tiene especificidad sobre el factor de transducción STAT3. Su participación es a nivel nuclear, impidiendo la unión del dímero de STAT3P a la secuencia promotora de ADN para generar la expresión de genes específicos (Figura 14).

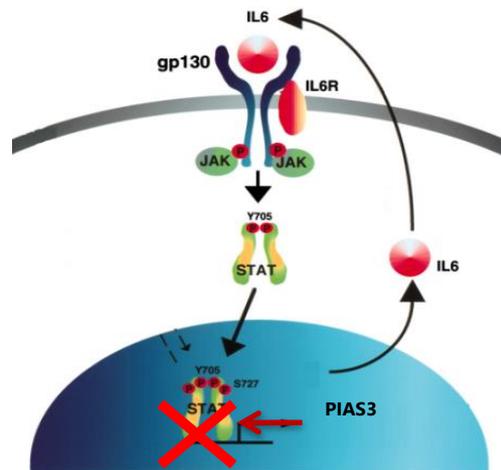


Figura 14. Mecanismos de regulación negativa de PIAS3. Las moléculas PIAS se unen a los dímeros de STAT activos e impide su unión al ADN. Tomado y modificado de Greenhalgh, C. & Hilton, D. 2001.

3.1 La infección a largo plazo con *Taenia crassiceps* no induce el incremento significativo en los niveles de PIAS3 en macrófagos peritoneales.

En la figura 15 se muestran los niveles de PIAS3 a través de un análisis por western blot, se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones sanos y de 8 semanas de infección, se obtuvieron los lisados totales y se determinó la presencia de la proteína PIAS3. Previamente se efectuó un ensayo para comprobar el tiempo requerido para detectar los mayores niveles de esta proteína con el estímulo de las citocinas y se estableció que 60 minutos eran necesarios para este fin. Observamos que la infección a largo plazo con *Taenia crassiceps* indujo una tendencia de incremento en los niveles de la proteína PIAS3 en macrófagos peritoneales, en contraste con el grupo control, sin mostrarse diferencias significativas. El estímulo con IL-6 o IL-10 en macrófagos provenientes de animales con la infección no indujo cambios en los niveles de PIAS3.

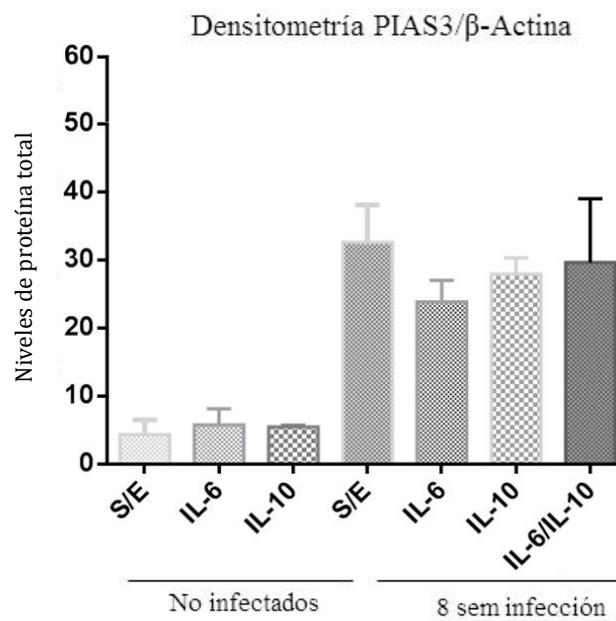
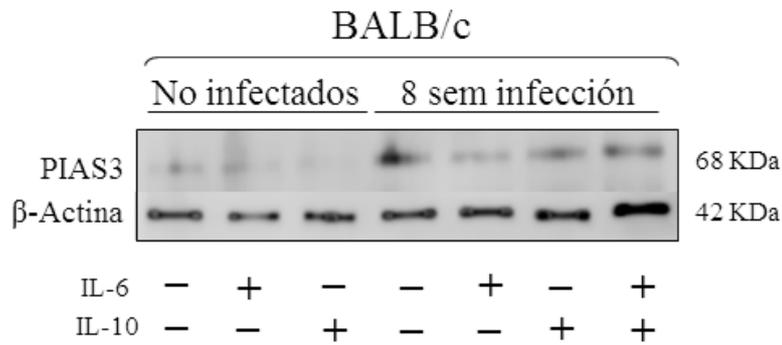


Figura 15. Niveles de la proteína PIAS3 en macrófagos peritoneales de infección a largo plazo con *Taenia crassiceps*. Los macrófagos fueron tratados con IL-6 (20ng/ml) e IL-10 (20ng/ml) durante 60 min. Se determinó por western blot la presencia de PIAS3 y actina como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Taenia crassiceps es un parásito que ha sido utilizado como modelo en el estudio de las interacciones parásito-huésped en la cisticercosis y en diferentes estudios se pudo observar que desencadena una respuesta inmune que polariza a un perfil de tipo Th2, coincidiendo con lo reportado en infecciones causadas por otros parásitos helmintos (Maizels *et al.*, 2009). La respuesta inmunológica desencadenada por los parásitos también ha sido asociada a los cambios fenotípicos de los macrófagos frente a los microambientes cambiantes que se presentan en el huésped.

