



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Modulación de las células dendríticas
deficientes en MIF en respuesta a
Toxoplasma gondii.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Biol. Araceli Rubí Viedma Rodríguez

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

JUNIO DEL 2009



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.

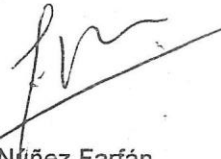
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de enero de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **VEDMA RODRIGUEZ ARACELI RUBI** con número de cuenta **403079885** con la tesis titulada "**MODULACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DEFICIENTES EN MIF EN RESPUESTA A *Toxoplasma gondii*.**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA:**

Presidente: DR. RAFAEL S. SAAVEDRA DURAN
Vocal: DRA. LIBIA VEGA LOYO
Secretario: DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA
Suplente: DR. SERGIO VACA PACHECO
Suplente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de junio de 2009.



Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por el apoyo recibido incondicionalmente durante la maestría

Apoyos recibidos

El presente trabajo de tesis fue apoyado por:
El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 215815.

Apoyos que financiaron la tesis

CONACYT No. 49812-Q
PAPIIT: No IN208606

Miembros del comité tutorial

Dra. Miriam Rodríguez Sosa
Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés
Dr. Rafael Saavedra Durán

Este trabajo fue realizado en la UBIMED en el Laboratorio 5 de la FES-Iztacala bajo la tutoría de la Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Miriam Rodríguez y al Dr. Luis Ignacio Terrazas

Gracias por el apoyo y por la formación recibida en estos dos años de la maestría, me llevo sus valiosas enseñanzas y les agradezco sus observaciones para la realización de este proyecto de investigación y también gracias por aceptarme en su equipo de investigación.

Dra. Libia Vega Loyo

Por su valioso tiempo que le dedicó a la revisión de esta tesis y su paciencia mil gracias.

Al Dr. Sergio Vaca pacheco

Gracias por todo su apoyo en los últimos días antes de mi titulación y por sus consejos.

Al Dr. Rafael Saavedra Durán

Por el antígeno donado durante este proyecto de investigación.

Dr. Juan Nuñez Farfán, Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes y a Lilia Jiménez Solís

Gracias por todo su apoyo brindado durante la maestría.

Al Biol. Héctor Barrera Escorcía jefe del Laboratorio de Microscopia óptica. Por la accesoria otorgada para la toma de fotos, en el microscopio de Epifluorescencia (Motic).

Agradezco al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca, con el número 215815.

A todos los profesores por sus enseñanzas durante el posgrado.

¡¡ Gracias a todos!!

DEDICATORIAS

A mis papás: por ser el motor de mi vida, gracias por todo el apoyo y cariño que me han brindado cada minuto de mi vida, gracias por esa familia tan unida y tan bonita que siempre hemos sido.

A mi hermano: Aún siendo el más chico, creo que has tomado el papel del hermano mayor, gracias por tu cariño, tu protección.

A mis amigos de la carrera: Por compartir los mejores momentos de mi vida, gracias por ser un apoyo importante y si algún día la distancia nos separa recuerden que la amistad perdurará por siempre y en especial a mis mejores amigas, a las cuales quiero muchísimo Ivonne Flores Moreno y Norma Edith Bernabé León gracias por cada uno de los momentos compartidos por las alegrías, enseñanzas, triunfos y por todo lo vivido no tengo palabras para agradecer su linda amistad mis queridas hermanitas Biologuitas.

A mi amiga de laboratorio Maribel Olivares gracias por compartir un poco de tu tiempo gracias a ti el ambiente fue menos pesado en el laboratorio.

A mis profesores: Daleth Guedea, gracias por el apoyo que me has brindado durante la maestría, al maestro Héctor Barrera Escorcía, gracias por sus valiosos consejos, apoyo desde mis inicios como estudiante de biología hasta la fecha, por esas charlas que tuvimos y que seguiremos teniendo, sobre todo por su gran calidad humana y ética profesional que muy pocos científicos ya tienen, mil gracias.

A mi UNAM por darme la oportunidad de ser toda una profesionista y a mi querida FES-Iztacala sólo te diré adiós como estudiante.

“Por más piedras que me pongan en el camino sabré caminar derecho y sin tambalear a pesar del malestar que estas me ocasionen, solo sé que llegaré a ese maravilloso sueño de mi vida que algún día se hará realidad y sé que lo lograré con constancia, dedicación y pasión por la ciencia.”

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
GLOSARIO.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN	
• Toxoplasmosis.....	5
• La respuesta inmune hacia <i>Toxoplasma gondii</i>	7
• Células dendríticas (DCs).....	9
• Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF).....	12
• La relación de MIF con la regulación de la respuesta inmune.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIÓN.....	53
APÉNDICE.....	52
REFERENCIAS.....	54

GLOSARIO

ABTS	2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)
Ag	Antígeno
APC	Célula presentadora de antígeno
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Cluster de diferenciación
CHO	Células de ovario de hámster chino
DCs	Células dendríticas
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Deoxinucleósidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
F	Sonda hacia adelante
FACS	Citómetro de flujo
FITC	Ficoeritrina
FSC	Tamaño celular
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos
IFN	Interferón
IL	Interleucina
LCs	Células de Langerhans
LNs	Nodúlos linfáticos
LPS	Lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i>
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitogénos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide
NO	Óxido nítrico
NK	Células asesinas naturales
NF-kB	Factor nuclear de transcripción kappa B
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PM	Marcador de peso molecular

PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
R	Sonda reversa
RNA	Ácido ribonucleíco
SFB	Suero fetal de bovino
SSC	Granularidad celular
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TCR	Receptor de células T
Th	Linfocitos cooperadores
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TCD4+	Linfocitos T colaboradores
TCD8+	Linfocitos T citotóxicos
TSA	Antígeno de <i>Toxoplasma gondii</i>
UV	Radiación ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

La toxoplasmosis es una enfermedad oportunista causada por el protozoo intracelular *Toxoplasma gondii* capaz de infectar cualquier animal vertebrado de sangre caliente. La resistencia a la infección por *T. gondii* depende de un delicado balance de citocinas pro-inflamatorias (interleucina (IL) 1 β , 6 y 12, factor de necrosis tumoral (TNF)- α) y citocinas anti-inflamatorias (IL-4, e IL-10). Recientemente hemos establecido que el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) participa de manera importante en la respuesta inmune protectora contra este parásito. Sin embargo, los mecanismos implicados a través de los cuales MIF ejerce sus efectos en la primera línea de defensa, como son las células dendríticas (DCs), aún no se han establecido. Las DCs son células blanco de MIF, así como productoras del mismo, participan activamente en el aumento de fenómenos inflamatorios y en la resistencia contra parásitos intracelulares. Por esta razón estudiamos la modulación de la actividad de las DCs deficientes en MIF en respuesta al antígeno de *T. gondii* (TSA). Utilizamos ratones machos silvestres (MIF+/+) y deficientes en la proteína MIF (MIF-/-), cuyos genotipos fueron confirmados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se obtuvieron DCs de fémur y tibia por diferenciación *in vitro* con factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF). Las DCs se estimularon *in vitro* con lipolisacárido (LPS, 0.5 μ g/ml) y/o TSA (2.5 μ g/ml) por 24 h. Se determinó la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- α , IL-1 β , e IL-6) y óxido nítrico (NO) por ELISA-sandwich en los sobrenadantes de los cultivos y se determinó la expresión de TNF- α , L-12 p35, IL-12 p40 e IL-12 p19 por RT-PCR tiempo real. También se determinaron por citometría de flujo las moléculas CD11c, MHC-II, CD40, CD86, CD80, TLR4, TLR-11, TLR-2, IFN- γ R y CCR-5. La ausencia de MIF disminuyó la producción y expresión de IL-12, TNF- α , IL-6, e IL-1 β , y la expresión de marcadores de membrana MHC-II, CD40, CD86, CD80, TLR-4, TLR-2, TLR-11, CCR-5 e IFN- γ R. Por otra parte, cuando se incorporó la proteína MIF recombinante, se observó que hubo una recuperación parcial en la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- α , IL-1 β , e IL-6) a nivel de los transcritos y en los moléculas de membrana (MHC-II, CD40, CD86, CD80, CCR-5 e IFN- γ R). Por lo que concluimos que MIF juega un papel importante en la resistencia innata como factor de inducción de citocinas pro-inflamatorias y marcadores de membrana.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* able to infect any vertebrate animal of warm blooded. The resistance to the infection for *T. gondii* depends on a delicate balance of cytokines pro-inflammatory (interlukine (IL) 1 β , 6 y 12, tumor necrosis tumoral (TNF) and anti-inflammatory cytokine (IL-4 and IL-10).

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a proinflammatory cytokine that is involved in the host defense against several pathogens. Here we used Balb/c MIF^{-/-} to determine the role of endogenous and exogenous MIF in the regulation of dendritic cells in response to *T. gondii* antigens. MiF^{-/-} mice displayed reduced levels of proinflammatory cytokines such as IL-12, TNF- α , IL-6, IL-1 β and (nitric oxide) NO in culture supernatant of DCs after TSA stimulation. At all time points, we have found that antigen-stimulated DCs MIF^{-/-} reduced the expression of CD80, CD40, CD86, MHC-II, TLR-4, TLR-2, TLR-11, CCR-5 and IFN- γ R. DCs MIF^{-/-} showed a reduction in the transcripts for TNF- α , IL-12 p35, IL-12 p40, and IL-12 p19 compared to DCs MIF^{+/+}.

however the adiction of MIFr to Dcs MIF^{-/-} reestablishes the production of cytokines such as IL-12, TNF- α , IL-6, IL-1 β and (nitric oxide) NO, the expresion of transcripts for TNF- α , IL-12 p35, IL-12 p40, IL-12 p19 and expresion of marker of membrane for CD80, CD40, CD86, MHC-II, TLR-4, TLR-2, TLR-11, CCR-5 and IFN- γ R. Taking together, our findings show that MIF plays an important role in the regulation and maduration of DCs, modulating the early production of innate pro-inflammatory cytokines, the expression of membrane markers, and at level of the cytokines transcripts involved in the resistance to *Toxoplasma gondii*.

INTRODUCCIÓN

LA TOXOPLASMOSIS

La toxoplasmosis es una enfermedad causada por un parásito intracelular obligado llamado *Toxoplasma gondii*, capaz de infectar cualquier animal vertebrado de sangre caliente. Usualmente la toxoplasmosis es asintomática en hospederos con inmunidad intacta, pero puede llevar a daños letales cuando está asociado con estados inmunosupresivos como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (1). La toxoplasmosis es una infección que afecta a múltiples especies animales incluido el hombre. Esta infección está extendida por todo el mundo y su frecuencia varía según las zonas geográficas y los hábitos alimentarios. Aproximadamente una cuarta parte de la población de los Estados Unidos y 1 billón de humanos en el mundo están crónicamente infectados con el parásito *T. gondii* (2).

Modos de transmisión

Existen varias vías de transmisión de la infección con *T. gondii* al hospedero.

Vía digestiva: La ingestión de quistes u ooquistes es sin duda la principal vía de transmisión. Las infecciones pueden adquirirse por el consumo de carne infectada que contenga quistes tisulares, o por la ingestión de ooquistes en el agua o en los alimentos contaminados con materia fecal de los gatos (3, 4).

Vía placentaria: Se produce en un tercio o menos de las mujeres embarazadas que padecen una infección aguda. Esta vía de transmisión generalmente tiene lugar en el curso de una infección materna silenciosa o sin diagnosticar y puede ser causa de abortos espontáneos si la infección se da en los primeros meses de embarazo, o ser causa de malformaciones genéticas o ceguera del neonato cuando se presenta en tiempos posteriores (5).

Vía parenteral: se han descrito casos humanos por transfusión de sangre o leucocitos (6).

Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

El ciclo biológico de *T. gondii* se divide en dos fases: una fase sexual y otra asexual. La fase sexual ocurre por gametogénesis en las células epiteliales del intestino delgado de los felinos (hospedero definitivo). La fase asexual ocurre en los tejidos extraintestinales de todos los hospederos, incluyendo el hombre (hospederos intermediarios) (Fig. 1).

Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

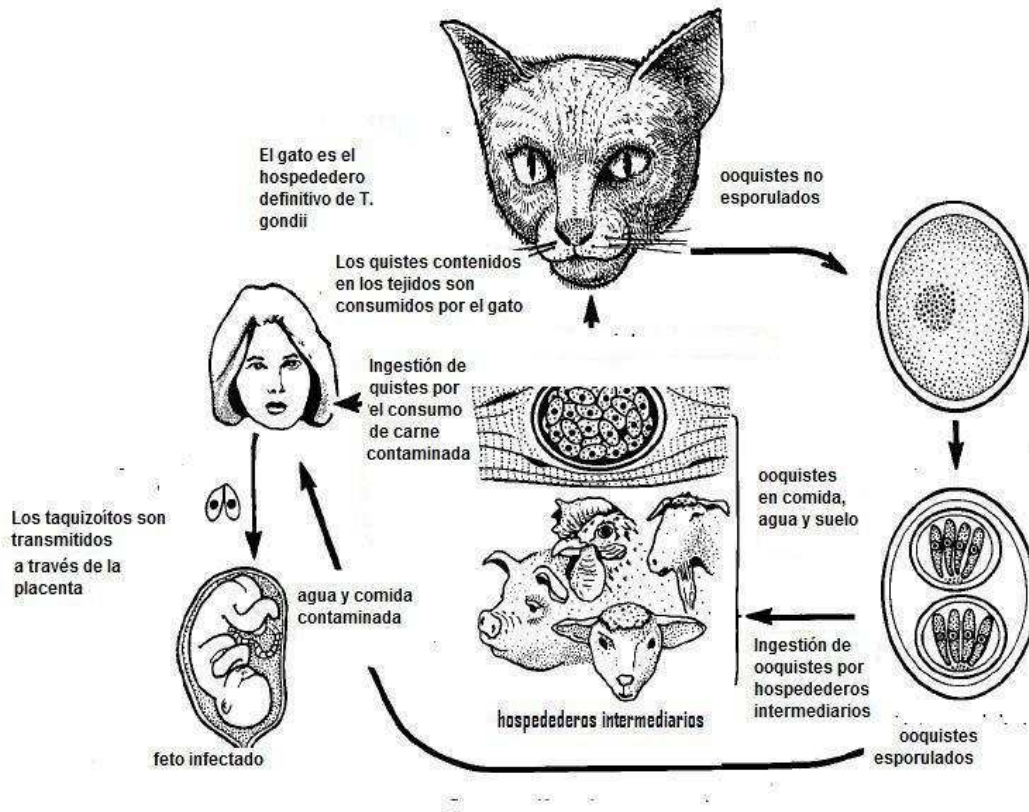


Figura 1. Ciclo de vida de *T. gondii* (3).

El ciclo vital pasa por tres estadios: **taquizoíto**, **bradizoítos** y **esporozoítos** (Fig. 2). Los taquizoítos se definen como una forma de crecimiento rápido del parásito encontrada durante la fase aguda de la toxoplasmosis. Los taquizoítos miden aproximadamente 5 μm de longitud y 2 μm de ancho. Éstos se replican dentro de una célula con un tiempo generacional de 6 a 8 horas *in vitro* (Fig. 2 A). En animales infectados los taquizoítos se diferencian en bradizoítos y forman los quistes tisulares que aparecen de 7 a 10 días post-infección. Estos quistes son encontrados predominantemente en el sistema nervioso central y en el tejido muscular (Fig. 2 B). El desarrollo de los quistes en los tejidos caracteriza el estado crónico de la infección (7). Los quistes son una formación que se encuentra en los hospederos intermedios (incluido el hombre), se transmite normalmente por la vía digestiva. Las enzimas digestivas rompen la pared del quiste y liberan los bradizoítos. El tercer estadio son los ooquistes (Fig. 2 C); los cuales son esféricos y miden de 8 a 10 μm , contienen un cigoto único que no es infectante cuando

sale de la materia fecal. La esporulación se completa al cabo de 1 a 5 días dando la formación de 2 esporocitos, cada uno de ellos con cuatros esporozoítos. Los ooquistes esporulados son infectivos cuando se ingieren prácticamente por cualquier animal de sangre caliente, incluídos los gatos (3).

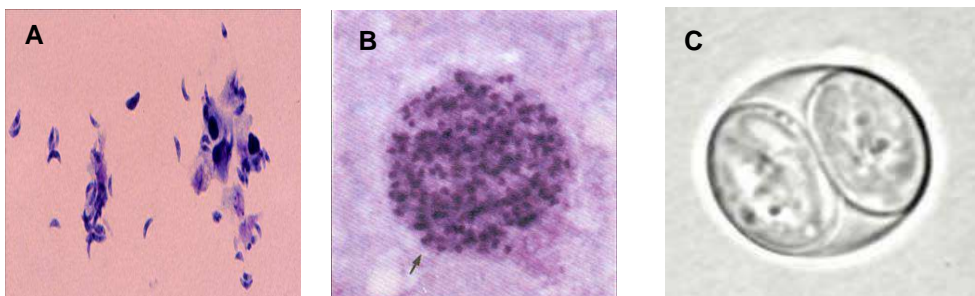


Figura 2. Estadíos de *T. gondii*. Taquizoítos teñidos con tinción Giemsa (A), quiste tisular con contenido de bradizoítos teñido con Hematoxilina-Eosina (B), ooquiste de 10 µm de tamaño (C) (7).

LA RESPUESTA INMUNE HACIA *T. gondii*

La resistencia a la infección por *T. gondii* se producen niveles incrementados de interferon gama (IFN- γ), el cual se considera uno de los principales mediadores de la respuesta inmune protectora contra *T. gondii* y otras infecciones intracelulares. El uso de modelos murinos de infección con *T. gondii* permitió establecer que la respuesta inmune necesaria para controlar al parásito, tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección se caracterizaba por la inducción vigorosa de la respuesta mediada por células tipo Th1, asociada a niveles altos de IFN- γ (8).

Se ha demostrado que la infección primaria por *T. gondii* tiene como resultado la aparición de una inmunidad que protege contra cualquier reinfección. Desde hace mucho tiempo se demostró que los linfocitos T son las células esenciales en la protección contra *T. gondii*. Los linfocitos TCD8+ producen una cantidad importante de IFN- γ , pero también se requiere la presencia de los linfocitos TCD4+, los cuales también son productores de IFN- γ pero en menor escala, y también son necesarios para inducir una resistencia primaria. La primera citocina que aparece en respuesta a la infección por *T. gondii* es la interleucina IL-12 que puede ser producida por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (DCs). En la infección por *T. gondii* las DCs producen IL-12 en respuesta a productos secretados por los taquizoítos; uno de ellos es la ciclofilina C-18, la cual se une al receptor CCR5 de las DCs para producir IL-12. Posteriormente, la IL-12 activa células asesinas naturales (NK), linfocitos TCD4+ y TCD8+ para producir niveles altos de IFN- γ ,

que activa macrófagos para producir factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno que eliminan el parásito. La infección del parásito también es controlada mediante la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 que modulan la respuesta inflamatoria debida a la respuesta Th1 (Fig. 3) (9, 10).

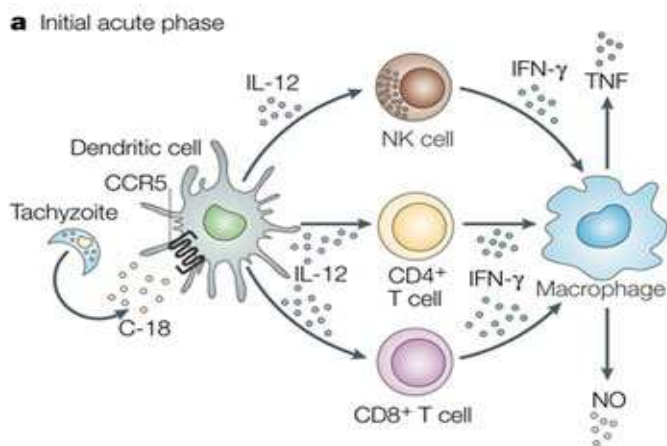


Figura 3. Control de la respuesta pro-inflamatoria durante la infección primaria con *T. gondii* (9).

Por otro lado, diversos trabajos de investigación han demostrado que la inducción temprana de IL-12 en respuesta a TSA es dependiente del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), una proteína adaptadora crucial en la vía de señalización de los receptores tipo Toll (TLRs) (11), lo que sugiere un papel importante de la respuesta inmune innata en el control de la infección a través de los receptores TLRs en las DCs, capaces de reconocer directamente a los antígenos de este parásito lo que promueve rápidamente una respuesta inflamatoria del tipo Th1 (12). Se ha propuesto que la resistencia temprana a la infección con *T. gondii* depende de un delicado balance entre la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- α , IL1 β e IL-16) (13, 14) y óxido nítrico (NO) (15) y de citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10). Las citocinas pro-inflamatorias estarían controlando la replicación del parásito (14), mientras que las anti-inflamatorias limitando la patología en el huésped (16). La aseveración anterior está apoyada por diferentes estudios que han demostrado que las citocinas tipo Th2 favorecen la infección (17, 18).

