



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

MODULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN
MACRÓFAGOS DURANTE LA INFECCIÓN POR
Taenia crassiceps

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

SANDY REYES MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis padres
Leticia y José Luis

A mis hermanos
Maricela y Erick

*“Mi familia es la música en mi vida,
algunas notas altas y otras bajas, pero
siempre es una hermosa canción”*

Agradecimientos

En este apartado quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que en mayor o menor medida han colaborado en la realización del presente trabajo, principalmente al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, director de esta investigación, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi tesis de licenciatura en su laboratorio, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma y la confianza en mí depositada.

A mis sinodales:

La Dra. Miriam Rodríguez Sosa y el Dr. Federico Ávila Moreno, por todo el apoyo que me dieron.

A la Dra. Elvia Gallegos Neyra, con la que me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza que tiene en mí.

A la M. en C. Yadira Ledesma Soto, a quien agradezco las enseñanzas, el tiempo y consejos brindados.

Hago extensiva mi gratitud a mis amigos y compañeros del laboratorio, los que continúan y los que ya se han ido, por su amistad y apoyo; en especial a Mireya, quien me enseñó y me introdujo en todo lo que ahora sé y por la paciencia que siempre me tuvo.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigas (Marlen, Dany, Pao, Abi, Gaby, Yael y Carmen).

A todos, muchas gracias.

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Inmunoparasitología en la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CB-2010/152224



*“Un científico en su
laboratorio no es sólo un
técnico: es también un niño
colocado ante fenómenos
naturales que le impresionan
como un cuento de hadas”*

Marie Curie

*” La ciencia será siempre una
búsqueda, jamás un
descubrimiento real. Es un
viaje, nunca una llegada”*

Karl Popper

I. CONTENIDO

	Página
I. CONTENIDO	1
II. ABREVIATURAS EMPLEADAS	2
III. RESUMEN	4
IV. INTRODUCCIÓN	5
1. Respuesta inmune	6
2. Respuesta inmune frente a parásitos helmintos	7
3. Ciclo biológico de <i>Taenia crassiceps</i>	10
4. Respuesta inmune a <i>Taenia crassiceps</i>	12
5. Macrófagos	13
6. Clasificación y respuesta de los macrófagos frente a helmintos	14
7. Participación de la vía JAK-STAT	16
8. Regulación de la vía JAK-STAT	19
9. Interleucina 6 y 10 en la respuesta inmune frente a helmintos	22
V. JUSTIFICACIÓN	24
VI. HIPÓTESIS	24
VII. OBJETIVOS	25
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	26
IX. RESULTADOS	33
X. DISCUSIÓN	50
XI. CONCLUSIONES	58
XII. PERSPECTIVAS	59
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

II. ABREVIATURAS EMPLEADAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
aaMΦ's	Alternatively activated macrophages (Macrófagos alternativamente activados)
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
APC	Antigen Presenting Cell (Célula presentadora de antígeno)
Arg1	Arginasa-1
BSA	Bovine serum albumin (Albúmina sérica bovina)
BMDM	Bone marrow-derived macrophages (Macrófagos derivados de médula ósea)
caMΦ's	Classically activated macrophages (Macrófagos clásicamente activados)
CLC	Citocina similar a cardiotrofina
CNTF	Ciliary neurotrophic factor (Factor neurotrófico ciliar)
CT-1	Cardiotrofina-1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
FACS	Fluorescence Analyzer Cell Sorter (Citometría de flujo)
FIZZ1	Found in inflammatory zone (familia de moléculas tipo resistina)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago)
HRP	Horseradish peroxidase (Peroxidasa de rábano)
i.p.	intraperitoneal
IFN-γ	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
LIF	Leukemia inhibitory factor (Factor inhibidor de leucemia)
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (Sintasa de óxido nítrico inducible)
mA	Miliampères
MΦ's	Macrófagos
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor (factor estimulador de colonias de macrófagos)
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cells (Células supresoras de origen mieloide)
NO	Nitric Oxide (Óxido nítrico)
NK	Natural Killers (Linfocitos citolíticos naturales)
OSM	Oncostatina M
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (Patrones moleculares asociados a