El presente estudio se ha centrado en el análisis de los mecanismos de modulación que ejerce *T. crassiceps* sobre los macrófagos y sus moléculas reguladoras negativas de la vía JAK-STAT, específicamente aquellas que tienen un efecto sobre la activación del factor de transcripción STAT3. La activación, modificación y manipulación de esta vía de señalización puede representar un claro ejemplo de ese diálogo interpuesto entre parásito-huésped, que no es más que el resultado de una coevolución en el largo periodo de su existencia.

La activación de STAT3 mediante la fosforilación de sus residuos de tirosina es esencial para el desarrollo de una respuesta inflamatoria normal frente a patógenos invasores y se mantiene bajo control por proteínas reguladoras negativas. Este punto representa un blanco perfecto para que *Taenia crassiceps* promueva cambios a favor de su establecimiento en el huésped. La activación anormal de STAT3 se produce cuando la regulación negativa no es completamente efectiva, fenómeno que se ha observado incluso en otras patologías como cáncer y enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide (Heneghan *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2013).

En el presente estudio y trabajos previos realizados en el laboratorio se observó que la activación de STAT3 está siendo potenciada por la infección con *T. crassiceps* al estimular macrófagos peritoneales de animales sanos y con postinfección a corto y largo plazo con IL-6 e IL-10 (Reyes, 2015), conociendo previamente que ambas citocinas inducen fuertemente la fosforilación de STAT3 (Yakusawa *et al.*, 2003). La fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-10 es mayor a los niveles de fosforilación producidos por IL-6 en células de ratones sin infección y con infección, demostrando que la activación de STAT3 no solo es potenciada por la infección, sino que responde de forma más eficiente a IL-10, fenómeno también documentado con el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*, donde los parásitos vivos

inducen una rápida activación y acumulación nuclear de STAT3 en macrófagos (Butcher *et al.*, 2005).

Además, en este trabajo también se demostró que los niveles sostenidos de SOCS3 son promovidos por la presencia del parásito en los macrófagos peritoneales murinos y en estudios previos se habían descrito también con este mismo modelo (Becerra & Terrazas, 2014). SOCS3 es el principal regulador negativo de STAT3; la síntesis de STAT3 es inducida por esta misma proteína una vez que es fosforilada, por lo que es difícil dilucidar porque no se logran disminuir los niveles de fosforilación de STAT3 en presencia de los altos niveles de SOCS3.

Hay que considerar que la fosforilación de STAT3 se puede dar a partir de la activación de diferentes receptores, uno de ellos es el activado por la IL-10. Por lo tanto, los mecanismos de acción de SOCS3 subyacen en su capacidad selectiva y efectora sobre las moléculas que inhibe. Esta proteína se une específicamente a tirosinas fosforiladas de receptores de citocinas como el residuo Tyr759 de la subunidad gp130 (Bjorbak *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2000), por ello podría considerarse que SOCS3 es un supresor relativamente específico de IL-6 (Fernando *et al.*, 2014). La señalización de esta interleucina comienza con la unión al receptor IL-6R α y a la subunidad gp130, la cual se asocia con JAK1, JAK2 o TYK2, activándolas y promoviendo la fosforilación de STAT3. En contraste, el receptor de unión a IL-10 está compuesto por las subunidades IL-10RI y II, la primera se asocia a JAK1 y es la que participa principalmente en la señalización corriente abajo a través de STAT3 (Murray *et al.*, 2006; Niemand *et al.*, 2003; Nishihara *et al.*, 2007).

La proteína SOCS3 no inhibe completamente la fosforilación de STAT3 mediada por IL-10 debido a que no se une a sus receptores membranales, por lo que esta citocina es capaz de inducir y potenciar la activación de STAT3 y cuando es mediada por IL-6 esta respuesta puede ser débil y transitoria, lo cual puede ser una posible explicación del porqué estas dos citocinas que señalizan a través de la misma vía de señalización tienen diferentes efectos biológicos en las células. Como STAT3 es un factor de transcripción necesario para que la interleucina 10 cumpla con sus funciones reguladoras de la respuesta inmune, es importante considerar la posibilidad de que éste parásito helminto influya en la vía de señalización de esta interleucina para controlar la producción de otras citocinas pro-inflamatorias. La cascada de transducción para IL-10 se inicia mediante su unión a su receptor IL-10R, que desencadena la activación de JAK1 y el reclutamiento de STAT3 para

fosforilarlo y que forme dímeros que se transloquen al núcleo. Dicho esto, entonces STAT3 es esencial para la actividad inmunosupresora de IL-10.

Estudios previos demuestran que STAT3 cumple un papel importante en la actividad inmunoreguladora asociada a IL-10, incluyendo el control de su expresión (Benkhart *et al.*, 2000). Además, los mecanismos inmunoreguladores ejercidos por IL-10 se enfocan principalmente a la inhibición de varias respuestas de macrófagos y neutrófilos, como la producción de IL-12, IFN γ , TNF α , NO, quimiocinas, y prostaglandinas a través de bloqueo de la expresión de la ciclooxigenasa 2 (Berlato *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2002). Lo cual apoya la idea de que *T. crassiceps* esté favoreciendo la respuesta de STAT3 frente a IL-10 para desarrollar un ambiente propicio para su establecimiento.