Por otro lado se ha demostrado que las DCs estimuladas con antígeno soluble total de *T. gondii* (TSA) favorecen la respuesta humoral *in vivo*, asociada a niveles altos de anticuerpos específicos tipo IgG2a, característicos de una respuesta tipo Th1 (19).

CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)

Las DCs son células esenciales en la respuesta innata y adaptativa, son células altamente especializadas para capturar, procesar y presentar antígenos que conllevan a la activación de las células T. Los progenitores de las DCs proceden de la médula ósea, un pequeño subconjunto de células CD34+ que son precursores hematopoyéticos que dan origen a todas las células de la sangre incluyendo a las DCs. Las DCs representan una población celular heterogénea debido a la existencia de distintos linajes. Cada población de DCs puede ser caracterizada por tres parámetros: ultraestructura, moléculas de superficie y función. Hasta ahora el origen del linaje de cada uno de los estados de maduración y las propiedades funcionales no han sido totalmente definidos (20). Entre los distintos fenotipos de células dendríticas hay DCs mieloides, DCs plasmocitoides y DCs de Langerhans (21).

DCs mieloides: son una población que proviene de un precursor CD34+ que da origen a los granulocitos y macrófagos que, bajo ciertas condiciones de factores de crecimiento como GM-CSF e IL-4, dan origen a la obtención de células inmaduras (20).

DCs plasmocitoides: Estas células originalmente se describen como células T plasmocitoides o monocitos plasmocitoides, se encuentran en la sangre, no expresan marcadores mieloides y su supervivencia depende de IL-3. Estas células expresan cantidades altas de receptor de IL-3 α (IL-3R α , CD123) y el inhibidor del receptor ILT3. Las células plasmocitoides son la fuente principal de IFN de tipo I y produce grandes cantidades de IFN- α en respuesta a una infección viral, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) (22).

DCs epiteliales: También llamadas células de Langerhans, están presentes sólo en epidermis y mucosas; se caracterizan por presentar granulaciones citoplasmáticas llamadas gránulos de Birbek que están implicados en la captura de antígeno (Ag) y en la migración de las células. Expresan el marcador de diferenciación CD1a. El TGF- β es esencial para el desarrollo de estas células epiteliales (23).

Subtipos de DCs murinas: En el ratón todas las DCs esplénicas expresan cantidades similares de CD11c, MHC-II, moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40, pero pueden ser subdivididas en tres clases con base en su expresión de CD4 y el homodímero CD8 α : CD8 α ⁻CD4⁻, CD8 α ⁻CD4⁺ y CD8 α ⁺CD4⁻. En el pasado, las DCs CD8 α ⁺ habían sido referidas como DCs linfoides y DCs CD8 α ⁻ como mieloides. Otros marcadores que son utilizados para segregar subtipos de DCs en ratón incluyen el marcador de células mieloides CD11b y el marcador de células interdigitantes CD205. Usando estos marcadores de membrana se han establecido cinco subtipos

convencionales de células dendríticas CD11c+/MHC-II+ que pueden ser encontrados en tejidos linfoides; las células de bazo contienen tres subtipos, que incluyen: DCs linfoides CD4⁻CD8α^{high}CD205⁻CD11b; DCs mieloides CD4+CD8α⁻CD205⁻CD11b+ y DCs mieloides de bazo y nódulos linfoides (LNs) CD4-CD8α- CD205 CD11b+ (24).

Captura de Ag por DCs inmaduras

Las DCs inmaduras son incapaces de estimular a un linfocito T porque carecen de moléculas accesorias como CD40, CD54 y CD86, sin embargo son muy eficaces para internalizar y procesar el Ag; esta actividad endocítica se pierde en el proceso de maduración (25). En la captura de Ag; intervienen algunas rutas como la macropinocitosis, la endocitosis mediada por receptores lectina tipo C (receptor de manosa, DEC205, CD23 y el FcεR), y la fagocitosis de partículas de fragmentos celulares apoptóticos y necróticos a través de CD36 e integrinas αβ3 ó αβ5), incluyendo virus, bacterias y micobacterias (26, 27).

Maduración y activación de las DCs

Después de la captura de Ag, las DCs adquieren la habilidad para responder constitutivamente a quimiocinas, las cuales dirigen su migración hacia los órganos linfoides secundarios. La maduración de las DCs es un proceso continuo que comienza en la periferia de estos órganos con el encuentro con el Ag o por la liberación de citocinas inflamatorias y termina con la interacción de las DCs y las células T. La maduración de las DCs implica la pérdida de receptores endocíticos/fagocíticos, la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras CD40, CD58, CD80, CD86, cambios en la morfología, cambios en los compartimentos lisosomales con la baja regulación de CD68 y la sobreexpresión de proteína de membrana asociada a los lisosomas de las DCs (DC-LAMP) y cambios en los compartimentos del MHC-II, así como la sobreexpresión de este marcador indicador de la maduración de las DCs (26). También se presenta la pérdida de las estructuras de adhesión, reorganización del citoesqueleto, y adquisición de una movilidad celular alta (28). Un controlador importante de la remodelación del citoesqueleto puede ser la proteína unida a la actina p55, expresada en niveles altos en DCs de sangre y DCs interdigitantes localizadas en las áreas de las células T de LNs (29). En las DCs maduras aumentan los niveles del factor de transcripción NF-κB que participa en el control transcripcional de proteínas (Rel A/p65, Rel B, Rel C, p50, p52) que regulan la expresión de proteínas que participan en la respuesta inmune e inflamatoria. La señalización a través de la familia del receptor de TNF, por ejemplo TNF-R (CD120a/b), CD40 y TRANCE/RANK, resulta de la activación de NF-κB (28).

Numerosos factores inducen y regulan la maduración de las DCs, incluyendo moléculas como el lipolisacárido (LPS), DNA bacteriano y RNA de doble cadena, el balance entre

señales pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en los microambientes locales, incluyendo TNF, IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β y prostaglandinas, señales derivadas de las células T, así mismo otra citocina implicada en la maduración de DCs es el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (Fig. 4) (28).

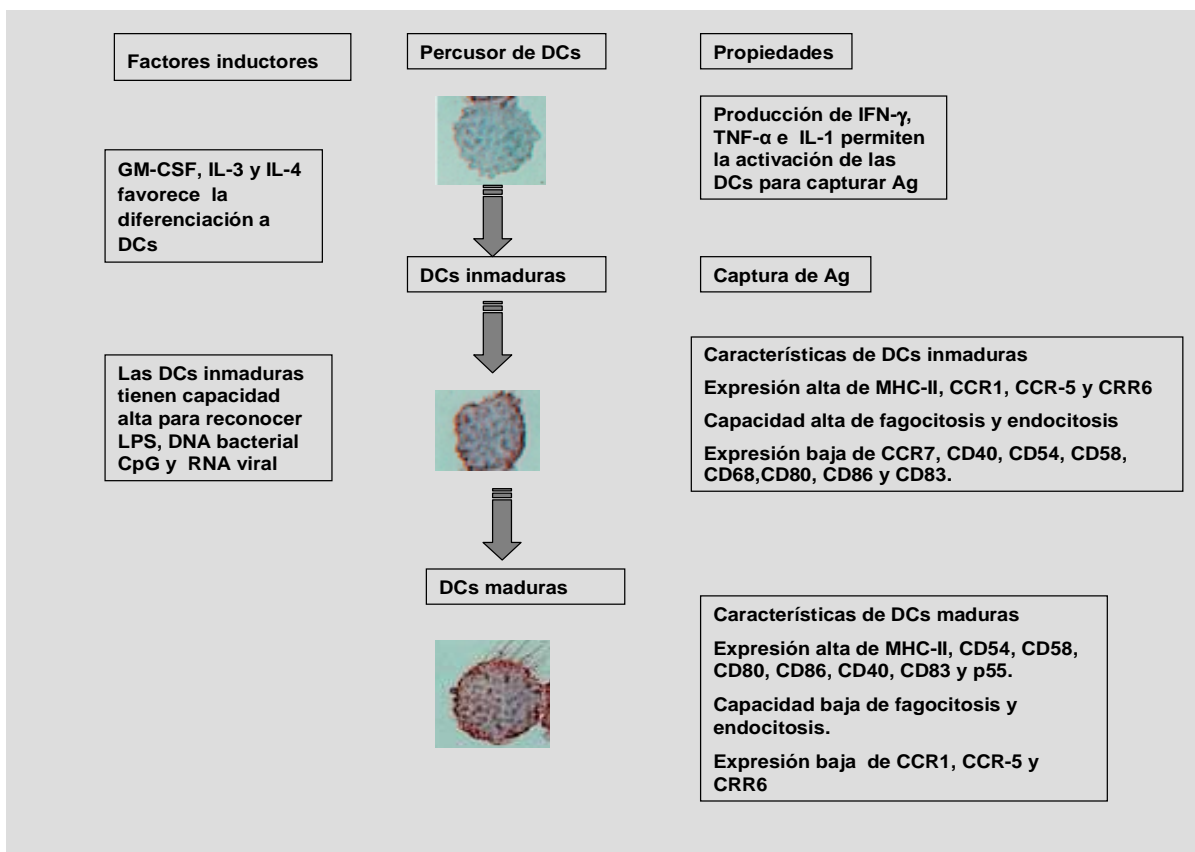


Figura 4. Estados de maduración de las DCs mieloides (28)

FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS (MIF)

MIF fue descubierto en la década de los 60s e inicialmente definida como una molécula que inhibía la migración de células peritoneales, presumiblemente macrófagos. Esta sustancia era liberada por los linfocitos en presencia de Ag como resultado de una reacción inmunológica específica (30, 31). Durante los subsecuentes 20 años, la actividad de MIF se correlacionó con funciones generales en la activación de macrófagos incluyendo adherencia, desprendimiento, fagocitosis y reforzando la actividad tumoricida. Sin embargo la clonación de cDNA de MIF humano y murino permitió un mejor análisis de las características biológicas, bioquímicas, biofísicas y las funciones de esta citocina (32, 33). Ahora se sabe que MIF es una molécula de 12.5 KDa, está compuesta por 115 aminoácidos y tres subunidades idénticas (Fig. 5). Tiene acción pleiotrópica y es producida, además de los linfocitos, por monocitos, macrófagos, DCs, células B,

neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos, así como en una gran variedad de células no inmunes de tejido normal, como en las células de la pituitaria anterior (34), miocitos cardiacos (35), cerebro, riñón y células β del páncreas (36, 37). Notablemente, en muchos de estos tejidos, MIF es sobre-expresado en condiciones patológicas como son la arterosclerosis, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, colitis, diabetes tipo 2, pancreatitis y cáncer (35-38), sugiriendo, en todos los casos, que MIF participa en los procesos de la enfermedad (31). Sin embargo, hasta ahora no se ha establecido específicamente cómo ejerce MIF estos efectos sobre células inmunes y no inmunes. Aún no se ha identificado un receptor específico de MIF y sólo se ha descrito la unión de MIF a un complejo formado por las moléculas CD74 y CD44 que median la señal de traducción de MIF, en la cual se da la activación de la ruta de señalización de Src cinasa y Akt llevando a la activación de NF-kappa B (39, 40).

Dentro de la repuesta inmune innata MIF actúa de manera parácrina y autócrina, promueve la activación de células así como la inducción de otras citocinas pro-inflamatorias. MIF es capaz de regular los efectos de los glucocorticoides en los sitios de inflamación (41), aumenta la capacidad fagocítica de los macrófagos (42) y elimina patógenos intracelulares como *Leishmania major* (43), y se ha observado que regula la acumulación de macrófagos en las reacciones de hipersensibilidad retardada (44). MIF incrementa la producción de TNF- α y NO en macrófagos estimulados con LPS (39).

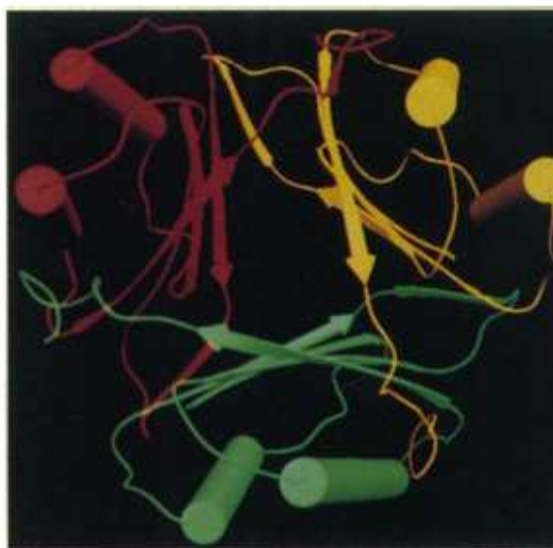


Figura 5. Estructura tridimensional de la proteína MIF por cristalografía (39).

Se ha demostrado que hay inducción de RNAm de MIF en células T cuando éstas son estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y superantígenos (44). Si se neutraliza la producción de MIF en estas células T se inhibe la producción de IL-2 bajo el estímulo de anti-CD3 ó por superantígenos y se reduce la proliferación en un 40-60%. *In vivo* los

tratamientos con anticuerpos anti-MIF resultan en un decremento de la proliferación celular y una reducción en la producción de anticuerpos IgG antígeno específicos (45), demostrando que MIF también actúa en la activación de las células T y tiene un papel importante en la regulación de la respuesta inmune adquirida. Diversos estudios sugieren que los efectos de MIF sobre la regulación de las funciones efectoras y la migración de las células T dependen de la subpoblación de células T o del modelo patológico estudiado. Por ejemplo, tanto la subpoblación de células Th1 como Th2 producen MIF, pero la producción de RNAm y la secreción de la proteína aumenta en las clonas de las células tipo Th2 tras la estimulación *in vitro* (44).

LA RELACIÓN DE MIF CON LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Diversos estudios han mostrado que MIF participa en la respuesta inmune a infecciones parasitarias (46). Sin embargo, su participación directa es poco clara. En 1991, el Dr. David y su grupo (46) reportaron por primera vez la participación de MIF en el control de una infección parasitaria. Al activar a los macrófagos, incrementan su capacidad fagocítica y por lo tanto, eliminan al parásito intracelular *Leishmania donovani* (46). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales MIF ejercía estos efectos no se establecieron. No hubo más estudios de MIF en enfermedades parasitarias hasta el año 2000, cuando el Dr. Bucala y su grupo (47) reportaron una correlación entre niveles elevados de MIF en suero de ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* y la severidad de la enfermedad y se probó que *P. chabaudi* inducía la producción de MIF en los macrófagos.

En un estudio posterior, el mismo grupo demostró que los pacientes infectados con *Plasmodium falciparum* (niños de Tanzania con malaria) tenían niveles incrementados de MIF y niveles disminuidos de TGF- β e IL-12 en suero, asociándose la severidad de la infección con los niveles disminuidos de estas citocinas (48). Ahora se sabe que hay una asociación directa entre anemia severa por malaria y la variante génica del gen MIF (el gen MIF 173 varía en una transición de C-G en comparación con el genotipo MIF 173; CC (49).

En 1973 Boros y colaboradores (50) describieron que granulomas hepáticos formados en la infección con *Schistosoma mansoni*, en donde se observó que se secretaban niveles altos de MIF (50). Pero fue recientemente que se estableció que MIF modula la respuesta inmune en la schistosomiasis. Se demostró que ratones infectados con *S. japonicum*, tratados a las 6 semanas post-infección con anticuerpos anti-MIF tuvieron un incremento significativo en el número de parásitos adultos, asociando a éstos con niveles disminuidos de TNF- α y niveles incrementados de IL-10 en esplenocitos y granulomas hepáticos (51).

Con relación a otras infecciones extracelulares, mediante experimentos de infección de ratones knock-out de MIF con *Taenia crassiceps* se ha demostrado que la ausencia de MIF favorece significativamente el establecimiento de *T. crassiceps* asociado a niveles séricos disminuidos de IgG2a específica y a una producción disminuida de IL-12, TNF- α y óxido nítrico (NO) en los macrófagos peritoneales de estos ratones (45). Nuestro grupo ha demostrado que la ausencia de MIF evita el desarrollo de la inmunidad protectora contra parásitos como *Leishmania major*, ya que los ratones MIF^{-/-} desarrollaron una carga parasitaria mayor y daño mayor en tejidos en asociación directa con niveles incrementados de IL-12, IL-6 y niveles significativamente menores de NO producido por los macrófagos (52, 53). También hemos descrito que de los ratones MIF^{-/-} tienen disminuidos los niveles séricos de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-18 e IL-1 β) en tiempos tempranos post-infección, y sucumben significativamente más rápido a la infección por *T. gondii* (cepas RH y ME49) que los ratones MIF^{+/+}. Esta susceptibilidad observada se asocia con la disminución de citocinas pro-inflamatorias, así como con un porcentaje alto de macrófagos infectados y un número mayor de quistes en los cerebros de los ratones MIF^{-/-}. Adicionalmente, demostramos que había una disminución de las DCs sistémicas obtenidas por gradiente de baja densidad en los ratones MIF^{-/-} infectados con *T. gondii* (53, 54), por lo que es de nuestro interés conocer la implicación de MIF en la regulación de la activación de las DCs murinas.

JUSTIFICACIÓN

MIF es una molécula fundamental en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa debido a su amplio rango de efectos inmunológicos. Aunque se desconoce su participación en la activación de las DCs para desarrollar una respuesta inmune contra parásitos como *T. gondii*. Por lo tanto la información derivada de esta investigación generará conocimientos sobre aspectos básicos de la modulación de las DCs por MIF.

HIPÓTESIS

MIF podría regular la producción de citocinas y la expresión de algunas moléculas de membrana en las DCs importantes para la respuesta inmune implicada en el control de la infección por *T. gondii*.

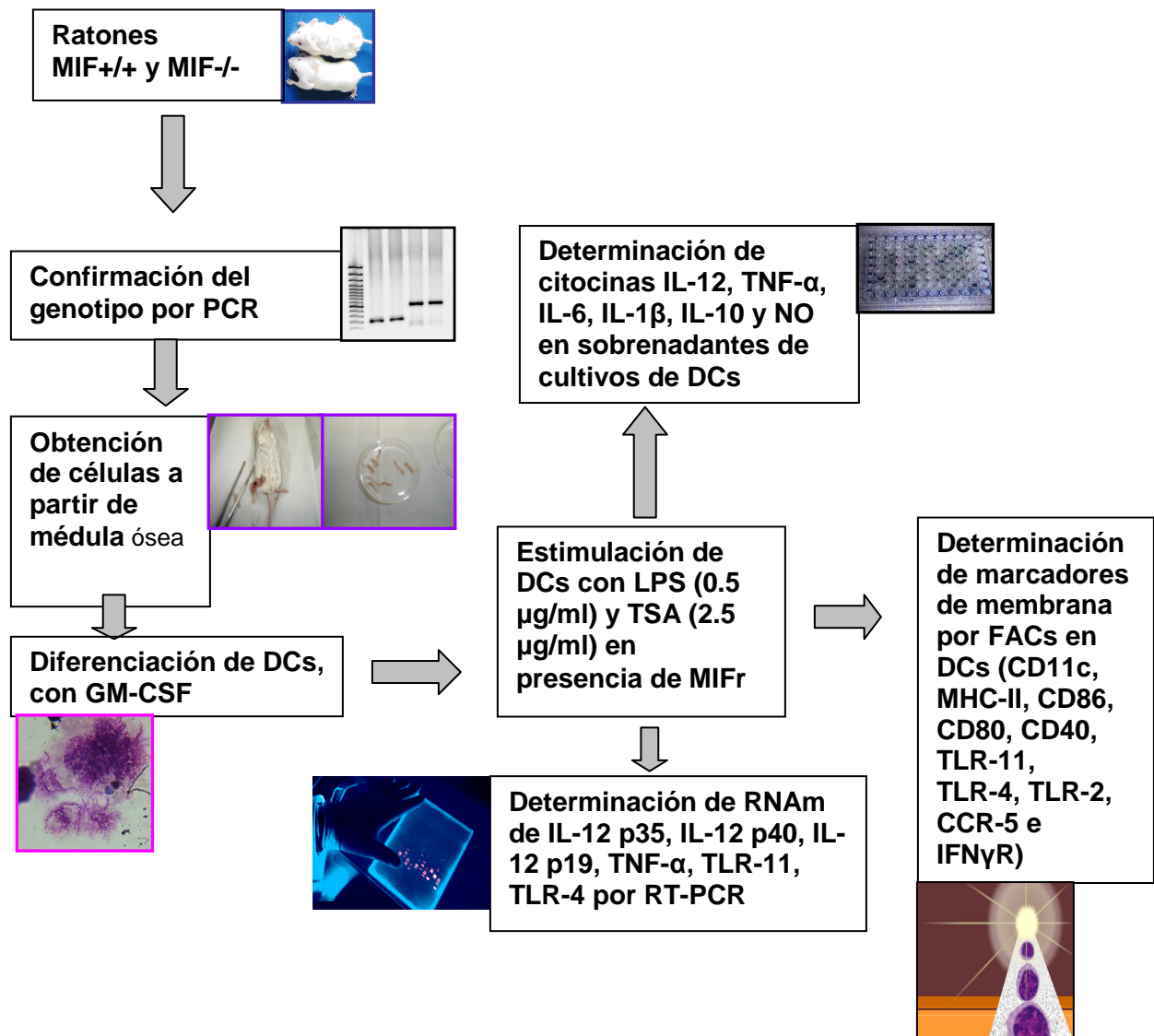
OBJETIVO GENERAL

Determinar si MIF modula la activación de las DCs en respuesta a TSA.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar si MIF afecta la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias y NO en DCs en respuesta al TSA.
- ❖ Determinar si MIF modifica la expresión de las moléculas de membrana MHC-II, CD86, CD40, TLR-4, TLR-9, TLR-2, CCR-5, e IFN- γ R en DCs estimuladas *in vitro* con TSA.
- ❖ Determinar si la expresión de RNAm de citocinas relacionadas con la resistencia a *T gondii* (IL-12 p35, IL-12 p40, IL-12 p19 y TNF- α) es dependiente de MIF.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones machos de 8 a 10 semanas de edad, con fondo genético BALB/c, deficientes en el gen que codifica MIF (MIF^{-/-}) y silvestres. Los ratones MIF^{-/-} fueron desarrollados originalmente de las cepas B6/129Sv. Posteriormente estos ratones MIF^{-/-} fueron retrocruzados por más de 12 generaciones con ratones BALB/c. Estos animales fueron donados por el Dr. John R. David, de la Escuela de Salud Pública de Harvard, y nosotros los hemos mantenido en reproducción desde hace más de cuatro años bajo condiciones estándares en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, donde son revisados genéticamente de manera rutinaria.