	patógenos)
PBS	Phosphate buffered saline (Amortiguador de fosfatos)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PEC's	Peritoneal exudate cells (Células totales de exudado peritoneal)
PEST	Motivos en proteínas SOCS ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina
PIAS	Protein inhibitors of activated STATs (Proteínas inhibidoras de la activación de STATs)
p.i.	post-infección
PVDF	Polyvinylidene fluoride (Polivinilideno fluoruro)
RI	Respuesta inmune
RPM	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)
ROS	Reactive oxygen species (Especies reactivas de oxígeno)
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction (Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico)
SHP	Protein tyrosine phosphatase specific of SH2 (Fosfatasas de tirosinas específicas del dominio SH2)
SOCS	Suppressors of cytokine signalling (Supresores de la señalización de citocinas)
SSF	Solución salina fisiológica
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Transductores de Señales y Activadoras de la Transcripción)
Th1	T helper 1 (Células T cooperadoras tipo 1)
TAM	Tumor-associated macrophage (Macrófagos asociados a tumores)
Th2	T helper 2 (Células T cooperadoras tipo 2)
TLR	Toll like receptor (Receptores tipo Toll)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha (Factor de Necrosis Tumoral alfa)
TcES	Productos excretados/secretados de <i>Taenia crassiceps</i>
V	Voltio
Ym1	Factor quimiotáctico de eosinófilos

III. RESUMEN

Los parásitos helmintos son organismos eucariontes complejos que tienen la capacidad de regular y modular la respuesta inmune de sus hospederos. Las estrategias desarrolladas para su supervivencia y el establecimiento de la infección ha sido motivo de estudio en las últimas décadas. Sin embargo, los mecanismos que utilizan aun no son completamente entendidos. La inducción de una respuesta inmune tipo Th2 es característica de la infección por helmintos y *Taenia crassiceps* no es la excepción. Numerosas evidencias han sugerido que los macrófagos activados alternativamente (aaMΦ's), polarizados por respuestas tipo Th2, ayudan a crear un ambiente anti-inflamatorio favorable para la supervivencia del parásito. En parte, esto es posible gracias a la activación y regulación de moléculas específicas que participan en la señalización de múltiples citocinas y factores de crecimiento. Se ha demostrado que la infección con *T. crassiceps* y sus productos excretados/secretados (TcES) pueden modular de manera específica la vía de señalización JAK-STAT y su estudio es crucial para el entendimiento de los mecanismos de modulación en la infección por éste helminto. En este trabajo ratones BALB/c se infectaron con cisticercos de *T. crassiceps* por vía intraperitoneal durante dos u ocho semanas para analizar la respuesta de los macrófagos a las interleucinas 6 y 10. Los macrófagos peritoneales de ratones infectados presentaron un aumento en la fosforilación de STAT3 al ser estimulados con las citocinas IL-6 e IL-10, tanto en la infección aguda como en la crónica, con respecto a los macrófagos derivados del grupo control de animales sanos. A este respecto, el presente trabajo logró evidenciar que dicho aumento no estuvo asociado con alteración en niveles totales de STAT3, así como a una mayor expresión de IL-6R α . Sin embargo, existió una mayor expresión de los niveles de la proteína supresora SOCS3, mientras que estuvieron ausentes cambios significativos en la expresión del ARNm de IL-10 y TNF α , la producción de IL-6, IL-10 y TNF α variaron durante la infección por *T. crassiceps* en tiempos agudos y crónicos.

Adicionalmente el presente trabajo analizó el efecto *in vitro* de TcES sobre BMDMs, comprobando que los productos TcES aumentan la fosforilación de STAT3 únicamente en respuesta a IL-10. Además la sobreexpresión de SOCS3 se mantuvo incluso en BMDMs no expuestos a los productos TcES, atribuyéndose al estímulo con M-CSF. Estos resultados indican que la infección con *T. crassiceps* modula positivamente la activación de STAT3 en respuesta a IL-6 e IL-10, mientras que la proteína supresora SOCS3 tiene un papel relevante en la modulación de dicha respuesta.

Palabras clave: *Taenia crassiceps*, macrófagos, STAT3, IL-6, IL-10, SOCS3.