Otro aspecto a considerar es que la fosforilación de STAT3 termina aproximadamente una hora después de la exposición inicial de las células a factores de crecimiento o citocinas como IL-6, que activan la subunidad del receptor gp130. Cuando EGFR (receptor celular del factor de crecimiento epidérmico) está activo, STAT3 se refosforila. La IL-6 recién sintetizada impulsa la asociación del receptor de IL-6 y gp130 con EGFR, lo que conduce a una refosforilación de STAT3 dependiente de EGFR, que no se inhibe por la presencia continua de SOCS3 (Wang *et al.*, 2013). Por su parte, SOCS3 regula negativamente a STAT3 aproximadamente 90 minutos después de la exposición a IL-6 (Xia *et al.*, 2003), por lo que, haciendo referencia a lo mencionado anteriormente, aún con la presencia de SOCS3, STAT3 se vuelve a fosforilar en respuesta a IL-6 y así se mantiene por un largo periodo. Esto podría explicar la fosforilación continua de STAT3 en macrófagos provenientes de la infección con *Taenia crassiceps* por la presencia de este complejo de receptores, que están exentos a la inhibición por SOCS3.

Respecto a los mecanismos de regulación de SOCS3 se sabe que está fuertemente regulada por proteólisis. SOCS2 promueve la degradación vía proteasoma de SOCS1 y SOCS3, a través de su caja SOCS (Piessevaux *et al.*, 2006), así que un probable decremento de esta molécula (SOCS2), inducido por la infección mantendría los altos niveles intracelulares de SOCS3. También es importante mencionar la presencia de motivos PEST en esta proteína, los cuales llevan al aumento de su vida media (Babon *et al.*, 2006).

Existe evidencia que ha reportado que el aumento de los niveles de SOCS3 es inducido por IL-10, pero no actúa inhibiendo la señalización de dicha interleucina, su actividad va más bien dirigida al bloqueo de otros receptores de citocinas como el residuo fosforilado de tirosina 800 (Tyr800) de la subunidad β 2 del receptor de IL-12, el de Tyr985

del receptor de leptina y el de Tyr759 de la subunidad gp130 (Bjorbak *et al.*, 2000; O'shea y Murray, 2008; Yasukawa *et al.*, 2003).

Son pocos los estudios donde asocian la participación de SOCS3 con parásitos helmintos. Se le ha relacionado con la capacidad de renovación de las células del epitelio gastrointestinal y su eficiencia con la expulsión de parásitos helmintos, el incremento de esta proteína se encontró en cepas de ratones susceptibles al helminto *Trichuris muris*, pero la eliminación de SOCS3 en el tejido no resultó en la resistencia total frente al parásito, únicamente en el incremento del recambio celular (Shaw *et al.*, 2014). El aumento de SOCS3 puede representar una estrategia de supervivencia al limitar la expulsión de estos parásitos de su huésped, tal como podría ser el incremento de la misma en el modelo infeccioso con *T. crassiceps* aquí estudiado.

Por otra parte, nuestros datos indican que existe un incremento en los niveles de SHP1 y 2 de los macrófagos provenientes de la infección por *T. crassiceps*. En otros trabajos se ha visto que el protozooario intracelular *Leishmania donovani* también tiene un efecto directo sobre los macrófagos del huésped induciendo la activación de fosfatasa como SHP1, siendo capaces de impedir la señalización intracelular (Oliver *et al.*, 2005). Este mismo fenómeno se observó en células dendríticas con *Leishmania mexicana* (Contreras *et al.*, 2014). También hay evidencia de que *Leishmania spp* expresa sus propias fosfatasas que pueden inhibir moléculas de la célula hospedera y de ese modo facilita su supervivencia dentro del macrófago (Blanchette *et al.*, 1999; Forget *et al.*, 2006). Respecto a helmintos, en un estudio se ha reportado que los antígenos solubles de los huevos del trematodo *Schistosoma mansoni* regulan la respuesta inmune de células dendríticas al inducir mayores niveles de SHP1 y SOCS1, los cuales son importantes reguladores negativos de receptores TLR4 (Klaver *et al.*, 2015). Los efectos de *T. crassiceps* sobre esta fosfatasa también han sido observados en trabajos previos en nuestro laboratorio al ser expuestos macrófagos peritoneales murinos a los productos excretados/secretados de *T. crassiceps* y observar un incremento en la fosforilación de SHP1 y sus distintos efectos frente a IFN γ (Becerra & Terrazas, 2014).

Es importante mencionar que en relación a los niveles de la fosfatasa SHP2 no hay reportes relacionados a parásitos protozoarios o metazoarios. En nuestro trabajo se demostró que, en la infección con este parásito helminto, SHP2 representa un punto clave para la regulación de la fosforilación de STAT3, al ser una proteína reguladora específica de este transductor, ya que se observaron cambios importantes en su activación al ser analizadas las

proteínas de macrófagos de ratones infectados a corto y largo plazo. De forma basal, así como con el estímulo con las interleucinas, SHP2 mostró un aumento significativamente mayor durante la infección, además, su inhibición con ortovanadato de sodio permitió el restablecimiento e incremento de la fosforilación de STAT3 en los macrófagos peritoneales. Por tanto, el presente trabajo puede considerarse uno de los primeros reportes que hacen referencia a la respuesta específica de la fosfatasa SHP2 frente a un parásito helminto como *T. crassiceps*.