Genotipificación

Todos los animales fueron revisados genéticamente para determinar la ausencia de MIF por PCR siguiendo la técnica previamente descrita (54). Brevemente, utilizando material nuevo, estéril, libre de DNAsas y RNAsas se hizo un corte de la cola de los ratones experimentales y se colocaron en tubos eppendorf con 500 µl de solución amortiguadora de lisis Pk (Apéndice) y 20 µl de proteinasa K (4,000 µg/ml, Invitrogen) y se dejó incubar toda la noche a 56°C. Se agitaron los tubos en un vor tex y se centrifugaron por 10 min a 8,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de isopropanol frío, se homogenizó por inversión suave hasta que las hebras de DNA se hicieron evidentes. Se centrifugaron por 10 min a 10,000 rpm y se obtuvo la pastilla decantando el sobrenadante, se añadió etanol frío al 75%, se resuspendió la pastilla por inversión y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm. Se obtuvo el botón de DNA y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió el botón de DNA con 200 µl de agua destilada y se incubó a 56° C durante toda la noche para disolver el DNA. La cuantificación de DNA se realizó utilizando una dilución 1:200 en agua. Se calibró el espectrofotómetro con agua grado molecular (Jenway, Genova) y se analizaron las muestras a 260 nm. Para identificar el gen MIF se utilizaron los oligonucleótidos específicos de MIF y neomicina (NEO) cuya secuencia se muestra en la tabla 1. El volumen de la mezcla de reacción fue de 25 µl y contenía los componentes adicionados en el orden que se indica en la tabla 1 (Kit Taq Platinum polymerase, Invitrogen):

Tabla 1. Proporción de reactivos y sondas utilizadas para genotificar los animales del estudio.

Reactivo	MIF	NEO
Solución amortiguadora 10x	2.5 µl	2.5 µl
MgCl ₂	0.75 µl	0.75 µl
DNTP mix (20 mM)	0.5 µl	0.5 µl
Sonda F (50 pM)	5.6 µl	5.6 µl
Sonda R (50 pM)	4.1 µl	4.1 µl
DNA- Taq polimerase (5 U/µl)	0.25 µl	0.25 µl
Agua (Sigma)	9.3 µl	9.3 µl
Muestra de DNA	2 µl	2 µl
Producto	200 pb	500 pb
Oligos	(F)AgACCAgtgCTTAgtgCTgAg (R)gCATCgCTACCggTggAT AA	(F)ATTgAACAAgATggAT TgCAC (R)CgTCCAgATCATCCTg ATC

Las reacciones de PCR fueron amplificadas en un termociclador (Corbett Research) programado de la siguiente manera: 35 ciclos cada uno: 94° C por 30 seg para desnaturalizar, 58° C por 30 seg para alinear los oligonucleótidos y 72° C por 120 seg para extender la cadena. Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) al 1% de solución amortiguadora TBE 1x (Apéndice 1) sobre un molde y un peine de 10 pozos, que se mantuvo a 4° C por 30 min para que el gel solidificara. Después el gel se colocó en la cámara de electroforesis con solución amortiguadora TBE 1x y se colocaron 5 µl de muestra por pozo previamente mezclados con 3 µl de solución amortiguadora de carga Blue Juice (Invitrogen), y 3 µl de SYBR Green (Invitrogen), reactivo utilizado para la tinción de ADN. En el primer pozo se colocaron 3 µl de marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen) y a partir del segundo pozo se colocaron las muestras. Las muestras se colocaron hacia el extremo positivo y el gel se corrió a 90 volts, 150 mA durante 50 min.

Finalmente se observó el gel en un transluminador con luz ultravioleta (UV) y la imagen se capturó utilizando el programa Alphaimagen (Figura 6).

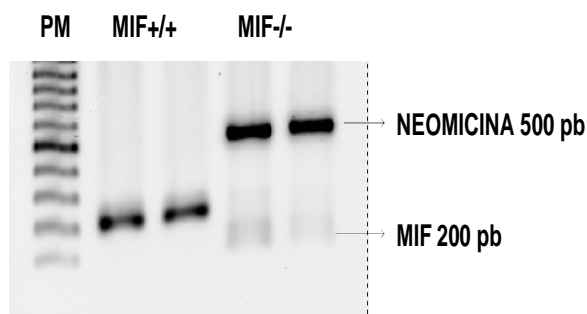


Figura 6. Gel representativo del genotipo de ratones MIF+/+ y MIF-/- por PCR.

Obtención de sobrenadante GM-CSF procedente de células de ovario de hámster chino (CHO)

Las DCs fueron diferenciadas a partir de linajes mieloides de células madre pluripotenciales de médula ósea. Para obtener DCs inmaduras a partir de monocitos precursores sanguíneos nosotros utilizamos sobrenadante rico en GM-CSF producido a partir de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO). El protocolo para obtener el GM-CSF a partir de CHO consistió en descongelar las células CHO en una caja pequeña (5-7 ml) con medio F12S (F12 completo con L-glutamina, penicilina/streptomina + 10% SFB + 1 mg/mL G418). Se dejaron crecer hasta que llegaron a un 80 ó 90% de confluencia, se obtuvo el sobrenadante y las células se despegaron con EDTA para sembrarlas en cajas más grandes (20-25 ml) con medio F12 C (F12 con 10% de SFB). También se obtuvo el sobrenadante de estas cajas y se paso por una unidad de filtración de 500 ml (Millipore) para que estuviera estéril y utilizarlo para poder diferenciar a las DCs *in vitro*.

Obtención de DCs derivadas de médula ósea

Se removieron la tibia y el fémur de ratones MIF+/+ y MIF-/- en condiciones de esterilidad, el hueso se limpió y se colocó en etanol al 70% por 1-3 min para lograr su desinfección. Posteriormente se lavó en PBS estéril. Se cortaron los extremos de los huesos, se perfundió el contenido con 4 ó 5 ml de PBS estéril en dos ocasiones usando una aguja de insulina. Se colectaron las células en tubos de 15 ml y se centrifugaron a 2500 rpm por 6 min a 4° C. La pastilla fue resuspendida en 1 ml de medio DMEM con penicilina (100 U/ml, Sigma), estreptomina (100 µg/ml, Sigma), L-glutamina (2 mM, Sigma), y 10% de SFB inactivado y filtrado (0.22 µm, Millipore). Para realizar el conteo celular se tomaron 20 µl de muestra y 20 µl de azul tripano (Sigma Chemical Co.), se homogenizó la suspensión

y se tomaron 10 μ l para colocarlos en la cámara de Neubauer. Se contaron 5 cuadrantes y se consideraron como viables a las células azul tripano negativas. Posteriormente se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/ml, en cajas de cultivo bacteriano estériles (Becton Dickinson) y se adicionaron 10 ml de medio DMEM complementado y 1 ml de sobrenadante de GM-CSF (a partir de células CHO). Las DCs se mantuvieron en cultivo durante 5-6 días en un incubador a 37° C con 5% de CO₂. El día de la siembra se consideró como día 0, al tercer día los cultivos se alimentaron con 8 ml de medio fresco DMEM completo con 1 ml de sobrenadante de GM-CSF, y del quinto al sexto día se recuperaron las células flotantes por centrifugación.

Las células DCs durante el proceso de diferenciación mostraron cambios en su fenotipo. En el día 1 y 2 de cultivo no se observaron cambios aparentes (Fig. 7 A). En el día 3 de cultivo se observó la formación de aglomerados (Fig. 7 B). En el día 4 de cultivo se dio la formación de células flotantes las cuales darían origen a las DCs; en esta etapa también se observaron células adheridas a la placa que en su gran mayoría son monocitos y granulocitos (Fig. 7 C). En el día 5-6 se formaron las prolongaciones citoplasmáticas y un aumento en el tamaño de las DCs lo cual nos indicaba que las DCs estaban listas para realizar la parte experimental (Fig. 7 D).

Estimulación de DCs *in vitro*

Una vez diferenciadas *in vitro* las DCs de médula ósea fueron colectadas en el día 6, y se ajustaron a 5×10^5 células/ml en medio DMEM completo con penicilina y estreptomina (100 U/ml c/una, Sigma), L-glutamina (2 mM, Sigma), y 10% de SFB inactivado. Se colocaron 100 μ l de la suspensión por pozo en una placa de 96 pozos (Becton Dickinson) y las DCs se estimularon con TSA (2.5 μ g/ml) o LPS (0.5 μ g/ml) y un grupo basal sin estímulo. Se colectaron los sobrenadantes después de 24 h de estímulo y se llevó al cabo la cuantificación de citocinas por ELISA-sandwich. Se cosecharon las células para analizar la expresión de moléculas co-estimuladoras y TLRs por citometría de flujo.

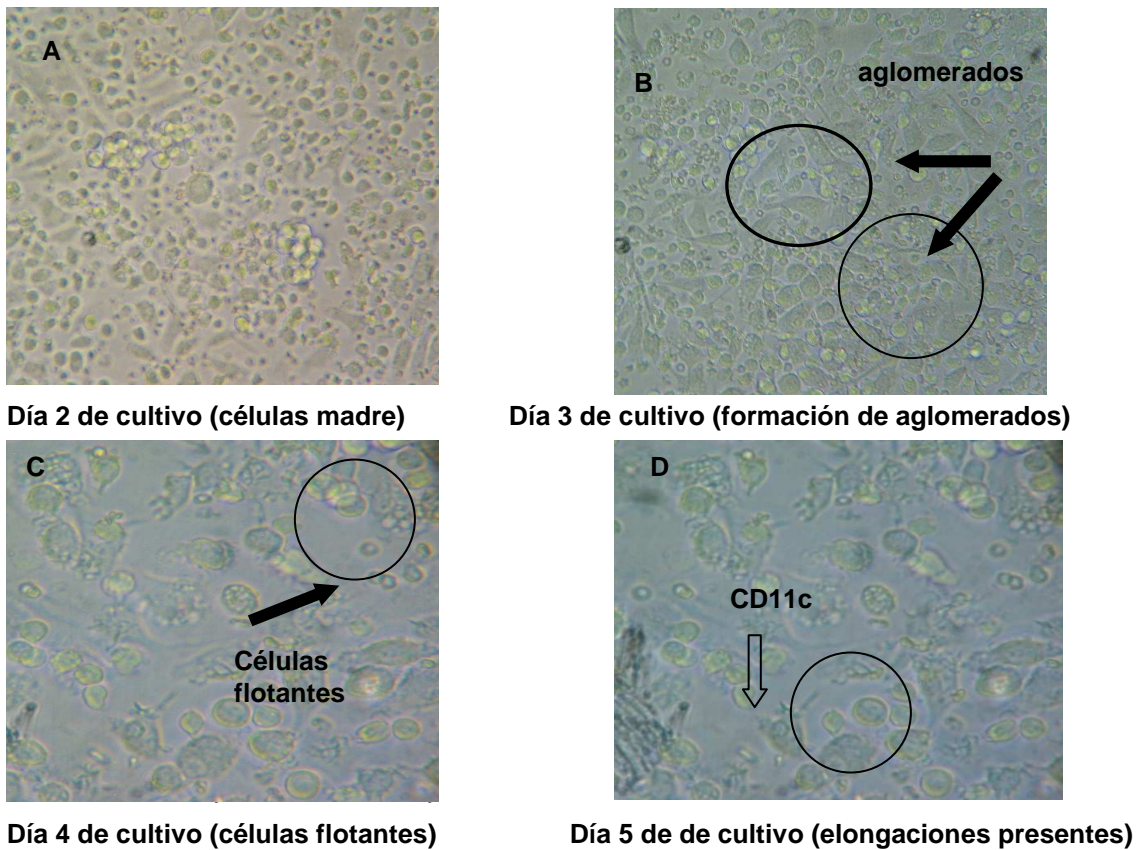


Figura 7. Proceso de maduración de DCs procedentes de médula ósea de origen mieloide a partir de un precursor CD34+.

Determinación de óxido nítrico

El ensayo para determinar NO en sobrenadantes consiste en preparar dos soluciones por separado, solución A (0.1% de clorhidrato de naftiletilendiamina) en agua destilada y solución B (1% sulfanilamida en H₃PO₄ al 5%). Antes de realizar la prueba, se mezclan la solución A y B en volumen iguales para así obtener el reactivo de Griess. Esta mezcla es estable por 12 h a 4° C, aunque las soluciones A y B pueden ser refrigeradas por varios meses. En una placa de 96 pozos se colocó en las dos primeras filas una curva de nitritos como control y referencia para extrapolar las concentraciones de nitritos en las muestras. Se colocaron 100 µl por cada pozo por duplicado de las diferentes concentraciones de nitritos (10, 5, 2.5, 1.25, 0.65, 0.315 y 0 mM) también se colocaron 50 µl del sobrenadante

celular y 70 μ l de reactivo de Griess. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se analizó la absorbancia a 550 nm - 620 nm en un lector de microplacas.

Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

Se realizó la detección de las citocinas IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-6, en los sobrenadantes de los cultivos celulares por medio de la técnica de ELISA-sandwich de acuerdo a las instrucciones de fabricante (Peprotech, México). Las placas de 96 pozos (Maxisorp) fueron sensibilizadas con 100 μ l por pozo del anticuerpo de captura purificado anti-mouse (IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Tabla 4) diluido en PBS a una concentración de 2 μ g/ml, se cubrió la placa para prevenir la evaporación y se dejó incubar toda la noche a 4° C. Se removió el anticuerpo de captura, se lavó 3 veces con PBS-Tween (1000 ml de PBS 1X + 0.5 ml de Tween). Posteriormente se añadieron 200 μ g/ml de PBS de bloqueo (PBS 1X + 1% de albúmina sérica bovina, BSA) por pozo para evitar las uniones no específicas. Se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Después se lavó la placa 4 veces con PBS/Tween y se realizó la curva de citocina recombinante murina por duplicado en los primeros pozos de la placa desde 20 ng/ml realizando diluciones a la mitad hasta el pozo 11 y al último pozo sólo se le agregó PBS-BSA al 1%. A los pozos restantes se agregaron por duplicado 50 μ l de los sobrenadantes, se incubaron toda la noche a 4° C. Se lavó 4 veces con PBS/Tween, se agregaron 100 μ l por pozo del anticuerpo biotinilado diluido en PBS-BSA (0.5 μ g/ml). Se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Después se lavó 6 veces con PBS/Tween y se agregaron a cada pozo 100 μ l de avidina peroxidasa (1:2000 en PBS-BSA 1%), se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 min. Trascorrida la incubación se lavó 6 veces con PBS-Tween y se añadieron a cada placa 100 μ l de ABTS (Apéndice) se incubó por 15 min a temperatura ambiente y se analizó la placa en un lector de microplacas (Thermo LabSystems) a 405 nm. Los datos obtenidos se analizaron con el software Multiskan Ascent y Graphpad Prism 5.0.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en el ensayo de ELISA

ANTICUERPO	MARCA
IL-12	Peprotech México
TNF- α	Peprotech México
IL-1 β	Biolegend
IL-6	Peprotech México

RT-PCR

Se utilizaron muestras de DCs resuspendidas en 800 μ l de trizol, se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se agitaron en vortex, se agregaron 200 μ l de cloroformo por cada ml de trizol, se agitaron fuertemente durante 15 seg y se mantuvieron a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min a 2°C, se recuperó la fase transparente (superior), se agregaron 500 μ l de isopropanol por cada ml de trizol y se mantuvieron 10 min a temperatura ambiente mezclando suavemente. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10000 rpm a 4°C. En las muestras que no se observó un botón se agregó 1 ml de etanol al 75% y se mezcló en un vortex por 5 a 10 segundos. Luego, se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min a 4°C y se decantó el etanol sin perder el botón. Una vez decantado el etanol se dejó secar al aire hasta eliminar los restos del mismo (10 - 20 min). Las muestras se resuspendieron en H₂O DEPC libre de DNAsas y RNAsas (20 a 40 μ l), se agitaron en un vortex, se hicieron alícuotas en tubos estériles y se mantuvieron a -70°C. Por último, se utilizó una alícuota para verificar la concentración del RNA. Posteriormente se utilizó el kit First- Strand Síntesis SuperScript II (invitrogen) para retrotranscribir el RNA en cDNA. Se utilizaron 5 μ g de RNA total ajustados a 10 μ l con agua mQ, el procedimiento se realizó en condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Se mezclaron los componentes del kit, First- Strand Síntesis SuperScript II en tubos libres de RNAsas de 0.2 ml con: 1 μ l de dNTP Mix 10 mM y 1 μ l de Oligo dT (0.5 μ g/ μ l) 1 μ l. Las muestras se incubaron por 5 min a 65°C en el termociclador y se colocaron los tubos en una cama de hielo por 1 min. A cada tubo se adicionaron los siguientes componentes con el volumen indicado: 10X RT buffer 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 4 μ l y 0.1 M DDT 2 μ l. Posteriormente los tubos se agitaron suavemente y se incubaron 2 min a 42°C, se adicionó 1 μ l de enzima SuperScript II RT (50 unidades) a cada reacción y se incubaron por 50 min a 42°C. A continuación, los tubos se incubaron a 70°C durante 15 min y se colocaron en hielo por 5 min. Para concluir, se agregó a cada tubo 1 μ l de RNasa H y se incubó a 37°C por 20 min, la concentración se ajustó a 50 ng/ml y los tubos se almacenaron a -70°C. Para analizar las diferencias entre los tratamientos, se amplificaron los genes RNAr18S (gen control), TLR4, y TLR-11. Las mezclas de reacción se llevaron a un volumen final de 25 μ l de solución amortiguadora 10x, 2.5 μ l de MgCl (25 mM), 1 μ l de DNTP mix (2 Mm), 2 μ l de sonda F (15 pM), 1 μ l de sonda R (15 pM), 1 μ l de

cDNA (50 ng/ml), 1 µl de Taq polimerasa (5 u/µl) y 16.3 µl de H₂O mQ. Las sondas específicas que se utilizaron para amplificar cada gen se presentan en la tabla 2.