IV. INTRODUCCIÓN

Los parásitos helmintos son un grupo diverso de metazoos que infectan a miles de personas y animales domésticos en todo el mundo. En su mayoría, estas infecciones son causadas por miembros de los phyla Nematoda y Plathelminthes. Diferentes especies pertenecientes de ambos filos ocupan numerosos nichos tisulares dentro de sus hospederos mamíferos, que van desde el lumen intestinal a sitios intravasculares (MacDonald *et al.*, 2002). *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) es un platelminto de la clase Cestoda cuyo ciclo de vida incluye a roedores y cánidos como hospederos intermediarios y definitivos, respectivamente; lográndose detectar parasitosis en humanos inmunocomprometidos (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2004; Terrazas *et al.*, 1998). Su forma larvaria o metacéstodos se pueden alojar en músculo, cavidad peritoneal y pleural de los roedores, donde pueden reproducirse asexualmente por gemación (Peón *et al.*, 2013). La infección experimental con esta fase del céstodo se ha utilizado como un modelo de laboratorio para el desarrollo de la vacuna contra el parásito humano *Taenia solium* en humano (Linnaeus, 1758), ya que presentan una similitud antigénica, además de que permite el estudio de otros elementos involucrados en la respuesta inmune contra la infección (Reyes *et al.*, 2013). Diversos trabajos han demostrado que este tipo de parásitos son capaces de sobrevivir dentro de su hospedero por largo tiempo, utilizando mecanismos de evasión a la respuesta inmune desarrollados evolutivamente haciéndose incapaz de erradicar al parásito en el hospedero (Maizels *et al.*, 2004).

Las citocinas juegan un papel fundamental en la regulación y coordinación de la respuesta inmune. Son proteínas pleiotrópicas, es decir, que una sola citocina tiene la capacidad de inducir diferentes respuestas biológicas en diferentes tipos de células. La interleucina 6 (IL-6) ejerce actividades tanto pro como anti-inflamatorias, mientras que actúa en la diferenciación y/o activación de células T y macrófagos. La interleucina 10 (IL-10) es una proteína anti-inflamatoria importante producida por muchas poblaciones celulares, además de regular la diferenciación y proliferación de células inmunes como las células T, células B, células cebadas y granulocitos. Durante la respuesta inmune a estímulos infecciosos, los macrófagos se activan y liberan diferentes interleucinas, entre ellas IL-6 e IL-10 y, dado que expresan los receptores para las dos, responden a ambas actuando principalmente a través de la misma vía de transducción de señal llamada STAT3 (Niemand *et al.*, 2003).

La activación de esta vía al estímulo por dichas citocinas conduce a la fosforilación y activación de dos miembros de la familia STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), que son STAT3 y, en menor proporción, STAT1. La fosforilación de estas proteínas promueve su dimerización a través de sus dominios SH2, lo cual lleva a su translocación hacia el núcleo celular (Murray, 2006), donde interactúan con secuencias específicas de ADN activando genes asociados, resultando en diversas respuestas biológicas en macrófagos y linfocitos T (Galdiero *et al.*, 2006; Samavati *et al.*, 2009).

1. Respuesta inmune

El significado del término inmunidad está asociado a mecanismos de protección, cuyo concepto tiene su origen en la palabra latina "*immunis*" que históricamente denota libertad de obligaciones y castigos. Dicho término se extendió y se aplicó a aquellas personas que quedaban protegidas de ataques posteriores a enfermedades infecciosas una vez que las padecían (Abbas *et al.*, 2006).

El sistema inmunitario está constituido por diferentes órganos, células y moléculas que tienen como función la defensa contra microorganismos infecciosos e incluso contra sustancias ajenas que no tengan carácter infeccioso y que puedan despertar una respuesta inmune. Así, la respuesta inmune se define como la reacción coordinada desencadenada tanto frente a los componentes de los microorganismos como a macromoléculas, como proteínas y polisacáridos, y a compuestos químicos que sean identificados como ajenos (Abbas *et al.*, 2006; Janeway *et al.*, 2009).