La regulación positiva de SOCS3 y PIAS3 por helmintos ha sido observada en células dendríticas tratadas con los antígenos solubles del tegumento de *Fasciola hepática* donde la asocian con un efecto inhibitor de los miembros de la ruta de señalización de TLR4 y la supresión de citocinas inducida por LPS (Vukman *et al.*, 2013). Esta regulación positiva puede ser explicada al considerar que la presencia de diversos parásitos generalmente favorece la polarización de macrófagos a un perfil M2 o antiinflamatorio, factor que ha sido asociado a la presencia de SOCS3 y su capacidad para regular las vías de señalización necesarias para dicho perfil. SOCS3 actúa como un modulador de polarización de macrófagos al demostrarse que su deficiencia sesga los macrófagos hacia el fenotipo M1 o inflamatorio (Qin *et al.*, 2012).

Basado en lo anterior, es posible que la inducción de SOCS3 por la infección con *T. crassiceps* sea un mecanismo para mantener el fenotipo M2 o aaMΦ que a su vez inhibe la respuesta inmune protectora contra este parásito (Reyes & Terrazas, 2007). Por otro lado, el papel benéfico de SOCS3 en células de linaje mieloide se ha documentado en la restricción de respuestas inflamatorias en modelos animales con esclerosis múltiple y artritis, entre otros (Chen *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2012). En correlación con este antecedente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la infección por *T. crassiceps* o la inyección de sus antígenos inhibe el desarrollo de la esclerosis múltiple experimental (Reyes *et al.*, 2011; Peón *et al.*, 2017).

Existen pocos reportes en donde las moléculas SOCS sean alteradas por la infección con otros helmintos, por ejemplo, durante la infección por *Brugia malayi* la regulación positiva de la proteína SOCS1, pero no de SOCS3, es importante en la activación de los macrófagos para la supervivencia del parásito (Whyte *et al.* 2011), en contraste, en nuestro trabajo nosotros encontramos que SOCS3 está altamente expresado, lo cual podría indicar que esta proteína es la que dirige las propiedades de los macrófagos, donde actúa para limitar la señalización excesiva y modular las respuestas pro-inflamatorias siendo un interruptor

molecular crítico que coordina la señalización correcta de las diferentes vías que regula y así programar eficazmente la polarización de macrófagos.

En conjunto, estos datos demuestran que *Taenia crassiceps* tiene la capacidad de regular vías de señalización intracelular al inducir diferentes niveles de SOCS3, PIAS3 y las fosfatasa SHP1 y 2, siendo esta última una proteína reguladora crítica de la respuesta inmune frente a este parásito helminto.

Con nuestros hallazgos, proponemos un posible mecanismo de regulación de la activación de STAT3 por la infección con *T. crassiceps*. En la figura 16 se aprecia como éste parásito helminto podría inducir la fosforilación de STAT3, incremento de los niveles de SOCS3 y de las fosfatasa SHP1 y 2. El ácido zoledrónico pudiera estar actuando directamente en la inhibición de la fosforilación de STAT3, impidiendo su función como factor de transcripción y llevando a la menor expresión de la proteína SOCS3. El uso de ortovanadato de sodio logra inhibir la acción de las fosfatasa SHP1 (Becerra & Terrazas, 2014) y SHP2, por lo que la fosforilación de STAT3 se restablece. La inducción de un incremento de estas fosfatasa llevaría a un control colateral del incremento de la fosforilación de STAT3. Respecto a PIAS3 podemos mencionar que, si en estudios posteriores se demuestra un aumento significativo en su síntesis, estaría relacionado con la mayor concentración de homodímeros de STAT3 fosforilado que estuviesen traslocando al núcleo como producto de la respuesta que tienen los macrófagos con *T. crassiceps*.