PCR tiempo real

La concentración de cDNA se ajustó a 50 ng/ml, se realizó el análisis cuantitativo por PCR tiempo real de acuerdo a las instrucciones del KIT IQ Supermix. Se usaron sondas de IL-12 p35, IL-12 p40, IL-12 p19 y 18s (gen constitutivo) utilizando como fluorocromo el SYBRTM Green I (1X) (Amresco) como lo describe la literatura (55) en un termociclador de tiempo real, Rotor Gene RG 3000 (Corbett Research). La secuencia de las sondas de cada gen se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de sondas y condiciones de amplificación de citocinas

Sondas de citocinas	Producto	T°alineación	Referencia
TLR-4 5ACCTGGCTGGTTTACACGTC3 5'CTGCCAGAGACATTGCAGAA3'	201 bp	52°C	(56)
TLR-11 5CTgCAAgtttgactggct actc3' 5'CTg CAAg TTTgACTg gCT ACTC3'	350 bp	56°C	Diseñado por el programa FAST PCR
TNF-α 5GGCAGGTCTACT TTGGAGTCATTGC 3 5'ACATTCGAGGCTCCAGTCAAT TCG 3'	307 bp	59°C	(56)
IL-12 p35 5'GCAAGAGACACAGTCCTGGG3' 5'TGCATCAGCTCATCGATGGC3'	618 bp	55°C	(57)
IL-12 p40 F-5'GGAGACCCTGCCATTGAACT3' R-5'CAACGTTGCATCCTAGGATCG3'	421bp	55°C	(57)
IL-12 p19 5'TgCTggATTgCA gAg CAg TAA3' 5'CTg gAg gAg TTg gCT gAgTC 3'	413 bp	54°C	(58)
18S 5'GGGAGCCTGAGAAC GGC3' 5' GGG TCG GGA GTG GGT AAT TT 3'	212 bp	59°C	Diseñado por el programa FAST PCR

Citometría de flujo

Se utilizaron DCs, estimuladas con LPS (0.5 µg/ml) y TSA (2.5 µg/ml) por 24 h. Se recuperaron las células y se centrifugaron a 2500 rpm por 8 min y se decantó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 500 µl de solución amortiguadora para FACs. Se incubaron las células con los anticuerpos primarios correspondientes aclopados

con fluoresceína (FITC) y/o ficoeritrina (PE) como se muestra en la tabla 5 (1 $\mu\text{g/ml}$, PharMingen) en tubos Falcon de 5 ml a 4° C por 30 min en la oscuridad. Se utilizó un anticuerpo anti-IgG2 como control de pegado inespecífico. Las células se lavaron 2 veces con solución amortiguadora de FACs para quitar el excedente del anticuerpo primario y posteriormente se les agregó paraformaldehído al 1% para fijar las células y evaluarlas en los siguientes 4 días. Se analizaron 10000 eventos por muestra, utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson). Se clasificaron las DCs de acuerdo a su tamaño (FSC) y granularidad (SSC), se delimitó la región R1 agrupando la población de DCs. Las células aisladas de ratones que fueron teñidas con el anticuerpo isotipo mostraron un pegado inespecífico menor al 5% (Fig. 8).

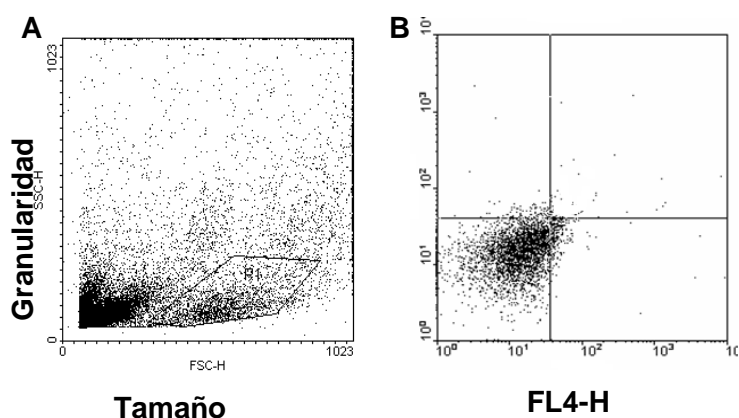


Figura 8. Citometría de flujo de DCs. Delimitación de la población de DCs por tamaño y granularidad (A), determinación de cuadrantes (B).

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en el análisis por citometría de flujo.

ANTICUERPO	CLONA	MARCA
MHC-II (FITC)	CLONA 11-5.2	Biologend
CD11c (APC)	CLONA N418	Biologend
CD40 (FITC)	CLONA G28.5	Biologend
CD86 (PE)	CLONA GL-1	Biologend
TLR-4 (PE)	CLONA MTS510	Biologend
TLR-11 (FITC)	POLICLONAL	Ebioscience
TLR-2 (PE)	CLONA 6C2	Biologend
CCR-5 (FITC)	CLONA T21/8	Biologend
IFN- γ R (PE)	POLICLONAL	Santa Cruz Biotechnology

Análisis estadístico Las comparaciones entre los diferentes grupos considerados en este trabajo se realizaron mediante la prueba t de Student (GraphPAD Prism 5.0). Se consideraron significativas las comparaciones con valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

MIF ES NECESARIO PARA LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NITRÍCO

Los intermediarios de nitrógeno reactivo, incluyendo al NO, han sido identificados como moléculas efectoras importantes que restringen el crecimiento de patógenos en los hospederos infectados (59). Con la finalidad de establecer si MIF modula la producción de NO en DCs se determinó esta molécula en el sobrenadante de cultivos de DCs estimuladas por 24 h con TSA y LPS como control positivo. En la figura 9A se observa que la producción de NO en DCs de ratones MIF+/+ sin estímulo (basal) fue de alrededor de 20 μ M, cuando estas mismas células fueron estimuladas con LPS o TSA se incrementó significativamente la producción de NO, alcanzando niveles de alrededor de 40 y 50 μ M respectivamente, siendo el mejor inductor de NO el TSA. En la misma figura 9A puede observarse que las DCs de ratones MIF-/- sin estímulo (basal) produjeron cantidades similares de NO (19 μ M) que el grupo de DCs de ratones MIF+/+ basal. Sin embargo, al ser estimuladas con LPS y TSA no respondieron tan eficientemente como las DCs de ratones MIF+/+, alcanzaron niveles de sólo 20 y 30 μ M respectivamente, y observándose una disminución estadísticamente significativa comparada con los niveles producidos por las DCs de los ratones MIF+/+. Estos resultados nos sugieren que MIF puede ser un inductor positivo de la producción de NO. Con la finalidad de probar esta posibilidad se incorporó MIFr (10 ng/ml) a los cultivos de DCs de ratones MIF-/- estimuladas con LPS y TSA y observamos que la incorporación de MIFr favorecía la recuperación en la producción de NO en ambos casos (40 y 50 μ M, respectivamente) (Fig. 9B). Estos resultados sugieren que MIF participa como co-activador de la producción de NO en DCs y podría tener un papel importante en la regulación de la respuesta inmune innata.

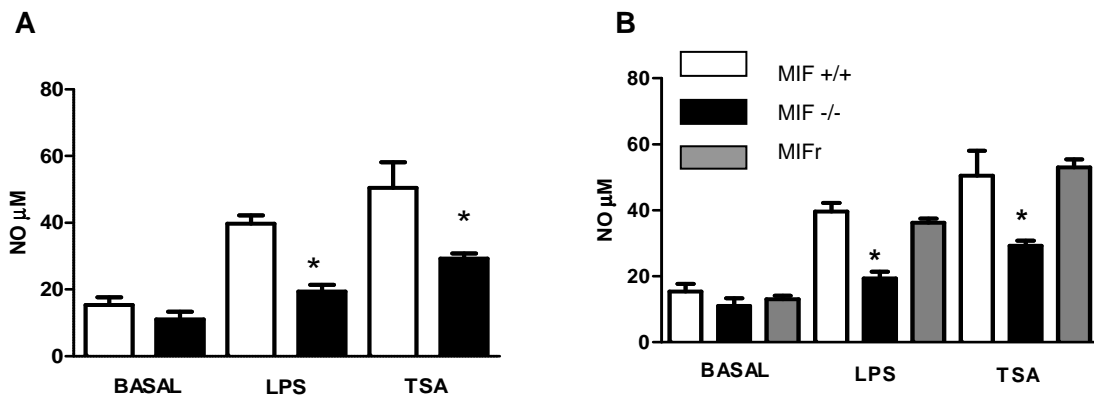


Figura 9. Producción de NO en sobrenadantes de cultivos de DCs estimuladas con 0.5 μ g/ml de LPS y 2.5 μ g/ml de TSA, * $p < 0.05$ (n=4) "t" de Student vs. MIF+/+.

MIF MODIFICA LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A LA INFECCIÓN POR *T. gondii*.

Una vez que establecimos que MIF puede ser importante en la respuesta inmune innata debido a su regulación sobre los niveles de NO, decidimos investigar si MIF también participa en la respuesta inmune adquirida. Analizamos algunas citocinas pro-inflamatorias consideradas importantes para conferir resistencia en la infección por *T. gondii*. Se cuantificó por ELISA la secreción de IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-6 en el sobrenadante de cultivos de DCs estimuladas por 24 h con TSA o LPS como control positivo. En la figura 10 se observa que la producción basal de IL-12 (A), TNF- α (B), IL-1 β (C) e IL-6 (D) no se modifica en DCs provenientes de ratones MIF $^{-/-}$ comparadas con DCs de ratones MIF $^{+/+}$. Al agregar los estímulos de LPS y TSA la producción de estas citocinas se incrementó significativamente en ambos tipos celulares, siendo el TSA mejor inductor de IL-12, TNF- α e IL-6. Sin embargo, en las DCs de los ratones MIF $^{-/-}$ la inducción fue menor que en las células MIF $^{+/+}$. Cuando se agregó proteína MIFr a los cultivos de DCs de ratones MIF $^{-/-}$ (Figura 11) se observó una recuperación casi total de los niveles de citocinas secretadas al estimular las células con LPS y TSA sin modificar el nivel basal. Nuevamente estos resultados sugieren que MIF actúa como un factor que regula positivamente la producción de estas citocinas pro-inflamatorias en colaboración con otros factores, teniendo así un papel co-estimulador más que regulador directo.

Ya que observamos modificaciones a nivel de secreción de proteínas decidimos evaluar si la modificación en la secreción de las proteínas se puede deber a una reducción en la expresión de las mismas. Utilizamos la técnica de PCR-tiempo real para determinar la expresión de transcrito de TNF- α y de las diferentes subunidades de la IL-12 (p35, p19 y p40) utilizando como control el gen constitutivo GAPDH. En la figura 12 se puede observar que la expresión relativa de TNF- α (A) y las diferentes subunidades de IL-12; IL-12p35 (B), IL-12p19 (C) y IL-12p40 (D) están disminuidos en las DCs provenientes de ratones MIF $^{-/-}$ comparados con DCs de ratones MIF $^{+/+}$ al ser estimuladas tanto con TSA como con LPS. De la misma manera que con la proteína, los niveles de expresión relativa de las citocinas en DCs de ratones MIF $^{-/-}$ aumentó a niveles cercanos a los de DCs de ratones MIF $^{+/+}$ cuando se adicionó proteína MIFr a los cultivos (Fig. 13).

Con todo lo anterior se puede concluir que MIF ejerce un papel importante a nivel de la expresión de los transcritos de TNF- α y de las diferentes subunidades de la IL-12, tanto en respuesta a TSA como a LPS y que por lo tanto la disminución en los niveles de proteínas secretadas presentes en los sobrenadantes de los cultivos de DCs se debe a una disminución en la expresión y síntesis de la proteína.

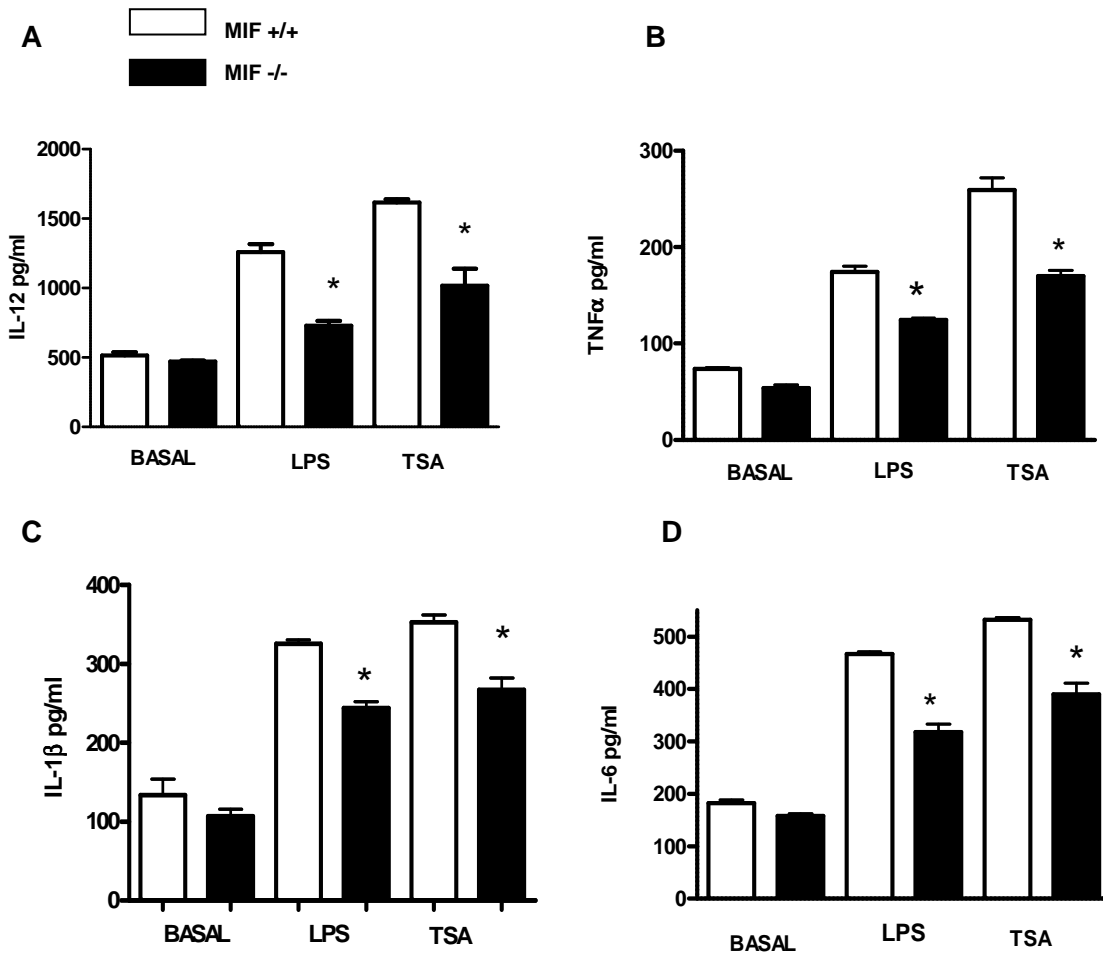


Figura 10. Cuantificación por ELISA-sandwich de IL-12 (A), TNF- α (B), IL-1 β (C) e IL-6 (E) en sobrenadantes de cultivos de DCs estimuladas por 24 h con 0.5 μ g/m de LPS y 2.5 μ g/ml de TSA * $p < 0.05$ (n=4) "t" de Student vs. MIF+/+.

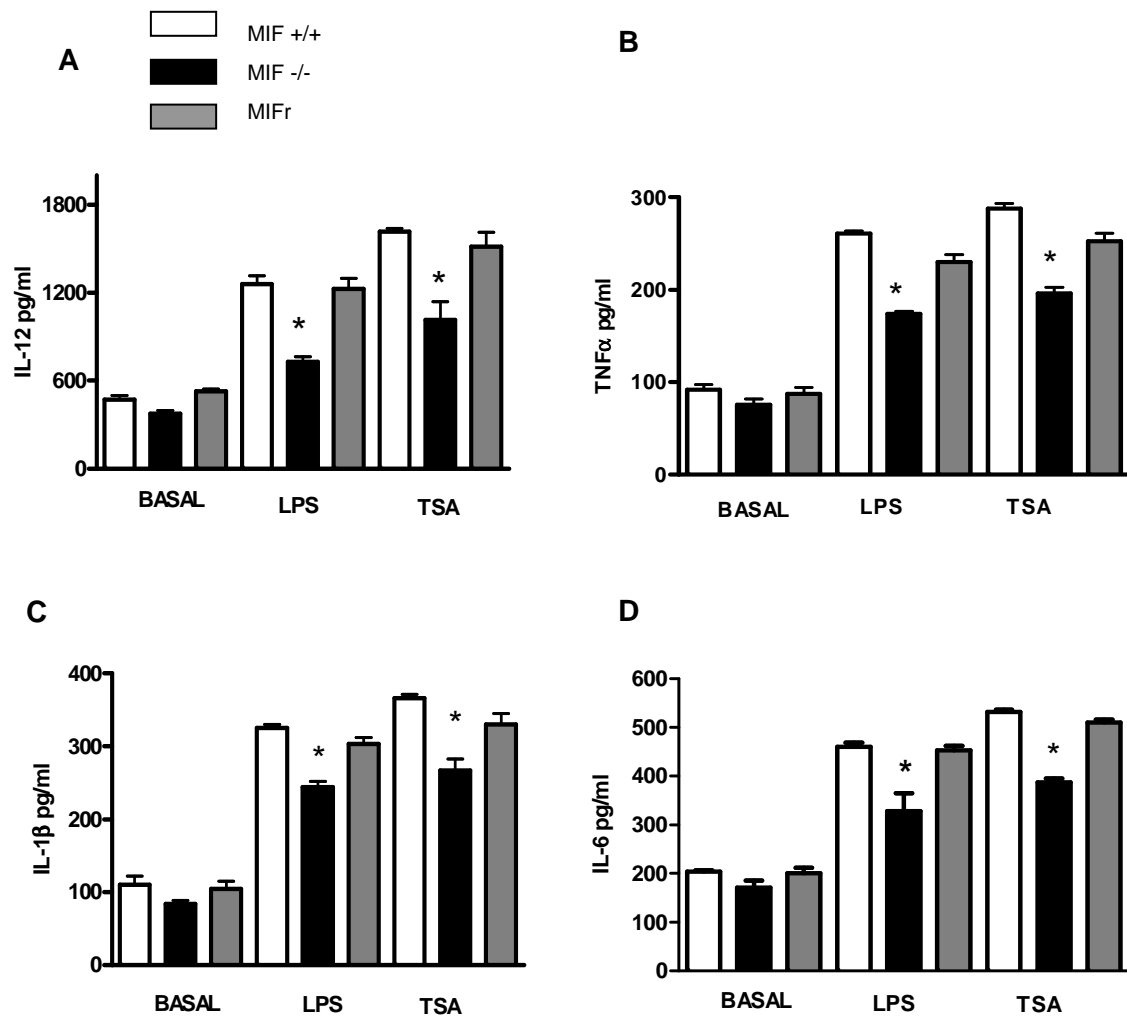


Figura 11. Cuantificación por ELISA-Sandwich de TNF- α (A), IL-12 (B), IL-1 β (C) e IL-6 (D), en sobrenadantes de cultivos de DCs estimuladas por 24h con 0.5 μ g/ml de LPS y 2.5 μ g/ml de TSA y con la adición de 10 ng/ml de MIFr (barra gris), * $p < 0.05$ (n=4) "t" de Student vs. MIF+/+ ** $p < 0.05$ t de student MIFr vs MIF +/+.