Los mecanismos de defensa inmune pueden ser agrupados en dos grandes categorías. El *sistema inmune innato*, que aporta la primera defensa de forma general contra cualquier elemento reconocido como extraño. Los elementos bioquímicos y celulares que lo constituyen se encuentran presentes incluso antes de contraerse cualquier infección y responden con rapidez una vez desarrollada. Los componentes principales de la inmunidad innata son: a) Barreras físicas y químicas, representadas por epitelios y sustancias antimicrobianas presentes en sus superficies; b) Proteínas presentes en el torrente sanguíneo, como factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; c) Células fagocíticas (como neutrófilos, células dendríticas y macrófagos) y otros leucocitos tales como células naturales asesinas (NK), eosinófilos; y d) Citocinas, proteínas que controlan y coordinan las actividades de las células antes mencionadas y otras poblaciones celulares. El sistema de la inmunidad innata no distingue diferencias sutiles entre las sustancias extrañas, pero sí es capaz de discriminar

entre estructuras propias y ajenas, ya que es específico para estructuras que son comunes a los grupos de patógenos afines (Abbas *et al.*, 2006).

El *sistema inmune adaptativo* reconoce agentes amenazantes específicos y desarrolla una respuesta dirigida contra esos elementos. Tiene la capacidad de generar memoria inmunitaria, de ahí que una vez expuesta a un agente infeccioso, es capaz de montar una respuesta inmediata y más eficiente contra la exposición subsiguiente al mismo, representando una inmunidad protectora contra dicho agente. Esta respuesta adaptativa se superpone con la respuesta inmunitaria innata, sin embargo tarda más tiempo en aparecer (días) y tiene mayor capacidad y eficiencia de eliminar infecciones que la respuesta inmune innata. Este tipo de respuestas solo están presentes en vertebrados y su función de reconocimiento específico y detallado es principalmente dada por el receptor de los linfocitos, que poseen la capacidad para discernir un agente patógeno en particular y enfocar una respuesta inmune más eficaz contra éste (Abbas *et al.*, 2006; Janeway *et al.*, 2009).

2. Respuesta inmune frente a parásitos helmintos

Los parásitos helmintos son un grupo diverso de metazoos que infectan a millones de personas y animales domésticos, principalmente en países en desarrollo. En su mayoría, estas infecciones son causadas por miembros de los phyla Nematoda (gusanos redondos) y Plathelminthes (gusanos planos). Distintas especies pertenecientes a ambos grupos pueden ocupar una amplia gama de nichos dentro de los mamíferos hospederos, que van desde el lumen intestinal, cavidades y sitios intravasculares. Por lo general, los helmintos producen infecciones de tipo crónico, puesto que muchos son de vida larga; además tienen ciclos de vida complejos que consisten en varias etapas, que a su vez involucran a varios hospederos. Comúnmente, la etapa del helminto que es responsable de infectar al mamífero hospedero es la larva, la cual migra al nicho donde pueda crecer y reproducirse apropiadamente (Maizels *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 2002).

A pesar de los diversos mecanismos de protección que el hospedero elabora en contra del sinnúmero de antígenos que el parásito presenta, son evidentes las sofisticadas estrategias de evasión desarrolladas por estos patógenos al ser capaces de sobrevivir por largo tiempo en hospederos inmunológicamente competentes. La inherente cronicidad de las infecciones por parásitos de este tipo indican que el sistema inmune no es capaz de erradicar al patógeno, ya que éste último posee las herramientas necesarias para evadir la respuesta inmune (RI) desencadenada (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

El reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) es un elemento clave para la defensa inmunológica contra los parásitos. Por lo tanto la interacción parásito-hospedero tiene lugar principalmente entre la superficie del parásito y el sistema inmunológico de su anfitrión. La superficie de la mayoría de parásitos presenta moléculas como carbohidratos, proteínas o lípidos, que son objetivos importantes para activar la respuesta inmune frente a los helmintos. Muchas de estas estructuras son reconocidas específicamente por receptores del sistema inmune del hospedero (Hammerschmidt y Kurtz, 2005).