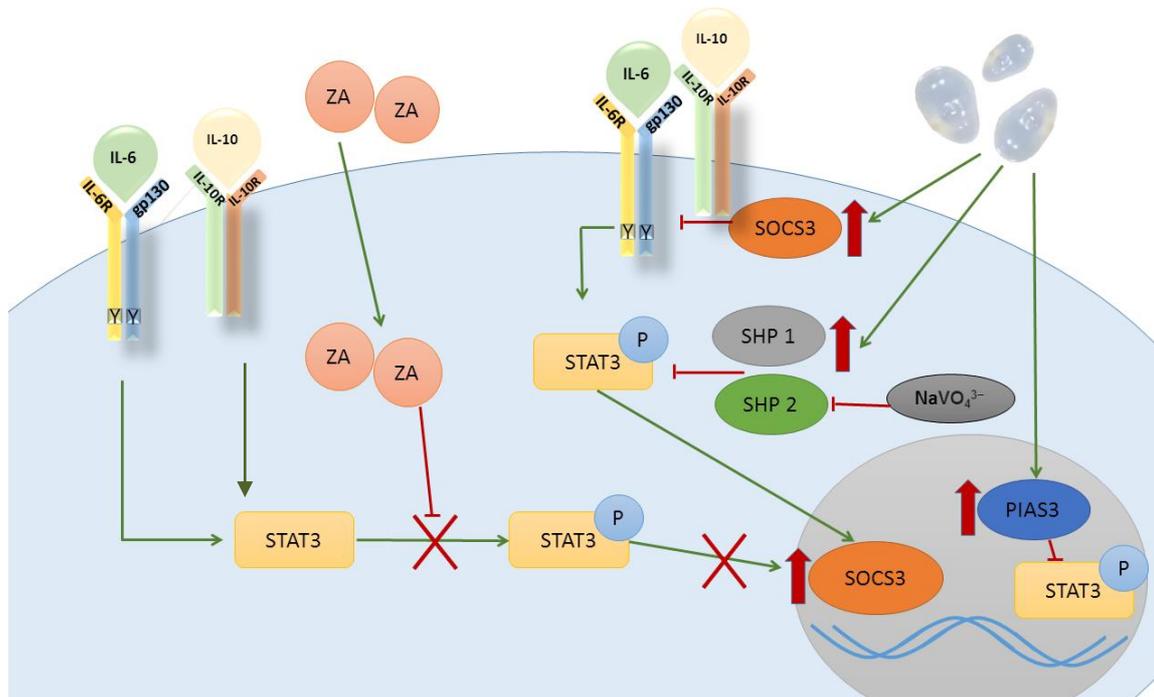


Figura 16. Propuesta de los efectos inmunomoduladores sobre los mecanismos reguladores negativos de la vía JAK-STAT frente a *Taenia crassiceps*.

Finalmente, el papel biológico que pudiera tener la fosforilación de STAT3 durante la infección por *T. crassiceps* permanece desconocido. Sin embargo, su regulación positiva pudiera estar asociada a la polarización de macrófagos a un perfil M2 y su capacidad para activar y regular las vías de señalización necesarias para dicho perfil, ya que la presencia de diversos parásitos generalmente lo favorece. Junto con SOCS3, actúan como un modulador de polarización de macrófagos teniendo un papel beneficioso en las células inmunitarias en la restricción de respuestas inflamatorias, principalmente en macrófagos activados alternativamente (aaMΦ's), por ello están asociadas a la respuesta inmune de tipo Th2, considerando que también están implicados en la supresión de algunas respuestas inflamatorias Th1.

Una limitación importante que se presentó en este estudio tiene relación con la complejidad del control de interacción de otras proteínas que puedan interactuar con la vía de señalización estudiada y que se estén activando al estar en contacto con el parásito. Por otro lado, el desarrollo de la infección en un modelo murino implica adecuarse al tiempo en el que se cuente con el número de individuos establecido en el experimento, además de requerir un número importante de células peritoneales para la obtención de una cantidad significativa de proteínas para su análisis.

CONCLUSIONES

De acuerdo con lo establecido es el presente estudio, la infección experimental mÚrida con *Taenia crassiceps* permitiÓ comprobar que sí existe un efecto regulador en el proceso de activaciÓn de las proteÍnas SOCS3, SHP1 y SHP2, las cuÁles juegan un rol importante en la activaciÓn/fosforilaciÓn de STAT3, confirmando que *Taenia crassiceps* puede alterar diferentes elementos de la vÍa de seÑalizaciÓn JAK-STAT.

De manera puntual se puede mencionar que:

1. La infecciÓn de dos y ocho semanas con *Taenia crassiceps* aumentÓ los niveles de las moléculas inhibitorias de la vÍa de seÑalizaciÓn JAK-STAT, tales como SOCS3, SHP1 y SHP2 en macrófagos peritoneales.
2. La inhibiciÓn de la fosfatasa SHP2 con ortovanadato de sodio favoreciÓ una mayor fosforilaciÓn de STAT3 en macrófagos peritoneales provenientes de la infecciÓn con *Taenia crassiceps*, por lo cual representa un punto de control clave para impedir la fosforilaciÓn exacerbada de dicho transductor durante la infecciÓn.
3. La fosforilaciÓn de STAT3 en respuesta al estÍmulo con las citocinas y la infecciÓn con *Taenia crassiceps* es inhibida por el ácido zoledrÓnico, que a su vez inhibe a la proteÍna supresora SOCS3 en los macrófagos peritoneales. Siendo STAT3 un transductor de seÑal con múltiples funciones, su inhibiciÓn con dicho fármaco representa una alternativa para ser dirigido contra este transductor en patologÍas bien descritas con el mismo.
4. El incremento de la proteÍna reguladora SOCS3 es claramente favorecida por la presencia del parásito, sin embargo, este efecto puede estar vinculado con otras vÍas de seÑalizaciÓn que incluyen transductores de seÑales diferentes a STAT3.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación mostraron que la infección con *Taenia crassiceps* induce un incremento en los niveles de proteínas inhibidoras de la vía de señalización a través de STAT3 en macrófagos murinos, estos efectos se observan principalmente en los niveles de la proteína reguladora SOCS3, por lo que es necesario describir los mecanismos asociados a la activación e incremento de SOCS3 en otras vías de señalización que no impliquen al transductor STAT3.