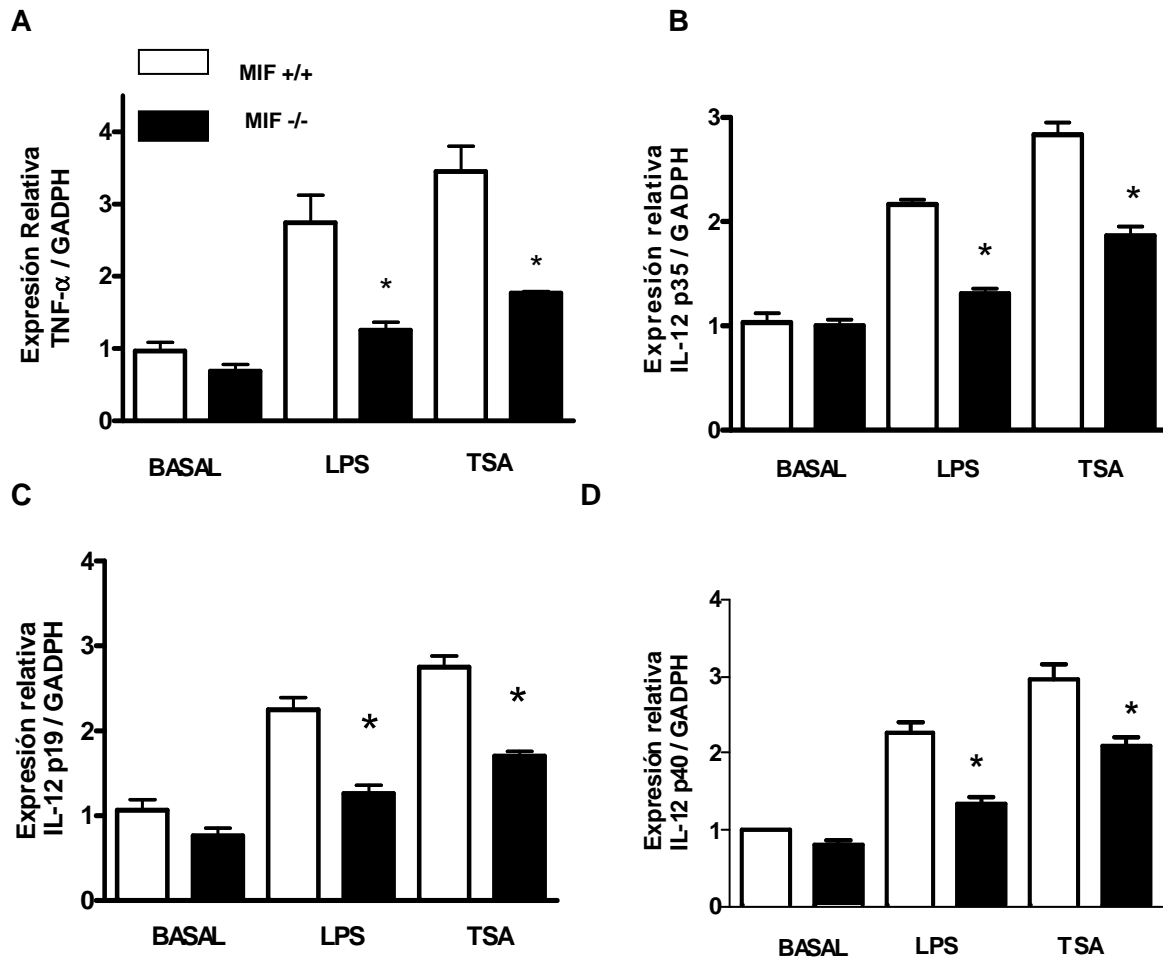


Figura 12. Expresión relativa de TNF- α (A), IL-12 p35 (B), IL-12 p19 (C) e IL-12 p40 (D), en RNAm de DCs estimuladas con (2.5 μ g/ml) de TSA y (0.5 μ g/ml) de LPS $p < 0.05$ (n=4) "t" de Student vs. MIF+/+ ** $p < 0.05$ t de student MIFr vs. MIF +/+.

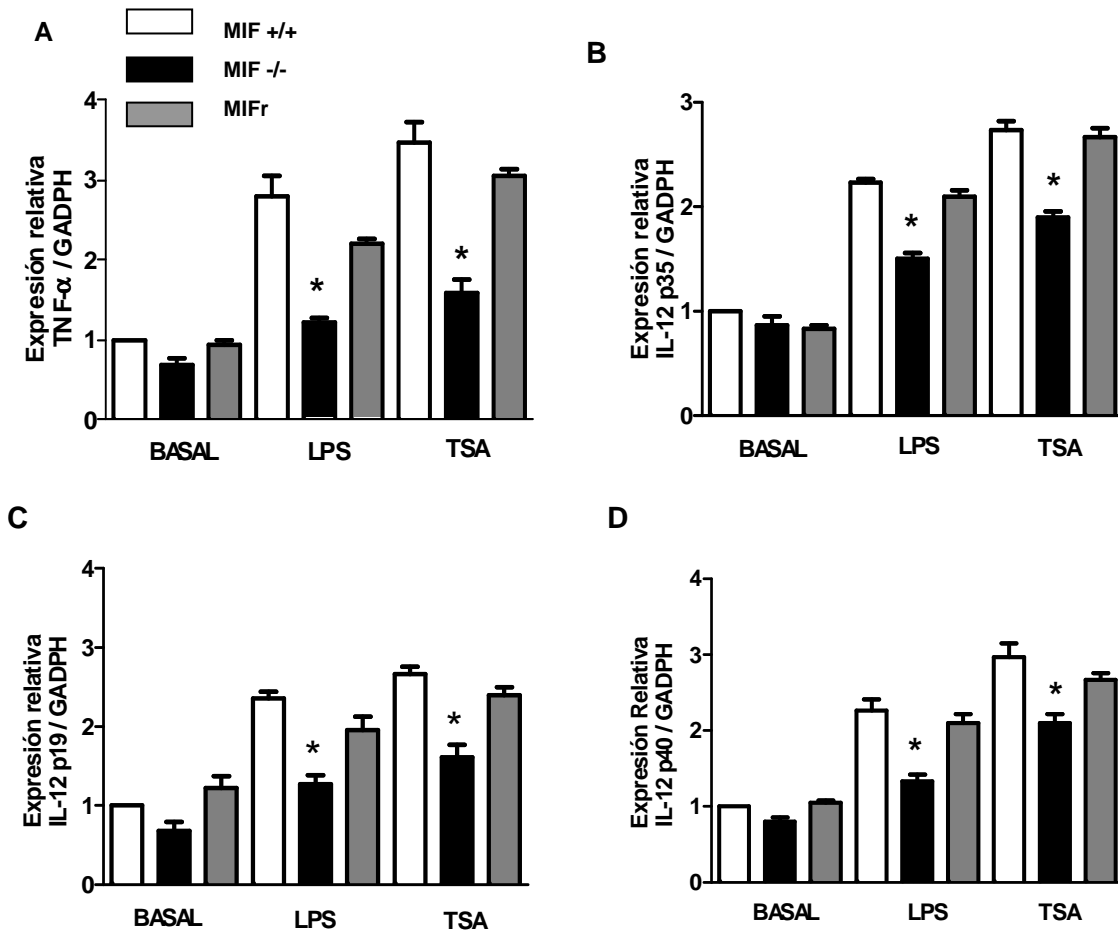


Figura 13. Expresión relativa de TNF- α (A), IL-12 p35 (B), IL-12 p19 (C) e IL-12 p40 (D) en DCs estimuladas con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de TSA durante 24 hs, y con la adición de 10 ng/ml de MIFr (barra gris) $p < 0.05$ (n=4), “t” de Student vs. MIF+/+, ** $p < 0.05$ “t” de Student MIFr vs. MIF+/+.

MIF MODIFICA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS EN DCs

Además de las citocinas proinflamatorias, otras moléculas importantes implicadas en la activación adecuada de las DCs son las moléculas de membrana coestimuladoras como MHC-II, CD86, CD80 y CD40. Con la finalidad de establecer si MIF participa en la regulación de estas moléculas en DCs, se determinó su expresión por citometría de flujo en DCs de ratones MIF+/+ y MIF-/- estimuladas por 24 h con TSA y LPS como control.

En la figura 14 se observa la expresión de MHC-II en DCs. En los grupos MIF+/+ en condiciones basales las DCs expresan constitutivamente MHC-II, al agregar los estímulos con LPS y TSA hubo un discreto incremento no significativo en la expresión de esta molécula. En las DCs de ratones MIF-/- sin estímulo (basal) se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de MHC-II. Los estímulos antigénicos con LPS y TSA no parecieron tener algún efecto positivo que favoreciera la expresión de la molécula MHC-II.

La incorporación de MIFr a los cultivos de las DCs de ratones MIF-/- tanto basales, como con los estímulos antigénicos favoreció la expresión de MHC-II en los tres grupos, aún cuando no alcanzaron los niveles de expresión observados en las DCs de ratones MIF+/+ (basal, LPS y TSA).

Estos resultados confirman que la molécula MHC-II se expresa de manera constitutiva en las DCs de ratones MIF+/+ y esta expresión no es dependiente, de manera importante, por la presencia de los estímulos antigénicos LPS y TSA. Por otro lado, la regulación negativa en la expresión de MHC-II observada en las DCs de ratones MIF-/- a nivel basal con LPS y TSA sugiere que la deficiencia de MIF afecta los procesos de maduración de las DCs y en consecuencia posiblemente también se afecte la presentación de antígenos, sugiriendo, entonces a MIF como una molécula importante en los procesos de maduración de las DCs (60).

Actualmente es ampliamente aceptado que la infección por *T. gondii* regula los niveles de expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (61). Con la finalidad de establecer si MIF participa en esta regulación se determinaron los niveles de expresión de estas dos moléculas en las DCs MIF+/+ y MIF-/- estimuladas *in vitro* por 24 h con TSA y LPS como control.

En la figura 15 se observa que la expresión de CD86 en las DCs de ratones MIF+/+ en estado basal fue significativamente menor en comparación con los estímulos LPS y TSA, cabe señalar que el mejor inductor de CD86 fue el TSA. En las DCs de ratones MIF-/- en estado basal la expresión de esta molécula estuvo significativamente disminuida en comparación con las DCs de ratones MIF+/+ basal y con los estímulos antigénicos LPS y TSA no favorecieron significativamente su expresión también se observó una menor

expresión de CD86 en comparación con los estímulos. Al incorporar MIFr en los cultivos de las DCs de ratones MIF^{-/-} se observó una recuperación de CD86 en estado basal y en cada uno de las DCs estimuladas con LPS o TSA. Con todo lo anterior se puede concluir que MIF favorece a la expresión de CD86.

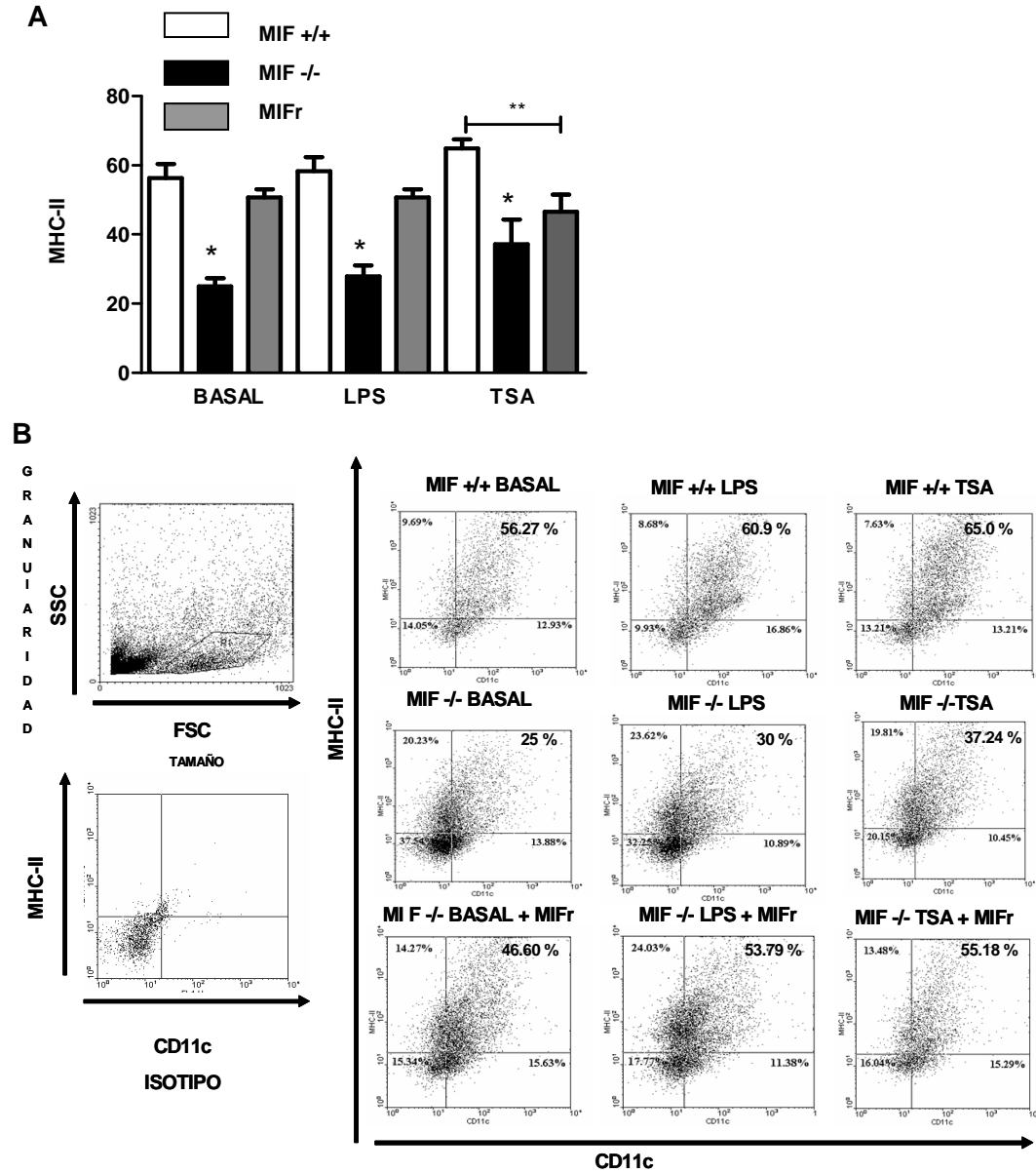


Figura 14. Expresión de MHC-II en DCs. Análisis estadístico (A) y dot plots (B). Las DCs fueron estimuladas con 0.5 μ g/ml de LPS, 2.5 μ g/ml de TSA y procesadas 24 h después de la estimulación, *p < 0.05 (n=4), "t de Student vs. MIF^{+/+}, ** p < 0.05 t de Student MIFr vs. MIF^{+/+}.

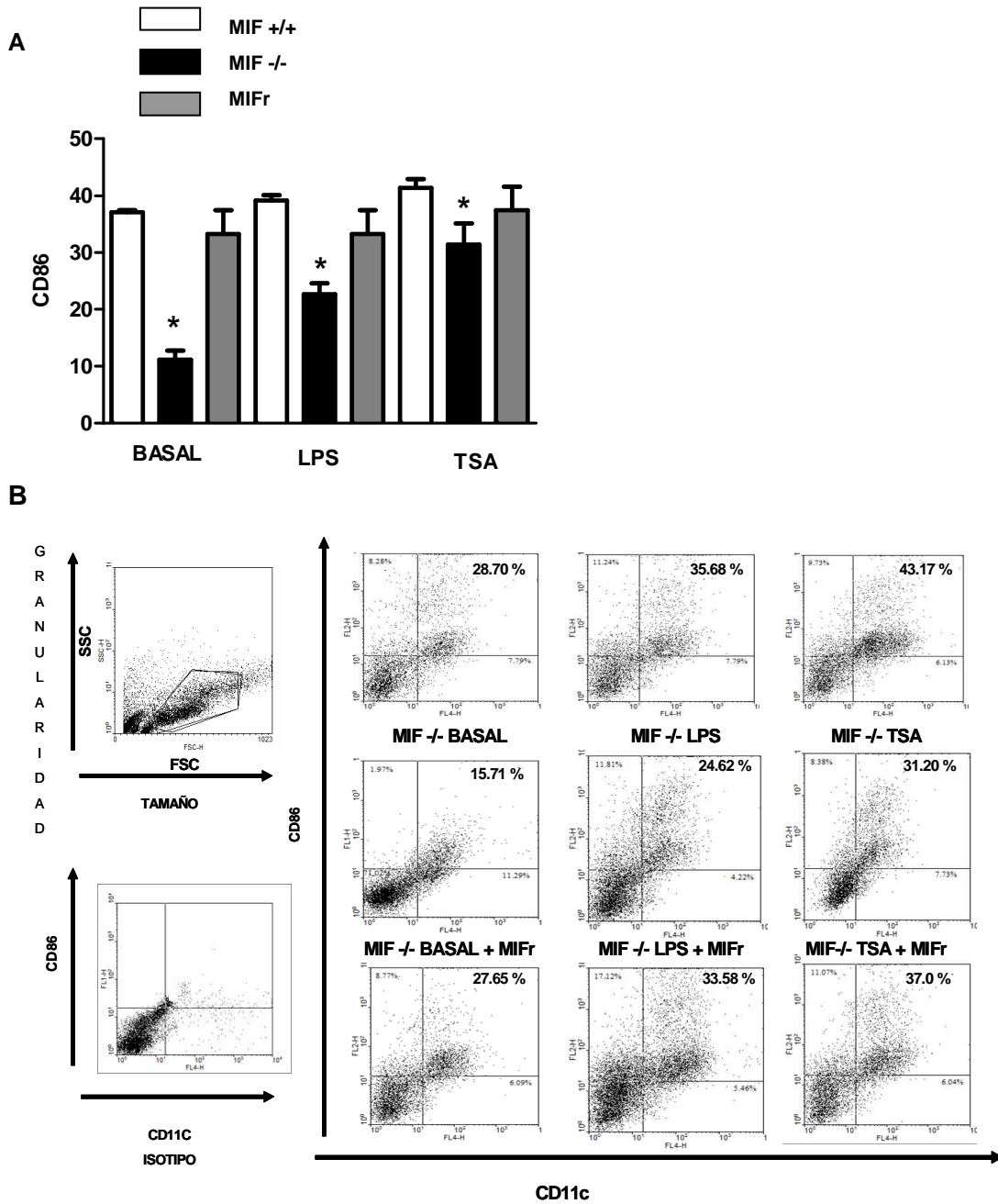


Figura 15. Expresión de CD86 en DCs. Análisis estadístico (A) y dot plots (B). Las DCs fueron estimuladas con LPS (0.5 $\mu\text{g/ml}$) y (2.5 $\mu\text{g/ml}$) de TSA y procesadas 24 h después de la estimulación, * $p < 0.05$ ($n=4$), *t de Student vs. MIF+/+, ** $p < 0.05$ t de Student MIFr vs. MIF+/+.

En la fig 16 se puede observar que las DCs de ratones MIF+/+ estimuladas con LPS y TSA incrementaron su expresión de CD80 en relación con las DCs sin estímulos antigénicos, basal. Siendo el mejor inductor de esta sobreexpresión el TSA. En las DCs de ratones MIF-/- no estimuladas, se observó una disminución estadísticamente significativa con respecto a la expresión de las DCs de ratones MIF+/+ basal. El estímulo con LPS favoreció a una discreta sobreexpresión de esta molécula que no fue estadísticamente significativa respecto a las DCs de ratones MIF-/- basal. El estímulo con TSA incrementó la expresión más eficazmente que el LPS. Tanto el LPS como TSA favorecieron parcialmente la expresión de CD80 en las DCs de ratones MIF-/-, sin embargo en ninguno de los casos se alcanzaron los niveles de expresión observados en las DCs de ratones MIF+/+. Al incorporar MIFr en los cultivos de las DCs de ratones MIF-/- se recuperó significativamente la expresión de CD80 en los tres grupos (basal, LPS y TSA) siendo constante esta expresión para todos los grupos.

Con todo lo anterior se puede concluir que el LPS no presenta un efecto sinérgico en la expresión de CD80 y que el mejor inductor de CD80 es el TSA en presencia de MIF.

En la Fig 17 se observa la expresión de CD40 en los grupos de DCs de ratones MIF+/+ en estado basal la expresión fue menor en comparación con los estímulos LPS y TSA, al agregar estos dos estímulos la expresión se incrementó significativamente, en donde el TSA fue el mejor inductor de la expresión de CD40. En los grupos de DCs de ratones MIF-/- también se observó un efecto escalonado siendo el mejor inductor también el TSA. Sin embargo la ausencia de MIF disminuye significativamente la expresión de esta molécula en los grupos basal, LPS, TSA. Al incorporar MIFr se recuperó la expresión de CD40 con los estímulos LPS y TSA, ya que en estado basal no hubo una recuperación significativa. Con lo anterior se puede concluir que CD40 responde solo en presencia de LPS como TSA siempre y cuando MIF se encuentre presente.