Las estrategias desarrolladas por los parásitos para su supervivencia en el hospedero y el establecimiento de la infección pueden agruparse en dos tipos: a) La evasión de la respuesta inmune utilizando formas de mimetismo molecular, promoviendo su variación antigénica o afectando la presentación y/o procesamiento de antígenos. b) Explotar al anfitrión a su beneficio para obtener ventajas como el establecimiento, el crecimiento o la reproducción del parásito. Un ejemplo de esto se da cuando el patógeno adquiere beneficios al tener control sobre hormonas o factores de crecimiento del hospedero que promueven su rápido establecimiento, y a su vez, el aumento de las tasas de crecimiento y reproducción. Además, las hormonas tienen la capacidad de afectar la respuesta inmunológica dirigida contra agentes patógenos (Escobedo *et al.*, 2005; Hammerschmidt y Kurtz, 2005).

En la mayoría de las infecciones helmínticas, la respuesta inmune es conducida a un perfil T helper de tipo 2 (Th2), en el que los linfocitos T CD4 responden con la producción de interleucinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Existe un mayor reclutamiento de basófilos, eosinófilos y mastocitos, así como también la producción de IgE e IgG1 por células B. Esta respuesta juega un papel importante en la reducción de la gravedad de la enfermedad aguda y permite la supervivencia del parásito, sin embargo, la condición de inducir respuestas Th2 parece no ser una adaptación al parasitismo, ya que helmintos de vida libre también poseen esta capacidad (Carvalho *et al.*, 2009; Garside *et al.*, 2000).

Otra característica de los parásitos helmintos es su capacidad de migración a través de los tejidos del hospedero, lo cual puede dar lugar a graves daños tisulares; la respuesta inmune de tipo Th2, principalmente a través de los llamados macrófagos alternativamente activados, tienen la capacidad de promover la reparación y regeneración del tejido dañado (Chen *et al.*, 2012). También se ha presenciado que las respuestas inflamatorias dirigidas contra antígenos no relacionados con los parásitos pueden ser

inhibidos por las infecciones por helmintos, disminuyendo el daño ocasionado por alguna respuesta inmune exacerbada (Klotz *et al.*, 2011).

Por otro lado, estas respuestas "protectoras" pueden alterar el desarrollo de estadios larvales o gusanos adultos de otros helmintos, incluso pudiendo llevar a la expulsión del parásito (Chen *et al.*, 2012). Por ejemplo, la expulsión de helmintos gastrointestinales depende fundamentalmente de la capacidad del hospedero para generar una respuesta inmune de tipo Th2, puesto que las citocinas asociadas a este perfil (IL-4, IL-9, IL-13, IL-25 e IL-33) son importantes en la mediación de mecanismos efectores que favorecen la expulsión del parásito. Dentro de éstos mecanismos se puede mencionar la hiperplasia de las células caliciformes y la producción de mucina, eosinofilia, el reclutamiento de macrófagos activados alternativamente, aumento del recambio de células epiteliales e hiper-contractibilidad de células musculares (Perrigoue *et al.*, 2008).

El céstodo *Hymenolepis diminuta* es un parásito que en modelos murinos con las cepas BALB/c y C57BL/6 es expulsado a los nueve días en una infección primaria y de dos a cuatro días después de una segunda infección, esto porque se desarrolla una memoria inmunológica. La respuesta inmune en el hospedero murino es la clásica Th2 y está dominada por IL-4, IL-5 e IL-13 (Reyes *et al.*, 2013). *Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis*, pueden inhibir el factor C3 del complemento; los macrófagos peritoneales de diferentes etapas de la infección por *E. multilocularis* poseen la capacidad de suprimir la activación de células T, asociado a los bajos niveles de expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CMH II (Mejri *et al.*, 2011).

A sí mismo, también se han asociado otros parásitos helmintos a la respuesta inmune tipo Th2 con su resistencia y la respuesta Th1 a la susceptibilidad frente a sus hospederos. Tales casos son los nematodos intestinales *Nippostrongylus brasiliensis* y *Heligmosomoides polygyrus*. Este último establece infecciones a largo plazo en la mayoría de las cepas de ratones, indicio de su gran capacidad inmunosupresora. Inhibe la expulsión de otros parásitos, como *N. brasiliensis* y estimula la producción de células T reguladoras; además de que secreta un "factor inmunomodulador" de bajo peso molecular que inhibe las respuestas de linfocitos T *in vitro*. (Maizels *et al.*, 2004). A pesar de las similitudes que presentan por ser miembros del mismo phylum, algunos nematodos son expulsados por diferentes mecanismos. Por ejemplo, la expulsión de *Trichinella spiralis* y *N. brasiliensis* es dependiente de la unión de la IL-4 o IL-13 al receptor IL-4R α para la posterior activación de STAT6, sin embargo, la expulsión de *T. spiralis* no se genera sin la presencia de los mastocitos (MacDonald *et al.*, 2002).