Por otro lado, observamos STAT3 y SOCS3 son inhibidas en los macrófagos peritoneales por el ácido zoledrónico. Este fármaco podría ser utilizado *in vivo* en el modelo murino para observar su efecto en presencia del parásito y así lograr dilucidar su efecto en las mismas proteínas y su participación en la respuesta inmune contra el helminto.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, S. T., & Ivashkiv, L. B. (2000). Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and STAT activation by inflammatory and stress pathways. *Journal of Immunology*. **165**(9): 5227-5237.
- Alexander, W. S. (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nature Reviews, Immunology*. **2**(6): 410-416.
- Arruda, G. C., Da Silva, A. D. T., Quagliato, E. M. A. B., Maretti, M. A., & Rossi, C. L. (2005). Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Tropical Medicine and International Health*. **10**(10): 1005-1012.
- Babon, J. J., Kershaw, N. J., Murphy, J. M., Varghese, L. N., Laktyushin, A., Young, S. N., Lucet, I. S., et al. (2012). Suppression of cytokine signaling by SOCS3: Characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. *Immunity*, **36**(2): 239-250.
- Babon, J. J., McManus, E. J., Yao, S., DeSouza, D. P., Mielke, L. a, Sprigg, N. S., Willson, T. a, et al. (2006). The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Molecular Cell*, **22**: 205-216.
- Becerra-Díaz, M., & Terrazas, L. I. (2014). *Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ . *International Journal for Parasitology*. **44**(9): 613-23.
- Benkhart, E. M., Siedlar, M., Wedel, A., Werner, T., & Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000). Role of STAT3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *Journal of immunology*. **165**(3): 1612-1617.
- Berishaj, M., Gao, S. P., Ahmed, S., Leslie, K., Al-Ahmadie, H., Gerald, W. L., Bornmann, W., et al. (2007). STAT3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast cancer research: BCR*, **9**(3): R32.
- Berlato, C., Cassatella, M. A., Kinjyo, I., Gatto, L., Yoshimura, A., & Bazzoni, F. (2002). Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *Journal of immunology*. **168**(12): 6404-6411.
- Blanchette, J., N. Racette, R. Faure, K. A. Siminovitch, and M. Olivier. 1999. Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur. J. Immunol*. **29**:3737-3744.
- Bjørnbæk, C., Lavery, H. J., Bates, S. H., Olson, R. K., Davis, S. M., Flier, J. S., & Myers, M. G. (2000). SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(51), 40649-40657.
- Bromberg, J., & Darnell, J. E. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*. **19**(21):2468-73

- Butcher, B. A., Kim, L., Panopoulos, A. D., Watowich, S. S., Murray, P. J., & Denkers, E. Y. (2005). IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *Journal of immunology*. **174**(6): 3148-3152.
- Caljon, G.; Muylder, G.; Durnez, L.; Jennes, W.; Vanaerschot, M. & Dujardin, J. (2016). Alice in microbes' land: adaptations and counter-adaptations of vector-borne parasitic protozoa and their hosts. *EMS Microbiology Reviews*. **40**(5): 664-685
- Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Roza, C., Bowdridge, S., Millman, A., Van Rooijen, N., et al. (2012). An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nature Medicine*. **18**(2): 260-266.
- Chen, Y., Hsieh, S.; Chen, W.; Li, K; Wu, C.; Wu, P.; Tsai, C. & Yu, C (2011). Spontaneous resolution of acute gouty arthritis is associated with rapid induction of the anti-inflammatory factors TGFb1, IL-10 and soluble TNF receptors and the intracellular cytokine negative regulators CIS and SOCS3. *Ann. Rheum. Dis.* **70**: 1655–1663.
- Coakley, G; Buck, A. & Maizels, R. (2016). Host parasite communications—Messages from helminths for the immune system. Parasite communication and cell-cell interactions. *Molecular & Biochemical Parasitology* **208**: 33–40
- Contreras I, Estrada JA, Guak H, Martel C, Borjian A, Ralph B, et al. (2014). Impact of *Leishmania mexicana* infection on dendritic cell signaling and functions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**(9), e3202.
- Cuesta-Astroz, Y.; Oliveira, F; Alves, L. & Oliveira, G. (2017). Helminth secretomes reflect different lifestyles and parasitized hosts. *International Journal for Parasitology*
- Donnelly, S., Stack, C. M., O'Neill, S. M., Sayed, A. a, Williams, D. L., & Dalton, J. P. (2008). Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *The FASEB journal*. **22**(11): 4022-4032.
- Escobedo, G., Roberts, C. W., Carrero, J. C., & Morales-Montor, J. (2005). Parasite regulation by host hormones: An old mechanism of host exploitation? *Trends in Parasitology*. **21**: 588-593
- Fernando, M. R., Reyes, J. L., Iannuzzi, J., Leung, G., & McKay, D. M. (2014). The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS ONE*: **9**(4).
- Filippakopoulos, P.; Muller, S. & Knapp, S. (2009). SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity.
- Forget, G.; Gregory, D.; Whitcombe, L. & Olivier, M. (2006). Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. **74**(11): 6272–6279
- Galdiero, M., Vitiello, M., D'Isanto, M., Raieta, K., & Galdiero, E. (2006). STAT1 and STAT3 phosphorylation by porins are independent of JAKs but are dependent on MAPK pathway and plays a role in U937 cells production of interleukin-6. *Cytokine*. **36**(5-6): 218-228.