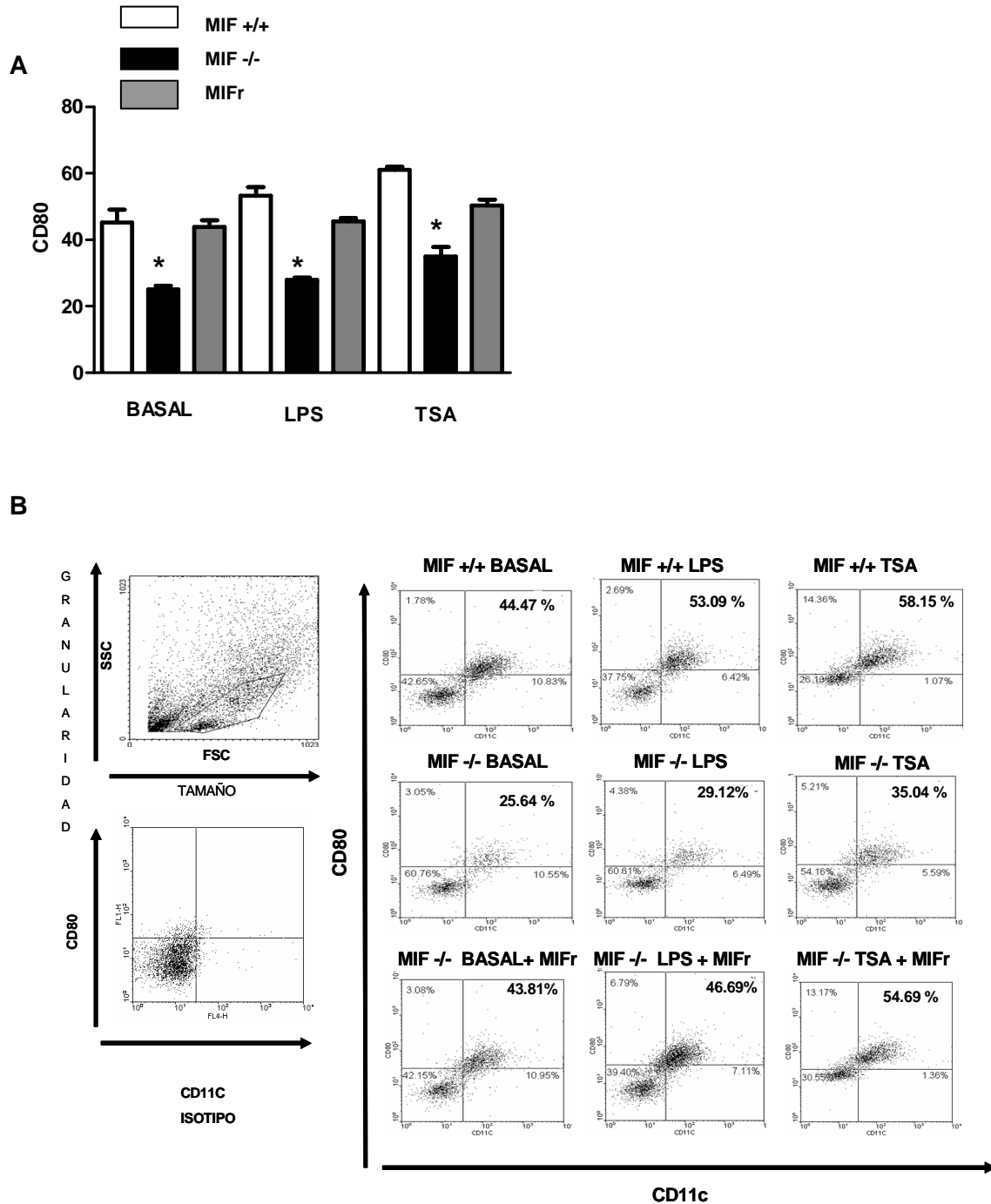


Figura 16. Expresión de CD80 en DCs. Análisis estadístico (A) y dot plots (B). Las DCs fueron estimuladas con LPS 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de TSA y procesadas 24 h después de la estimulación, * $p < 0.05$ ($n=4$), “t” de Student vs. MIF+/+, ** $p > 0.05$ “t” de Student MIFr vs. MIF+/+.

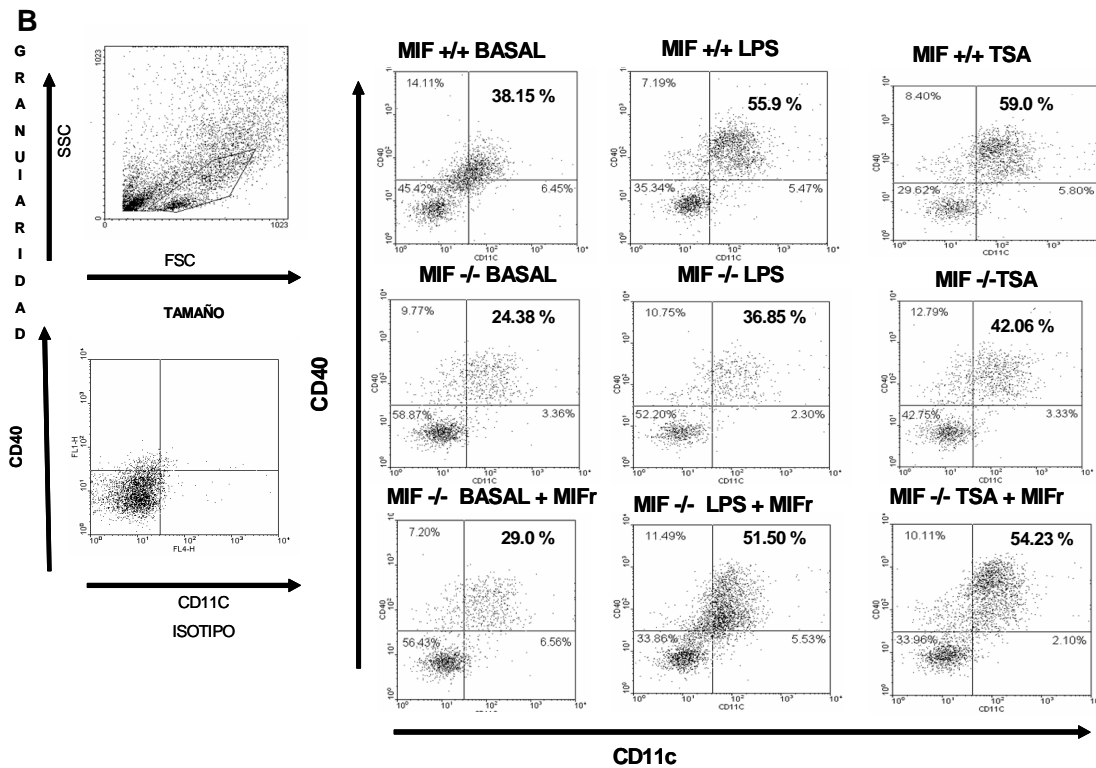
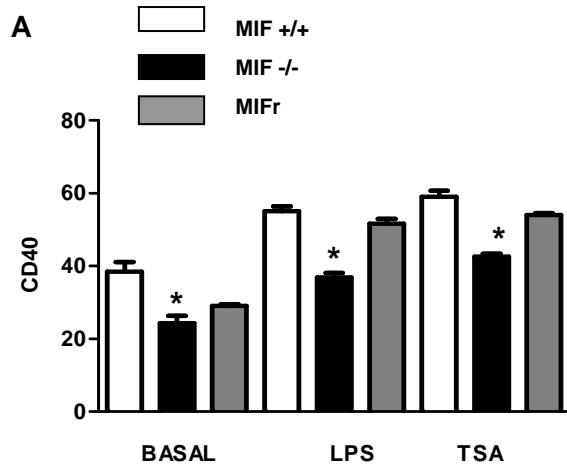


Figura 17. Expresión de CD40 en DCs. Análisis estadístico (A) y dot plots (B). Las DCS fueron estimuladas con LPS (0.5 μ g/ml) y (2.5 μ g/ml) de TSA y procesadas 24 h después de la estimulación, *p < 0.05 (n=4), "t" de Student vs. MIF+/+, ** p > 0.05 "t" de Student MIFr vs. MIF+/+.

MIF MODIFICA LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES TIPO LIKE (TLR-2, TLR-4, TLR-11) Y EN DCs INVOLUCRADOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE *T. gondii*.

Otra parte importante en nuestro trabajo de investigación fue medir receptores tipo Toll que son uno de los mecanismos por el cual el sistema inmune innato reconoce la presencia de organismos patógenos. Se conoce que la respuesta inducida por antígenos de *T. gondii* puede ser mediada a través del reconocimiento de los TLR-2, TLR-4 y TLR-11 en las DCs (62), (63). Esto nos llevó paralelamente a medir la expresión por citometría de flujo de los receptores Toll. En la figura 18 (B) y (C) se observa la expresión de TLR-4 en DCs. En los grupos de DCs de ratones MIF+/+ basal hubo una menor expresión de TLR-4 en comparación con los grupos LPS y TSA, en estos dos grupos se observó un incremento significativo en la expresión de este receptor y como se puede observar el mejor inductor para la activación de TLR-4 es el LPS. En los grupos de DCs de ratones MIF-/- también se encontró que con el estímulo con LPS hay una mayor expresión, en comparación con los estímulos basal y TSA, sin embargo la deficiencia de MIF afectó significativamente la expresión de TLR-4, al incorporar MIFr la recuperación de TLR-4 sólo se observó con LPS ya que en la condición basal y TSA la recuperación no fue significativa, en comparación con los estímulos del grupo de DCs de ratones MIF+/+.

Paralelamente medimos TLR-4 por RT-PCR utilizando como gen constitutivo RNA18s, en la Figura 18 (A) se observa el gel de agarosa y una tabla con los valores desintométricos para el gen TLR-4 y los datos obtenidos demostraron que los grupos de DCs de ratones MIF+/+ basales expresan constitutivamente el gen, sin embargo cuando las DCs de ratones MIF+/+ son expuestas a antígenos de LPS y TSA hay una mayor expresión del gen. En las DCs de ratones MIF-/- disminuye la expresión de TLR-4 en todos los casos, sin embargo al incorporar MIFr en los cultivos de las DCs de ratones MIF-/- se volvió a recuperar la expresión de TLR-4 en todos los casos. Por lo cual podemos concluir que la presencia de MIF tiene un efecto importante en la expresión de TLR-4 a nivel de receptor como a nivel del transcrito y que muy posiblemente los Ag de LPS y TSA tengan una ruta de señalización compartida en presencia de MIF. Sin embargo la activación de TLR-4 si es dependiente de la participación de MIF.

En la Fig 19 se observa la expresión de TLR-2%. En los grupos de DCs de ratones MIF+/+ basal, sin estímulo, la expresión fue menor en comparación con los estímulos con LPS y TSA observándose un incremento significativo. En los grupos de DCs de ratones MIF-/- (basal, LPS y TSA) la expresión de TLR-2 se disminuyó significativamente en comparación con los grupos MIF+/+. Así mismo el mejor activador de este receptor en ausencia de MIF es el TSA ya que en el estado basal y con LPS el efecto no fue significativo. Al incorporar MIFr a las DCs de ratones MIF-/- se recuperó la expresión para

LPS y TSA. Por lo anterior se concluye que la presencia de MIF es fundamental para modular la expresión de TLR-2 en respuesta con LPS y TSA; estos resultados nos permitió comprender que estos Ag son regulados por la misma vía de activación y con ello promover la producción de citocinas pro-inflamatorias.

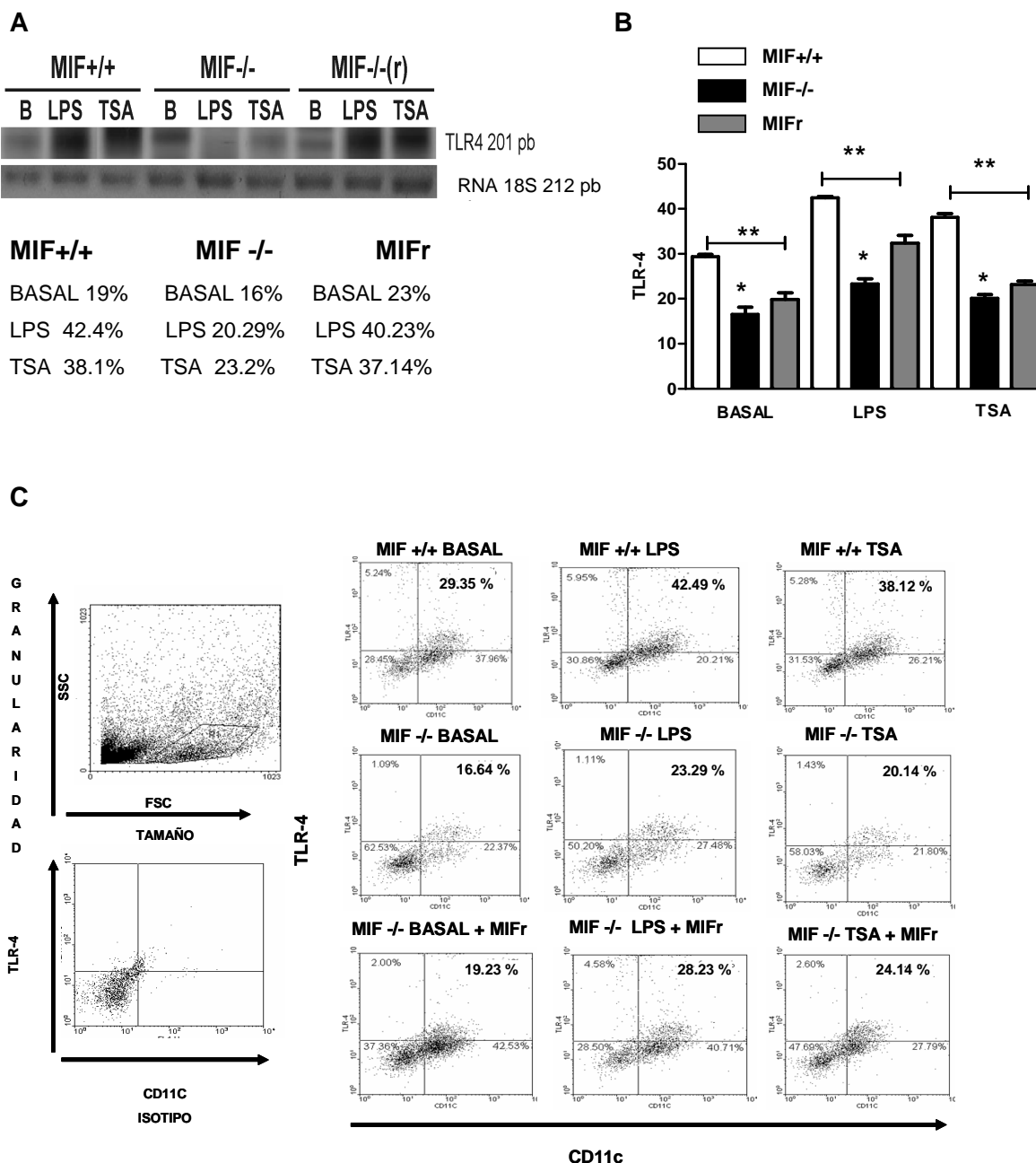


Figura 18. Expresión de TLR-4 en DCs. Análisis RT-PCR (A), estadístico (B) y dot plots (C). Las DCs fueron estimuladas con LPS 0.5 μ g/ml y 2.5 μ g/ml de TSA y procesadas 24 h después de la estimulación. Los datos son representativos de tres experimentos, * $p < 0.05$ (n=4), “t” de Student vs. MIF+/+, ** $p > 0.05$ “t” de Student MIFr vs. MIF+/+.

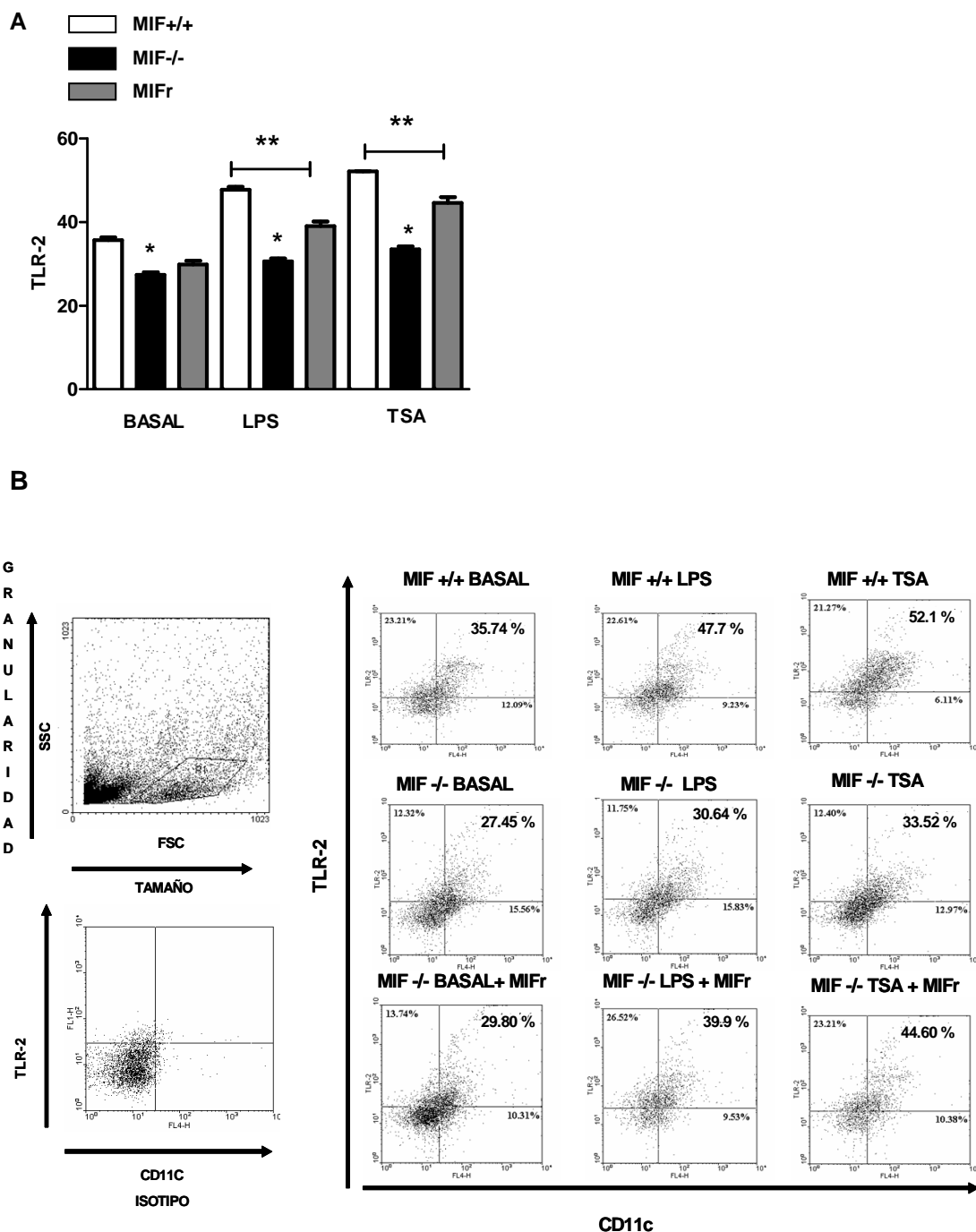


Figura 19. Expresión de TLR-2 en DCs. Análisis estadístico (A) y dot plots (B). Las DCs fueron estimuladas con LPS 0.5 μ g/ml y 2.5 μ g/ml de TSA y procesadas 24 h después de la estimulación, * $p < 0.05$ ($n=4$), “t” de Student vs. MIF+/+, ** $p > 0.05$ “t” de Student MIFr vs. MIF+/+.

En la figura 20 (B) y (C) los grupos de DCs de ratones MIF^{+/+} basal mostraron una menor expresión de TLR-11, al agregar los estímulos con LPS y TSA la expresión se incrementó significativamente, sin embargo el efecto encontrado en estos dos antígenos es muy similar. En los grupos de DCs de ratones MIF^{-/-} se observó un efecto interesante la expresión de TLR-11 disminuyó significativamente en todos los grupos estando su expresión por debajo de la condición MIF^{+/+} basal. Al incorporar MIFr a las DCs de ratones MIF^{-/-} se recuperó la expresión de TLR-11 para todos los casos, lo cual sugiere que TLR-11 es dependiente de MIF para una buena activación del receptor TLR-11 en respuesta a TSA. Esto concuerda con los resultados obtenidos por RT-PCR (A) en donde los grupos de DCs de ratones MIF^{+/+} se observó una mayor expresión en respuesta a los antígenos con LPS y TSA. En las DCs de ratones MIF^{-/-} se observó una disminución significativa en la expresión de TLR-11. Al incorporar MIFr a las DCs de ratones MIF^{-/-} se observó una recuperación del receptor TLR-11 en los grupos estimulados con LPS y TSA. Por lo cual podemos concluir que la presencia de MIF tiene un efecto importante en la expresión de TLR-11 a nivel de receptor como a nivel del transcrito.