Dentro de los tremátodos utilizados en modelos murinos, *Fasciola hepatica* induce el reclutamiento de células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y células T CD4 en la cavidad peritoneal. Las CD y los MΦ's en ratones liberan altas concentraciones de IL-10 y presentan una baja expresión del marcador CMH clase II. La infección con *F. hepatica* también ejerce supresión de las respuestas inmunes a autoantígenos y atenúa los signos clínicos de la encefalomiелitis autoinmune experimental, esto asociado a la supresión de la síntesis IL-17 (Walsh et al., 2009). Por otro lado, en la esquistosomiasis, dada por *Schistosoma mansoni*, también existe una respuesta predominantemente Th2 y se ha observado que en ausencia de IL-4, los ratones desarrollan hepatotoxicidad y caquexia severa. Experimentos *in vitro* sugirieron que el aumento de la respuesta Th17 es responsable de la severa respuesta inflamatoria inducida en los ratones infectados por este parásito (Maizels et al., 2009).

En la cisticercosis murina experimental, se han desarrollado distintos modelos con parásitos helmintos de fácil manejo en el laboratorio. La forma larval de *T. crassiceps* se reproduce asexualmente en cavidad peritoneal de ratones y previamente se ha utilizado para el análisis y estudio de elementos involucrados en la respuesta inmune contra la infección (Reyes et al., 2013) y se ha demostrado que los carbohidratos presentes en sus antígenos solubles tienen efectos para dirigir la respuesta inmune a un perfil de tipo Th2 (Terrazas et al., 2010).

3. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*

Taenia crassiceps (Zeder, 1800) es un platelminto de la clase Cestoda cuyo ciclo de vida implica a roedores y cánidos como hospedadores intermediarios y definitivos, respectivamente. En su forma adulta este parásito tiene una longitud media de 14 cm, su cabeza o escólex posee cuatro ventosas ovales de 20 micras de diámetro y una boca (rostelo) armada con 30 a 34 ganchos dispuestos en una doble corona. Su cuerpo está conformado por alrededor de 82 proglótidos, que de acuerdo a su madurez representan una unidad reproductiva con ovarios y testículos que producen gametos para la fecundación. Las larvas de *T. crassiceps* son vesículas ovoides transparentes de 4 a 5 mm de longitud. En uno de sus polos se encuentra el escólex el cual cuenta con 17 ganchos y cuatro ventosas. Las larvas se pueden reproducir de forma asexual por el fenómeno de gemación, liberando las gemas en su polo abscólex (Maillard et al., 1998; Willms y Zurabian, 2010).

La forma adulta de *T. crassiceps* se ha encontrado en el intestino de perros o zorros rojos (*Vulpes vulpes*). Cuando se ha efectuado la fecundación de gametos del

parásito, los proglótidos grávidos y maduros son expulsados en las heces al aire libre, éstas a su vez pueden ser ingeridas por pequeños roedores, donde se desarrolla el estado larvario. En los roedores, los metacestodos pueden multiplicarse asexualmente de manera exógena como en las cavidades corporales (pleural y peritoneal) y raramente endógena, como en músculo esquelético. Los hospederos intermediarios posteriormente pueden ser cazados y comidos por un carnívoro que puede ser el hospedero definitivo donde se desarrolle el estado adulto en el duodeno, desde el cual pueden expulsar los huevos en las heces, que nuevamente pueden ser consumidas por los roedores (Fig. 1). En contraste con otros parásitos helmintos, *T. crassiceps* rara vez se desarrolla en los seres humanos, quienes solo sirven como anfitriones cuando los alimentos o el agua que consumen están contaminados con heces de cánidos infectados. Son pocos casos humanos y exclusivamente en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en los que los metacéstodos se desarrollan en el tejido subcutáneo y entre el tejido muscular (Heldwein *et al.*, 2006; Ntoukas, *et al.*, 2013).