- Gómez-García L, Rivera-Montoya I, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI. 2006. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitology Research*. 99(4):440–448.
- Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity*. **32**: 593-604
- Guivier, E.; Bellenger, G.; Sorci, G. & Faivrelet, B. (2016). Helminth interaction with the host immune system: short-term benefits and costs in relation to the infectious environment. *The American Naturalist*. **188**(2): 253–263
- Hammerschmidt, K., & Kurtz, J. (2005). Surface carbohydrate composition of a tapeworm in its consecutive intermediate hosts: Individual variation and fitness consequences. *International Journal for Parasitology*. **35**(14): 1499-1507.
- Hewitson, J.; Grainger, J. & Maizels, R. (2016). Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 167: 1–11
- Heneghan, A., Pierre, J. & Kudsk, K. (2013). JAK-STAT and intestinal mucosal immunology. *JAK-STAT*. **2**:4
- Hirano, T., Ishihara, K., & Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*. **19**(21): 2548-2556.
- Huang, Y.; Wang, J.; Cao, F.; Jiang, H.; Li, A.; Li, J.; Qiu, L., Shen, H., Chang, W., Zhou, C.; Pan, Y. & Lu, Y. (2017). SHP2 associates with nuclear localization of STAT3: significance in progression and prognosis of colorectal cancer. *Scientific Reports*. **7**(17597): s41598-017-17604-7
- Janeway, C., Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2009). *Inmunología de Janeway*. 7a ed. McGraw-Hill, México, D.F. 887 p.
- Johnstone, J. & O’Shea, J. (2003). Matching SOCS with function. *Nature Immunology*. **4**(6): 507-509
- Klaver E., Kuijk L., Lindhorst T., Cummings R. & van Die I. 2015. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens induce expression of the negative regulators SOCS1 and SHP1 in human dendritic cells via interaction with the mannose receptor. *PLoS One*.10(4): e0124089
- Klotz, C., Ziegler, T., Figueiredo, A. S., Rausch, S., Hepworth, M. R., Obsivac, N., Sers, C., et al. (2011). A helminth immunomodulator exploits host signaling events to regulate cytokine production in macrophages. *PLoS Pathogens*. **7**(1): e1001248
- Lang, R. (2005). Tuning of macrophage responses by STAT3-inducing cytokines: Molecular mechanisms and consequences in infection. *Immunobiology*. **210**: 63-73
- Lang, R., Patel, D., Morris, J. J., Rutschman, R. L., & Murray, P. J. (2002). Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *Journal of immunology*. **169**(5): 2253-2263.

- Liongue, C., O'Sullivan, L., Trengove, M. & Ward A. (2012) Evolution of JAK-STAT Pathway Components: Mechanisms and Role in Immune System Development. *PLoS ONE*. **7**(3): e32777
- Liongue C, & Ward A.C. 2013. Evolution of the JAK-STAT pathway. *Journal JAK-STAT*. **2**(1): e22756.
- Lorenz, U. (2009). SHP-1 and SHP-2 in T cells: two phosphatases functioning at many levels. *Immunol Rev*. **228**(1): 342–359.
- Maillard, H., J. Marionneau, B. Prophette, E. Boyer, & P. Celerier. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *AIDS*. **12**: 1551-1552
- Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., & Allen, J. E. (2004). Helminth parasites - Masters of regulation. *Immunological Reviews*. **201**: 89-116
- Maizels, R. M., Pearce, E. J., Artis, D., Yazdanbakhsh, M., & Wynn, T. A. 2009. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *The Journal of experimental medicine*. **206**(10): 2059-2066.
- Maizels, R. y Hewitson, J. 2016. Myeloid cell phenotypes in susceptibility and resistance to helminth parasite infections. *Microbiol Spectrum*. **4**(6): MCHD-0043-2016
- Mogensen, T. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*. **22**(2): 240–273
- Murray, P. J. (2006). Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Current Opinion in Pharmacology*. **6**: 379-386
- Murray, P. J. (2008). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of immunology*. **178**(5): 2623-2629.
- Murray, P. J. J., Allen, J. E. E., Biswas, S. K. K., Fisher, E. A. A., Gilroy, D. W. W., Goerdts, S., Gordon, S., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. **41**(1): 14-20.
- Niemand, C., Nimmesgern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P. C., et al. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *Journal of immunology*. **170**(6): 3263-3272.
- Nishihara, M., Ogura, H., Ueda, N., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Tsuji, F., Aono, H., et al. (2007). IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *International Immunology*: **19**(6): 695-702.
- Olivier, M., Gregory, D. J., & Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*. **18**(2): 293-305.
- O'Shea, J. J., & Murray, P. J. (2008). Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*. **28**(4): 477-487.
- Passos, L.; Gazzinelli-Guimarães, P.; Oliveira, T.; Gazzinelli, A.; Silveira, D, Delaqua, N.; Gonçalves, R.; Castanheir, D.; Bartholomeu, R.; Fujiwara, T. & Lacerda, L.