Por otro lado otro receptor que fue medido fue CCR5, debido a que esta quimiocina se expresa en DCs durante procesos inflamatorios y es activada por una proteína llamada la ciclofilina que promueve la síntesis de IL-12 después de la estimulación con *T. gondii*. En la figura 21 en los grupos de DCs de ratones MIF^{+/+} en condición basal y en presencia de antígenos con LPS no se observaron cambios significativos en la expresión de CCR5, sin embargo con los antígenos de TSA la expresión de CCR5 se duplica en comparación con el estado basal y LPS. En los grupos de DCs de ratones MIF^{-/-} se observó una disminución significativa en la expresión de CCR5 en comparación con los grupos de DCs de ratones MIF^{+/+}, al incorporar MIFr sólo hay una recuperación con los estímulos con TSA. Por lo anterior se concluye que la presencia de MIF es fundamental para sobrerregular la expresión de CCR5 y de esta manera promover la síntesis de IL-12 en respuesta a TSA.

Por otra parte se sabe que las DCs son productoras de IL-12 y que esta induce la producción de IFN- γ . Con el objetivo de determinar si las DCs presentan el receptor para IFN- γ R, se midió este marcador por citometría de flujo, así mismo con la finalidad de poder determinar la participación de MIF en la expresión IFN- γ R. En la figura 22 los grupos de DCs de ratones MIF^{+/+} se pudo observar una expresión constante de este receptor en todos los grupos (basal, LPS y TSA). Sin embargo en ausencia de MIF se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de IFN- γ R en todos los grupos, al incorporar MIFr a las DCs de ratones MIF^{-/-} hubo una recuperación

total para este receptor, se puede concluir que el IFN- γ R se puede expresar de manera constitutiva y que los antígenos no ejercen función alguna sobre la expresión de este marcador y que MIF es uno de los factores indispensable para su expresión.

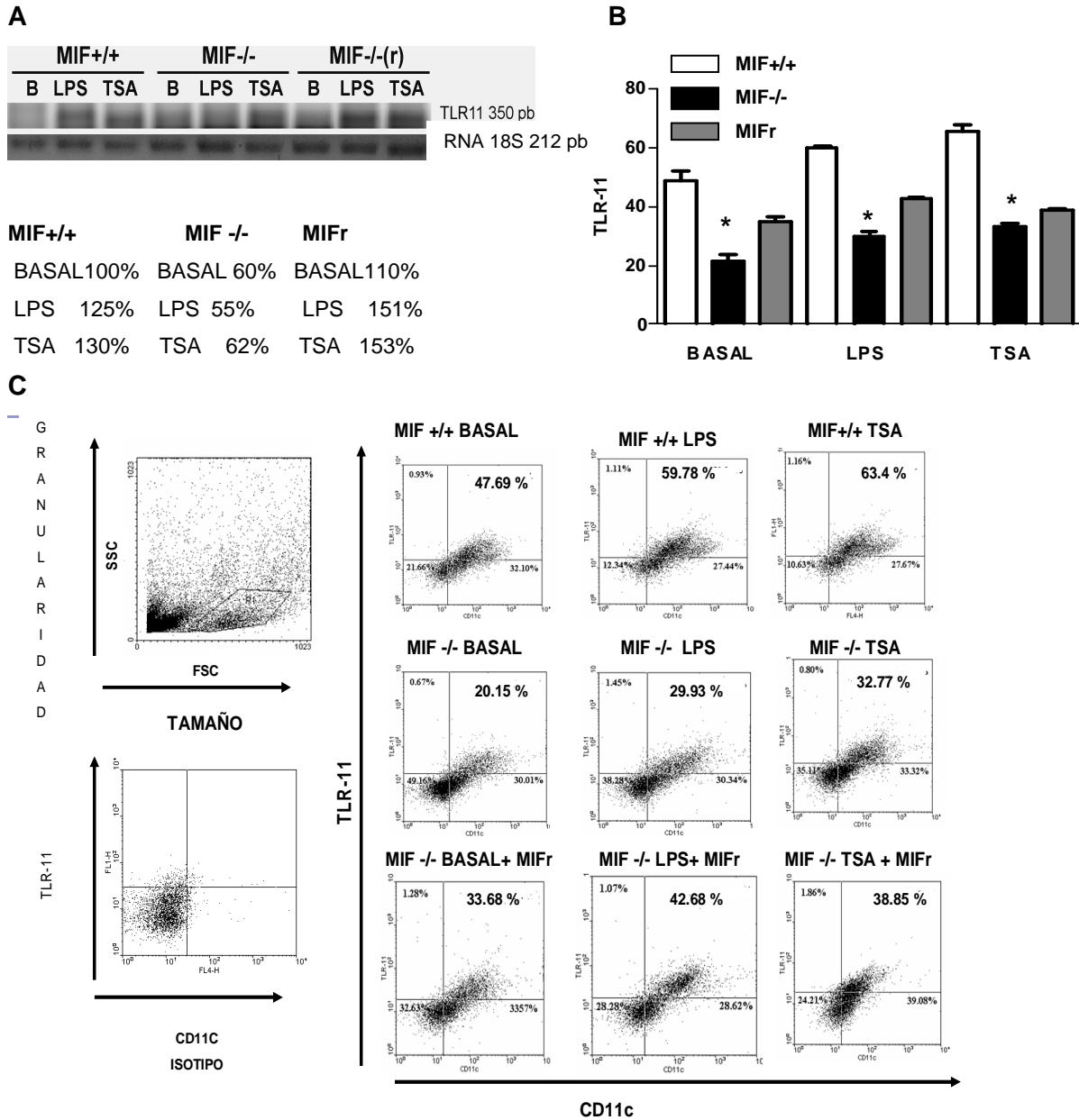


Figura 20. Expresión de TLR-11 en DCs. Análisis RT-PCR (A) estadístico (B) y dot plots (C). Las DCs fueron estimuladas con LPS 0.5 μ g/ml y 2.5 μ g/ml de TSA y procesadas 24 h después de la estimulación, * $p < 0.05$ (n=4) "t" de Student vs. MIF+/+, ** $p > 0.05$ "t" de Student MIFr vs. MIF+/+.

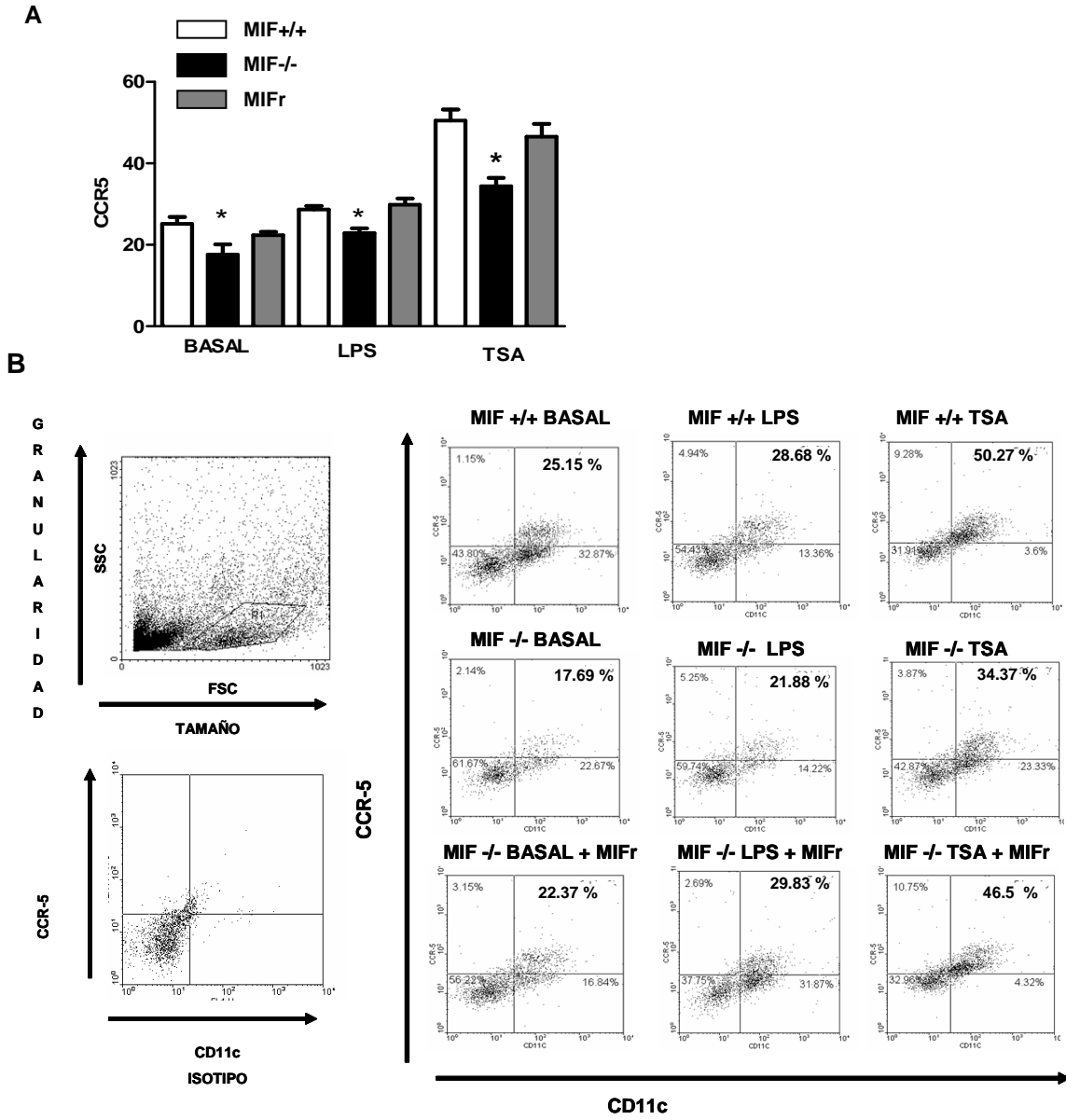


Figura 21. Expresión de CCR5 en DCs. Análisis estadístico (A) y dot plots (B). Las DCs fueron estimuladas con LPS 0.5 µg/ml y 2.5 µg/ml de TSA y procesadas 24 h después de la estimulación, *p < 0.05 (n=4), “t” de Student vs. MIF+/+, ** p > 0.05 “t” de Student MIFr vs. MIF+/+.

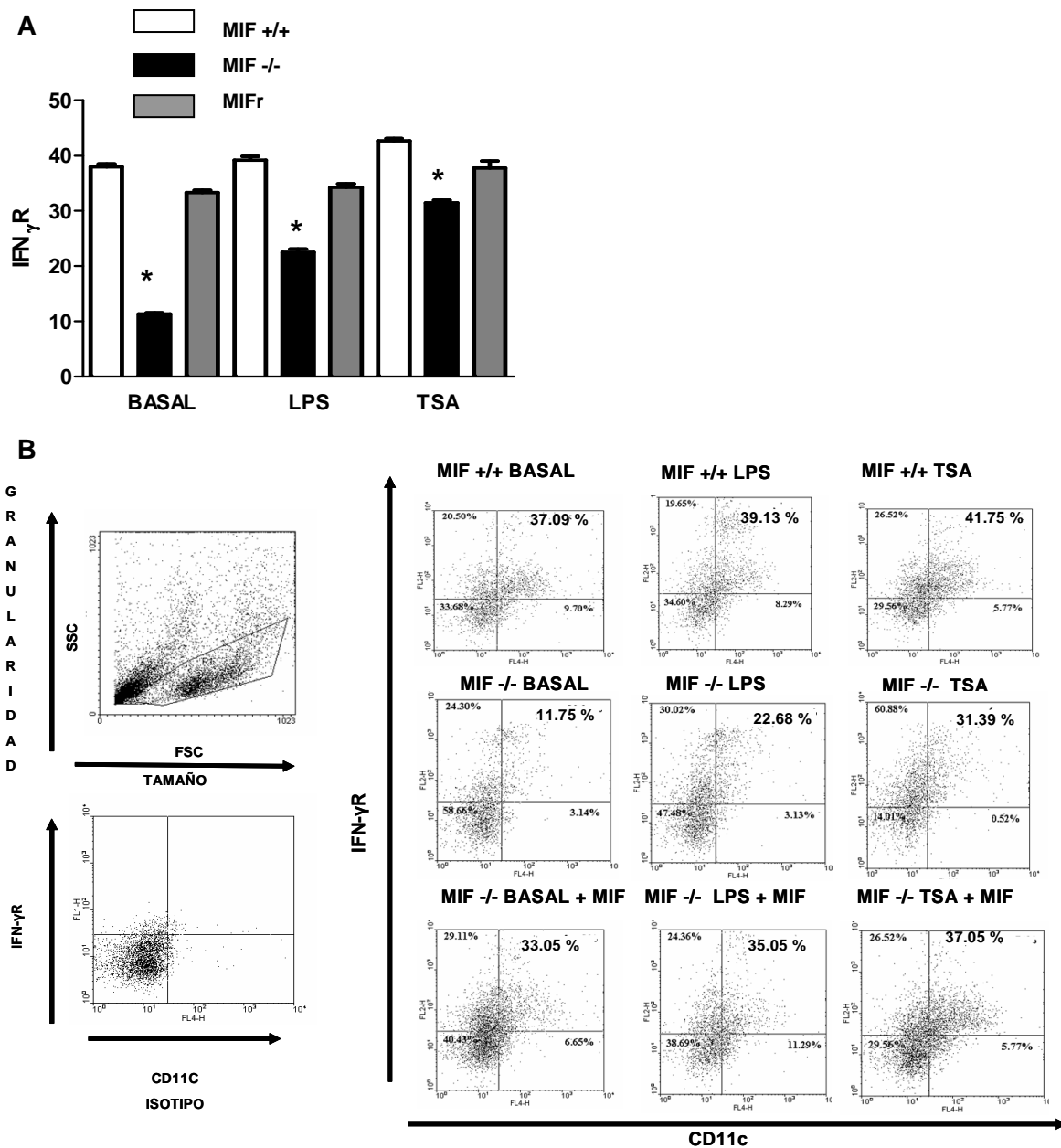


Figura 22. Expresión de CCR5 en DCs. Análisis estadístico (A) y dot plots (B). Las DCs fueron estimuladas con 0.5 μ g/ml de LPS y 2.5 μ g/ml de TSA y procesadas 24 h después de la estimulación, * $p < 0.05$ ($n=4$) “t” de Student vs. MIF+/+, ** $p > 0.05$ “t” de Student MIFr vs. MIF+/+.

DISCUSIÓN

En la infección por *Toxoplasma gondii* las DCs son la primera línea de defensa, pues son una fuente importante de IL-12 y participan en el aumento de fenómenos inflamatorios asociados en la restricción del crecimiento parasitario. Las DCs son un eslabón que unen la inmunidad innata y adaptativa por medio de la activación de linfocitos T, que son claves en el reconocimiento de antígenos y marcan el inicio de la respuesta inmune adaptativa sostenida (64). Además las DCs son blanco para MIF y productoras del mismo. Aún con estos antecedentes no se sabe bien si MIF tiene alguna influencia sobre las DCs en respuesta a antígenos parasitarios. Con el objetivo de contribuir al establecimiento de los mecanismos “finos” en la regulación de MIF en la respuesta inmune contra esta infección, el presente trabajo estuvo enfocado a conocer la participación de MIF en la regulación de las DCs en respuesta a antígeno soluble de TSA.

En este trabajo se demostró que MIF es una molécula que participa en la activación y maduración adecuada de las DCs en respuesta a antígeno total de *T. gondii* (TSA). MIF actúa regulando, a nivel de la traducción y la transcripción, las citocinas proinflamatorias IL-12, TNF- α e IL-6. Sin embargo, MIF parece no ser el único factor que contribuye a la producción de estas citocinas en las DCs expuestas a TSA, ya que en ausencia de MIF las DCs siguen produciendo, en cantidades mínimas, estas citocinas proinflamatorias lo cual sugiere que pueden estar participando otra u otras moléculas (el mismo TSA) de manera independientes de MIF en la inducción del factor de transcripción NF- κ B y moléculas de la familia de las MAPK, que juegan un papel crítico en el inicio de la activación y regulación de los mediadores pro-inflamatorios controladores de la respuesta innata y adaptativa (65).

En este contexto, posiblemente la sobre expresión de IL-12, TNF- α e IL-6 observadas en las DCs expuestas a TSA sea el resultado sinérgico de MIF y TSA en la activación de las vías de señalización dependientes de NF- κ B y las MAPK. Recientemente se ha demostrado que MIF participa en la activación de las MAPK en especial con P38 y ERK la cual es regulada por la fosfatasa MAPK-1 (MKP-1) que es inducida por mitógenos, stress y estímulos pro-inflamatorios (66, 67). Está plenamente demostrado que MKP-1 puede ser inducida por glucocorticoides y que es el mediador responsable de la inhibición de los glucocorticoides de las actividades de las ERK, JNK y p38 MAPK, y de la producción de citocinas inducida por estímulos pro-inflamatorios como son el LPS o IL-1 (66) y muy

posiblemente MIF interactué con estas rutas de señalización para promover la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a TSA.

Una vez determinado que MIF participa en la producción de citocinas pro-inflamatorias, se determinó el efecto de MIF en la modulación de algunos marcadores de membrana en DCs involucrados en la inmunidad innata (MHC-II, CD40, CD80, CD86, TLR-4, TLR-2, TLR-11 y CCR5 y IFN γ R) en respuesta a TSA. Se midieron estas moléculas co-estimuladoras ya que es bien conocido que cuando las DCs entra en contacto con algún antígeno o un patógeno se da un proceso de maduración que esta asociada con el incremento de la expresión de moléculas MHC-II, CD40, CD80, CD86 al analizar estas moléculas nuestros resultados demuestran que MIF participa en la sobre-regulación de estas moléculas coestimuladoras, participando en la maduración de las DCs y posiblemente en la presentación de antígenos por el incremento de MHC-II. En estudios previos se ha visto que CD80 y CD86 juegan un papel crucial en el mantenimiento de la respuesta inmune ya que cuando se da la interacción entre CD28 expresado en células T y la unión a su receptor CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) en DCs, proporcionan a la mayoría de las células presentadoras de antígeno, señales importantes co-estimuladoras (61). Al analizar CD80, CD86, CD40 encontramos que MIF participa regulando la expresión de estos marcadores, indicando que MIF juega un papel importante en la regulación de estas moléculas co-estimuladoras necesarias para la proliferación y activación de las células T y así mismo desencadenar la producción de IL-12 (68) esto se correlaciona directamente que a mayor expresión de estas moléculas coestimuladoras se da una mayor producción de IL-12, esto se ve apoyado con nuestros resultados previos ya que a menor expresión de estos marcadores de membrana en DCs MIF $^{-/-}$ la producción de IL-12 se vio parcialmente inhibida (68). Por otra parte se ha establecido que *T. gondii* posee dos mecanismos para activar la producción de IL-12 uno es dependiente a la proteína adaptadora mieloides (Myd88) y la probable participación de los receptores Toll y el segundo mecanismo involucra la activación del receptor CCR5 a través de una molécula secretada por el parásito llamada ciclofilina (11, 69). Los TLRs que están involucrados en la inducción de la IL-12 no es de todo conocida, un reciente reporte implica que la molécula glicosilfosfato inositol (GPI) es un ligando potencial para TLR-2 (70). TLR-2 puede activar una amplia variedad de componentes bacterianos, estos incluyen lipoproteínas, ácido lipoteico y peptidoglicanos de bacterias gram-negativas (69). En

nuestro experimento se decidió medir TLR-2, porque se sabe que los taquizoitos de *T.gondii* son abundantes en una proteína llamada glicosilfosfatilinositol (GPI) y por lo tanto esta molécula puede servir de ligando para el reconocimiento innato (71, 72). Al analizar la expresión de este receptor encontramos que MIF participa en la activación de TLR-2 en respuesta a TSA. Por otra parte algunos grupos han investigado el papel para TLR-2 en el reconocimiento del parásito y establecieron que ratones deficientes en el gen TLR-2 presenta una producción normal de IL-12, por lo que este receptor no esta involucrado en la producción de esta citocina. De igual forma con el objetivo de determinar el papel de TLR-2 se ha establecido que con grandes cantidades de inóculos de quistes, los ratones deficientes en TLR-2 se presentan una ineficiente activación de funciones microbicidas, ya que hay un decremento en la producción de óxido nítrico, concluyendo que *T. gondii* regula el receptor TLR-2 e induce la producción de NO en macrófagos (73, 74). Estos datos nos permite analizar que MIF puede ser un buen candidato que esta regulando la vía TLR-2 ya que la producción de NO en los ratones MIF^{-/-} se vio inhibida parcialmente. Quizás la interacción de los TLRs con GPI de *T. gondii* puede contribuir a delimitar la resistencia en el hospedadero. Por otro lado MIF regula la expresión del receptor Toll- 4 (TLR-4), es un mecanismo por el cual MIF podría promover el desarrollo de la respuesta inmune innata. Es interesante que TLR-4 medie la respuesta a *T. gondii*, ya que se observó una producción de citocinas asociadas con la respuesta inmune innata en ratones MIF^{+/+}. Así mismo la baja expresión del receptor TLR4 en MIF^{-/-} puede estar involucrado en una baja respuesta inflamatoria. En los últimos años se ha descubierto una proteína llamada profilina (PFTG) en *T. gondii* la cual participa en la activación de TLR-11. Esto sea observado en experimentos con DCs deficientes en TLR-11 en donde han sido expuestas a la proteína PFTG, en donde se vio un incremento en la susceptibilidad a la infección con *T. gondii* asociado con el decremento en la producción de la IL-12 (62). En nuestros resultados encontramos que MIF es una molécula involucrada en modulación de este receptor ya que en ausencia MIF se presenta una baja expresión de TLR-11 y así mismo se ve reflejado directamente en la baja producción de IL-12. Nuestros datos se fundamentan fuertemente con lo obtenido con este grupo de investigación, ya que la ausencia o la baja expresión de TLR-11 afecta directamente la producción de esta citocina siendo más susceptibles a la infección por *T. gondii*. Se ha investigado que *T. gondii* puede activar la producción de la IL-12 a través de la activación del receptor CCR5

a partir de una proteína llamada ciclofilina la cual es descargada por los taquizoitos (75, 76). Esto se ha observado en DCs de ratones CCR5^{-/-} donde hay una baja expresión en la producción de IL-12 incrementando la susceptibilidad a *T. gondii*. Esto se correlaciona de modo que existe una co-dependencia CCR5/IL-12 para una eficaz polarización hacia TH1. Sin embargo los mecanismos propuestos a nivel de la ruta bioquímica del receptor CCR-5 para la activación de IL-12 aún no está claro presumiblemente involucra la señalización dependiente a proteínas G. En nuestra investigación al medir CCR5 encontramos una baja expresión de este receptor en los grupos MIF^{-/-}, lo cual nos permite ver que MIF regula positivamente la expresión de esta quimiocina. Interesantemente una posible baja en la producción de IL-12 fue debida a la baja expresión de este receptor. Por otra parte se midió un último marcador IFN- γ R con el objetivo de determinar si las DCs presentaban este marcador, encontrando que la DCs maduras presentan este marcador a demás que sirven de receptoras para IFN- γ , Sin embargo en los grupos MIF^{-/-} la expresión de este receptor es parcialmente inhibido. Con todo lo anterior se corrobora que MIF participa activamente en la respuesta innata, regulando positivamente la expresión de moléculas de membrana, la producción y la expresión de citocinas pro-inflamatorias, involucradas directamente a la resistencia *T. gondii*. Todo lo anterior nos permitió un conocimiento más detallado sobre los mecanismos con los que MIF opera para controlar la infección con *T. gondii*, así mismo esto da pie en un futuro para empezar a estudiar la participación de MIF en las vías de señalización de *T. gondii*.

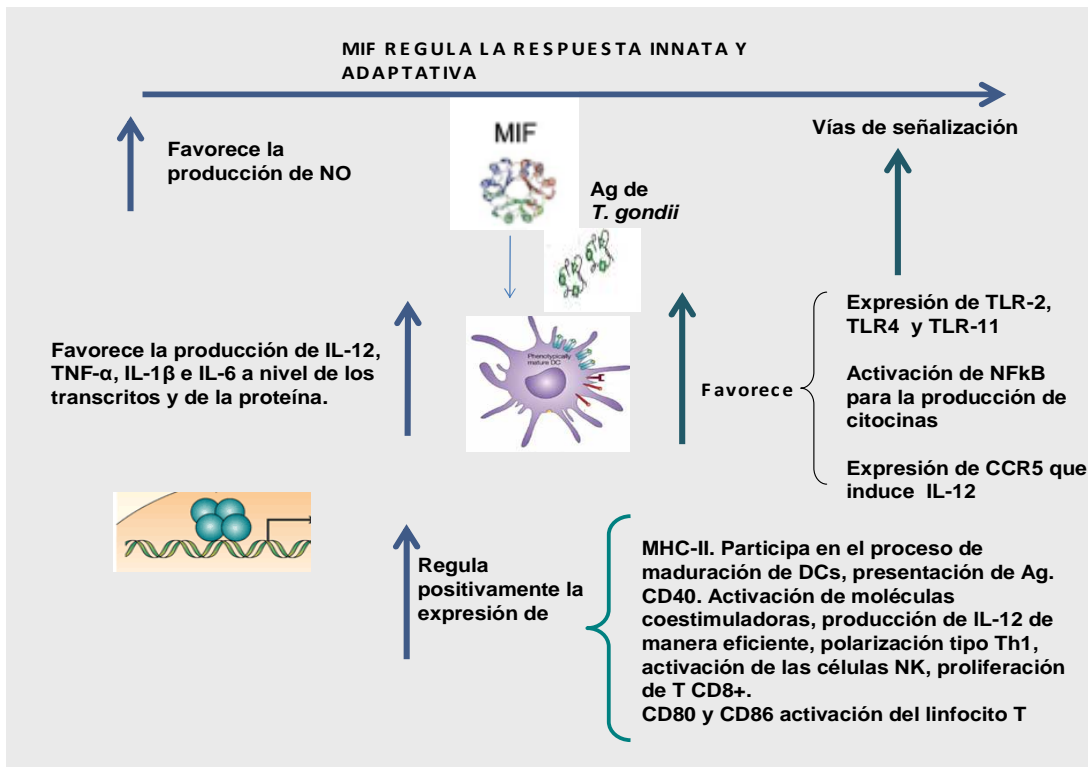


Figura 23. Participación de MIF en las DCs expuestas al antígeno de *T. gondii*. MIF participa en la producción de citocinas pro-inflamatorias, los transcritos de citocinas involucradas a la resistencia a *T. gondii* y la expresión de diferentes marcadores de membrana importantes en la respuesta innata y adaptativa.

CONCLUSIONES

- 1) MIF incrementa la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y NO en DCs estimuladas con LPS Y TSA
- 2) MIF participa en la expresión de los transcritos de IL-12 p40, IL-12 p35 e IL-12 p19 en DCs.
- 3) MIF modula la expresión de las moléculas de membrana MHC-II, CD40, CD86, TLR-4, TLR-2, TLR-11, CCR5, IFN γ R en DCs.
- 4) MIF juega un papel crucial en la infección por *T. gondii* como un regulador positivo de la activación y maduración de DCs.

APÉNDICE

Preparaciones de soluciones y reactivos

Medio de Cultivo de células dendríticas

DMEM (Gibco)

10% de SFB

1% de antibióticos

Solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) 1x:

10 L, pH 7.4

80 g NaCl

(J.T. Baker)

11.6 g Na₂HPO₄

(J.T. Baker)

2.0 g KCl

(ICN Biomedicals Inc)

Solución amortiguadora Pk lisis

200 µl mM de NaCl

(J.T. Baker)

5 mM de ácido etinediaminatetraacético (EDTA)

(J.T. Baker)

0.2 % dodecil sulfato de sodio (SDS)

(J.T. Baker)

100 mM tris HCl, pH 8.5 se afora con H₂O destilada hasta 1 litro

(ICN Biomedicals inc)

Solución amortiguadora de separación

PBS 1x complementado con 2 mM EDTA y 0.5µg de BSA

Solución amortiguadora TBE 10x

Tris base (890 mM)

(ICN Biomedicals inc)

Ácido bórico H₃BO₃

(J.T. Baker)

40 ml de EDTA disodico (0.5 M)

(J.T Baker)

Se ajusta a pH 8.0 y se afora con H₂O destilada hasta 500 µl

BlueJuice (10x)

65% (w/v) Sucrose

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 mM EDTA

0.3% (w/v) azul de bromofenol

Solución de lavado (ELISA)

PBS más 0.5% de Tween 20

(Promega Co.)

Solución de bloqueo (ELISA)

PBS más 1% de BSA

(ICN Biomedicals Inc)

PBS/Tween

1L de PBS más 0.5 ml Tween 20

(Promega Co.)

1L PBS 1x

Sustrato ABTS para revelar

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN Biomedicals Inc) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (Tecsiquim) en H₂O destilada y con NaOH (Sigma) llevar a pH 4.53 y hacer alícuotas de 11 ml en tubos y congelar a -70°C.

Solución H₂O₂ al 3%

Agregar 10 ml de H₂O₂ 30% a 90 ml de H₂O. Proteger de la exposición de la luz.

Solución amortiguadora para citometría

1L de PBS 0.1% de azida de sodio NaN₃ (Sigma), 1% SFB (Gibco)

REFERENCIAS

1. Israelski, D. M., and Remington, J. S. (1993) Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. *Curr Clin Top Infect Dis* **13**, 322-356
2. Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Wilson, M., McQuillan, G., Navin, T., and McAuley, J. B. (2001) Toxoplasma gondii infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am J Epidemiol* **154**, 357-365
3. Dvorak, J. A., and Crane, M. S. (1981) Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. *Science* **214**, 1034-1036
4. Dubey, J. P. (1998) Toxoplasma gondii oocyst survival under defined temperatures. *The Journal of parasitology* **84**, 862-865
5. Dubey, J. P., Velmurugan, G. V., Ulrich, V., Gill, J., Carstensen, M., Sundar, N., Kwok, O. C., Thulliez, P., Majumdar, D., and Su, C. (2008) Transplacental toxoplasmosis in naturally-infected white-tailed deer: Isolation and genetic characterisation of Toxoplasma gondii from foetuses of different gestational ages. *International journal for parasitology* **38**, 1057-1063
6. Hill, D., and Dubey, J. P. (2002) Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* **8**, 634-640
7. Black, M. W., and Boothroyd, J. C. (2000) Lytic cycle of Toxoplasma gondii. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 607-623
8. Aliberti, J. (2005) Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by Toxoplasma gondii. *Nature reviews* **5**, 162-170
9. Alexander, J., Scharton-Kersten, T. M., Yap, G., Roberts, C. W., Liew, F. Y., and Sher, A. (1997) Mechanisms of innate resistance to Toxoplasma gondii infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **352**, 1355-1359
10. Mordue, D. G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C. A., and Sibley, L. D. (2001) Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol* **167**, 4574-4584
11. Scanga, C. A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E. Y., Medzhitov, R., and Sher, A. (2002) Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* **168**, 5997-6001
12. Sterns, T., Pollak, N., Echtenacher, B., and Mannel, D. N. (2005) Divergence of protection induced by bacterial products and sepsis-induced immune suppression. *Infection and immunity* **73**, 4905-4912
13. Yap, G. S., and Sher, A. (1999) Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii. *J Exp Med* **189**, 1083-1092
14. Gazzinelli, R. T., Amichay, D., Sharton-Kersten, T., Grunwald, E., Farber, J. M., and Sher, A. (1996) Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to Toxoplasma gondii. *Curr Top Microbiol Immunol* **219**, 127-139
15. Hayashi, S., Chan, C. C., Gazzinelli, R., and Roberge, F. G. (1996) Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J Immunol* **156**, 1476-1481
16. Araujo, M. I., Bliss, S. K., Suzuki, Y., Alcaraz, A., Denkers, E. Y., and Pearce, E. J. (2001) Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfecting with Schistosoma mansoni and Toxoplasma gondii. *Infection and immunity* **69**, 1454-1462

17. Gazzinelli, R. T., Hieny, S., Wynn, T. A., Wolf, S., and Sher, A. (1993) Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6115-6119
18. Roberts, C. W., Ferguson, D. J., Jebbari, H., Satoskar, A., Bluethmann, H., and Alexander, J. (1996) Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and immunity* **64**, 897-904
19. Bourguin, I., Moser, M., Buzoni-Gatel, D., Tielemans, F., Bout, D., Urbain, J., and Leo, O. (1998) Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. *Infection and immunity* **66**, 4867-4874
20. Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., and Gilliet, M. (2001) Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* **2**, 585-589
21. Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews* **2**, 151-161
22. Keller, R. (2001) Dendritic cells: their significance in health and disease. *Immunol Lett* **78**, 113-122
23. Grouard, G., Durand, I., Filgueira, L., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1996) Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* **384**, 364-367
24. Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000) CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* **164**, 2978-2986
25. Steinman, R. M., and Swanson, J. (1995) The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* **182**, 283-288
26. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811
27. Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **9**, 10-16
28. Rescigno, M., Winzler, C., Delia, D., Mutini, C., Lutz, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997) Dendritic cell maturation is required for initiation of the immune response. *J Leukoc Biol* **61**, 415-421
29. Mosialos, G., Birkenbach, M., Ayehunie, S., Matsumura, F., Pinkus, G. S., Kieff, E., and Langhoff, E. (1996) Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein. *Am J Pathol* **148**, 593-600
30. David, J. R. (1966) Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 72-77
31. Miriam Rodríguez-Sosa, I. R.-M. a. L. I. T. (2007) Advances in the immunobiology of parasitic diseases. *Chaper 16 A brief view to macrophage migratio inhibitory factor and its role in parasitic diseases*, 273-289
32. Paralkar, V., and Wistow, G. (1994) Cloning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Genomics* **19**, 48-51
33. Cooke, G., Armstrong, M. E., and Donnelly, S. C. (2009) Macrophage migration inhibitory factor (MIF), enzymatic activity and the inflammatory response. *BioFactors (Oxford, England)*

34. Bucala, R. (1994) MIF, a previously unrecognized pituitary hormone and macrophage cytokine, is a pivotal mediator in endotoxic shock. *Circ Shock* **44**, 35-39
35. Matsui, Y., Okamoto, H., Jia, N., Akino, M., Uede, T., Kitabatake, A., and Nishihira, J. (2004) Blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 557-566
36. Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J. A., Calandra, T., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R. C., and Bucala, R. (1997) Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* **150**, 235-246
37. Nishibori, M., Nakaya, N., Tahara, A., Kawabata, M., Mori, S., and Saeki, K. (1996) Presence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in ependyma, astrocytes and neurons in the bovine brain. *Neurosci Lett* **213**, 193-196
38. Yabunaka, N., Nishihira, J., Mizue, Y., Tsuji, M., Kumagai, M., Ohtsuka, Y., Imamura, M., and Asaka, M. (2000) Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **23**, 256-258
39. Calandra, T., and Roger, T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews* **3**, 791-800
40. Gore, Y., Starlets, D., Maharshak, N., Becker-Herman, S., Kaneyuki, U., Leng, L., Bucala, R., and Shachar, I. (2008) Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *The Journal of biological chemistry* **283**, 2784-2792
41. Calandra, T., and Bucala, R. (1995) Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *Journal of inflammation* **47**, 39-51
42. Onodera, S., Suzuki, K., Matsuno, T., Kaneda, K., Takagi, M., and Nishihira, J. (1997) Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology* **92**, 131-137
43. Juttner, S., Bernhagen, J., Metz, C. N., Rollinghoff, M., Bucala, R., and Gessner, A. (1998) Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J Immunol* **161**, 2383-2390
44. Bernhagen, J., Bacher, M., Calandra, T., Metz, C. N., Doty, S. B., Donnelly, T., and Bucala, R. (1996) An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J Exp Med* **183**, 277-282
45. Rodriguez-Sosa, M., Rosas, L. E., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., and Terrazas, L. I. (2003) Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* **71**, 1247-1254
46. Weiser, W. Y., Pozzi, L. M., and David, J. R. (1991) Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill *Leishmania donovani*. *J Immunol* **147**, 2006-2011
47. Martiney, J. A., Sherry, B., Metz, C. N., Espinoza, M., Ferrer, A. S., Calandra, T., Broxmeyer, H. E., and Bucala, R. (2000) Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infection and immunity* **68**, 2259-2267

48. Chaiyaroj, S. C., Rutta, A. S., Muenthaisong, K., Watkins, P., Na Ubol, M., and Looareesuwan, S. (2004) Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. *Acta Trop* **89**, 319-327
49. Awandare, G. A., Ouma, C., Keller, C. C., Were, T., Otieno, R., Ouma, Y., Davenport, G. C., Hittner, J. B., Ong'echa, J. M., Ferrell, R., and Perkins, D. J. (2006) A macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphism is associated with high-density parasitemia in children with malaria. *Genes Immun* **7**, 568-575
50. Boros, D. L., Warren, K. S., and Pelley, R. P. (1973) The secretion of migration inhibitory factor by intact schistosome egg granulomas maintained in vitro. *Nature* **246**, 224-226
51. Stavitsky, A. B., Metz, C., Liu, S., Xianli, J., and Bucala, R. (2003) Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *Schistosoma japonicum*-infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity. *Parasite Immunol* **25**, 369-374
52. Monteforte, G. M., Takeda, K., Rodriguez-Sosa, M., Akira, S., David, J. R., and Satoskar, A. R. (2000) Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. *J Immunol* **164**, 5890-5893
53. Heidi M. Snider, C. L.-D., Miriam Rodríguez-Sosa, Luis Terrazas and Abhay R. Satoskar, and Crane, M. S. (2007) MIF most interesting factor. *Science (New York, N.Y)* Chapter 8 MIF in parasitic and Helminthic infections, 133-151
54. Flores, M., Saavedra, R., Bautista, R., Viedma, R., Tenorio, E. P., Leng, L., Sanchez, Y., Juarez, I., Satoskar, A. A., Shenoy, A. S., Terrazas, L. I., Bucala, R., Barbi, J., Satoskar, A. R., and Rodriguez-Sosa, M. (2008) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *Faseb J* **22**, 3661-3671
55. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408
56. Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., and Sambhara, S. (2002) Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* **169**, 4697-4701
57. Reyes, J. L., Terrazas, L. I., Espinoza, B., Cruz-Robles, D., Soto, V., Rivera-Montoya, I., Gomez-Garcia, L., Snider, H., Satoskar, A. R., and Rodriguez-Sosa, M. (2006) Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity* **74**, 3170-3179
58. Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M., Pirhonen, J., Strand, D., Bechthold, O., Frick, J., Galle, P. R., Autenrieth, I., and Neurath, M. F. (2003) Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* **112**, 693-706
59. James, S. L. (1995) Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev* **59**, 533-547
60. Sher, A., Oswald, I. P., Hieny, S., and Gazzinelli, R. T. (1993) *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **150**, 3982-3989

61. Subauste, C. S., de Waal Malefyt, R., and Fuh, F. (1998) Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen. *J Immunol* **160**, 1831-1840
62. Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., and Sher, A. (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science (New York, N.Y)* **308**, 1626-1629
63. Denkers, E. Y. (2003) From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **39**, 193-203
64. Steinman, R. M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-296
65. Bonizzi, G., and Karin, M. (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* **25**, 280-288
66. Aeberli, D., Yang, Y., Mansell, A., Santos, L., Leech, M., and Morand, E. F. (2006) Endogenous macrophage migration inhibitory factor modulates glucocorticoid sensitivity in macrophages via effects on MAP kinase phosphatase-1 and p38 MAP kinase. *FEBS letters* **580**, 974-981
67. Mitchell, R. A., Metz, C. N., Peng, T., and Bucala, R. (1999) Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *The Journal of biological chemistry* **274**, 18100-18106
68. Subauste, C. S., and Wessendarp, M. (2000) Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and -independent T cell production of IFN-gamma. *J Immunol* **165**, 1498-1505
69. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-376
70. Tomavo, S., Schwarz, R. T., and Dubremetz, J. F. (1989) Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol Cell Biol* **9**, 4576-4580
71. Campos, M. A., Rosinha, G. M., Almeida, I. C., Salgueiro, X. S., Jarvis, B. W., Splitter, G. A., Qureshi, N., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R. T., and Oliveira, S. C. (2004) Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infection and immunity* **72**, 176-186
72. Campos, M. A., Closel, M., Valente, E. P., Cardoso, J. E., Akira, S., Alvarez-Leite, J. I., Ropert, C., and Gazzinelli, R. T. (2004) Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* **172**, 1711-1718
73. Scanga, C. A., Bafica, A., Feng, C. G., Cheever, A. W., Hieny, S., and Sher, A. (2004) MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infection and immunity* **72**, 2400-2404

74. Mun, H. S., Aosai, F., Norose, K., Chen, M., Piao, L. X., Takeuchi, O., Akira, S., Ishikura, H., and Yano, A. (2003) TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int Immunol* **15**, 1081-1087
75. Aosai, F., Chen, M., Kang, H. K., Mun, H. S., Norose, K., Piao, L. X., Kobayashi, M., Takeuchi, O., Akira, S., and Yano, A. (2002) *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein HSP70 functions as a B cell mitogen. *Cell Stress Chaperones* **7**, 357-364
76. Del Rio, L., Butcher, B. A., Bennouna, S., Hieny, S., Sher, A., and Denkers, E. Y. (2004) *Toxoplasma gondii* triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors. *J Immunol* **172**, 6954-6960