- (2017). Regulatory monocytes in helminth infections: insights from the modulation during human hookworm infection. *BMC Infectious Diseases* 17:253
- Peón, A. N., Ledesma-Soto, Y., Olguín, J. E., Bautista, M. D., Sciutto, E. & Terrazas, L. I. (2017). Helminth products potently modulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by downregulating neuroinflammation and promoting a suppressive microenvironment. *Mediators Inflamm.* v.2017: PMC5506484.
- Perrigoue, J. G., Marshall, F. A., & Artis, D. (2008). On the hunt for helminths: Innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. *Cellular Microbiology*. **10**: 1757-1764.
- Persky, M.; Murphy, K. & Farrar, D. (2005). IL-12, but not IFN- γ , promotes STAT4 activation and Th1 development in murine CD4 T cells expressing a chimeric murine/human STAT2 gene. *The Journal of Immunology*. **174**: 294–301
- Piessevaux, J., Lavens, D., Montoye, T., Wauman, J., Catteeuw, D., Vandekerckhove, J., Belsham, D., et al. (2006). Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. *Journal of Biological Chemistry*. **281**(44): 32953-32966.
- Qin, H., Holdbrooks, A. T., Liu, Y., Reynolds, S. L., Yanagisawa, L. L., & Benveniste, E. N. (2012). SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *Journal of immunology*. **189**(7): 3439-3448.
- ²Qin, H., Yeh, Q.; De Sarno, P.; Holdbrooks, A.; Liu, Y.; Muldowney, M.; Reynolds, S.; Yanagisawa, L. et al. (2012). Signal transducer and activator of transcription-3/suppressor of cytokine signaling-3 (STAT3/SOCS3) axis in myeloid cells regulates neuroinflammation. *The Journal of Immunology Proc*. **109**: 5004–5009.
- Reyes, J. L., Espinoza, J. A., González, M., Verdin, L. & Terrazas, L. I. (2011). *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular Immunology*. **267**(2): 77-87
- Reyes, J. L. H., Leung, G., & McKay, D. M. (2013). Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases. *International Journal for Parasitology*. **43**: 233-243
- Reyes, J. L., & Terrazas, L. I. (2007). The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunology*. **29**(12): 609-619.
- Reyes, S. (2015). Modulación de la activación de STAT3 en macrófagos durante la infección por *Taenia crassiceps*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 70p.
- Rodríguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., & Terrazas, L. I. (2002). Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *Journal of immunology*. **168**(7), 3135-3139.
- Rodríguez-Sosa, M., Saavedra, R., Tenorio, E. P., Rosas, L. E., Satoskar, A. R., & Terrazas, L. I. (2004). A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and Immunity*. **72**(8): 4552-4560.

- Saavedra Ramírez, P. G., Vásquez Duque, G. M., & González Naranjo, L. A. (2011). Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*. **24**(2): 157-166.
- Sanz, M., Martín, M., Reyes, E. y Prieto M. (2013). Células presentadoras de Antígeno. *Medicine*. **11**(28):1720-7
- Scheller J, Grötzinger J, Rose-John S. (2006). Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling. *Signal Transduction*. **6**(4): 240-259
- Schmid-Hempel, (2008). Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for ‘macroscopic phenomena such as virulence. *Phil. Trans. R. Soc.* 364: 85–98
- Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C., & Schaper, F. (2000). SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem*. **275**(17): 12848-12856.
- Shaw E, Else K, & Rigby R. (2014). Suppressor of Cytokine Signalling 3 (SOCS3) Impacts on Intestinal Epithelial Cell Proliferation During Intestinal Helminth Infection. *Immun Inflamm Dis*. **5**(3):336-345
- Tamiya, T., Kashiwagi, I., Takahashi, R., Yasukawa, H., & Yoshimura, A. (2011). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: Regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. **31**(5): 980-985.
- Terrazas, C. a, Gómez-García, L., & Terrazas, L. I. (2010). Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *International Journal for Parasitology*. **40**(9): 1051-1062.
- Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C. A., Reyes, J. L., & Rodríguez-Sosa, M. (2005). Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *International Journal for Parasitology*, **35**(13): 1349–1358
- Terrazas, I., R. Bojalil, T. Govezensky, & C. Larralde. (1998). Shift from an early protective TH1-Type immune response to a late permissive TH2-Type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of Parasitology*. **84**(1):74-81
- Tetreau, G.; Pinaud, S.; Portet, A.; Galinier, R.; Gourbal, B. & Duval, D. (2017). Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate. *Front. Immunol.* 8:1249.10.3389/fimmu.2017.01249
- Van Valen, L. (1989). Three paradigms of evolution. *Evolutionary Theory*. **9**: 1- 17
- Vukman, K.; Adams, P.; Dowling, D.; Metz, M.; Maurer, M. & O’Neil, S. (2013). The effects of *Fasciola hepatica* tegumental antigens on mast cell function. *International Journal for Parasitology* **43**: 531–539
- Vogt, M., Domszalai, T., Kleshchanok, D., Lehmann, S., Schmitt, A., Poli, V., Richter, W., et al. (2011). The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3. *Journal of cell science*. **124**(6): 900-909.

- Wang, Y.; Boxel-Dezaireb, A.; Cheonb, H, Yanga, J. & Stark G. (2013). STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *PNAS*. **110**(42): 16975–1698
- Whyte,C.; Bishop, E.; Ruckerl, D. Gaspar, S.; Barker, R. Allen, J. & Wilson, H. (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *Journal of Leukocyte Biology*. **90**: 845–854
- Willms, K. & Zurabian, R. (2010). *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*. **137**(3): 335-346.
- Wilson, H. M. (2014). SOCS proteins in macrophage polarization and function. *Frontiers in Immunology*. **5**(7): 1-5
- Wormald, S. & Hilton, D. 2004. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem*. **279**(2):821-4
- Xia L, et al. 2003. Identificación de los dominios positivo y negativo dentro del receptor del factor de crecimiento epidérmico Región COOH-terminal para el transductor de señal y la activación del activador de la transcripción (STAT). *J Biol Chem*.; **277** (34): 30716 – 30723
- X-Y Fu. (1999) From PTK-STAT signaling to caspase expression and apoptosis induction. *Cell Death and Differentiation*. **6**: 1201 – 1208
- Xu Qu J, Liu G-H, Wu K, Han P, Wang P, et al (2008) Nitric Oxide Destabilizes PIAS3 and Regulates Sumoylation. *PLoS ONE* **2**(10): e1085.
- Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., et al. (2003). IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nature immunology*. **4**(6): 551-556.
- Yoshimura, A., Naka, T., & Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature reviews Immunology*. **7**(6): 454-465.