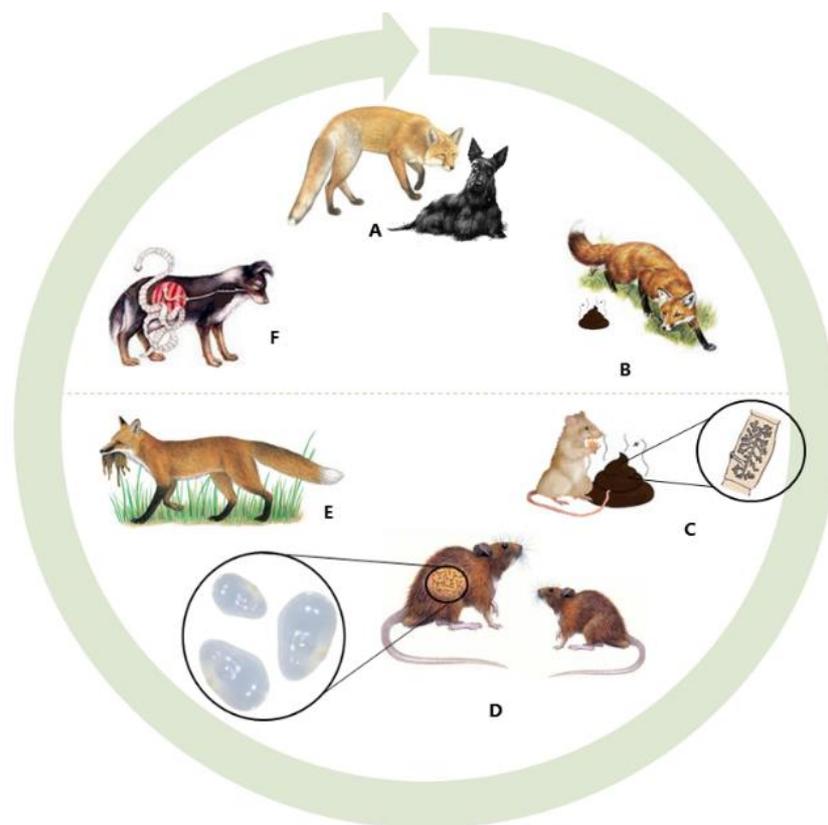


Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*. (A) Hospederos definitivos, (B) Heces de hospedero infectado al aire libre, (C) Ingestión de huevos y/o proglótidos grávidos en las heces por el hospedero intermediario, (D) Las larvas crecen en el hospedero intermediario, (E) El hospedero intermediario es ingerido por un hospedero carnívoro definitivo (F) Desarrollo del gusano adulto en el duodeno del hospedero carnívoro definitivo.

4. Respuesta inmune a *Taenia crassiceps*

La infección experimental con la fase larvaria de *T. crassiceps* se ha utilizado como un modelo de laboratorio para el desarrollo de la vacuna contra el parásito humano *Taenia solium* (Linnaeus, 1758), debido a que presentan similitud antigénica; además permite el estudio de otros elementos involucrados en la respuesta inmune contra la infección (Reyes *et al.*, 2013). La forma larval de la cepa ORF de *T. crassiceps*, que se reproduce asexualmente en cavidad peritoneal de ratones de la cepa BALB/c, se ha utilizado para el análisis de células del sistema inmune que entran en contacto con el parásito y como una fuente de antígenos para su utilización en pruebas inmunológicas, ya que el cisticerco tiene la capacidad de secretar y excretar antígenos al medio circundante. También la estructura externa de cisticerco presenta un complejo sistema de antígenos con capacidad de inducir una respuesta inmunológica particular, del cual aún queda mucho por explorar respecto a sus componentes antigénicos (Arruda *et al.*, 2005).

Estudios previos relacionados con la activación diferencial de macrófagos provenientes de animales infectados con *T. crassiceps*, son los efectuados por Rodríguez-Sosa y colaboradores en el 2002, donde se analizó la vía de señalización de STAT6, encontrándola como fundamental para la supresión de la respuesta inmune de tipo Th1, la cual es necesaria para el control de la cisticercosis experimental murina. También demostraron que las citocinas producidas en la respuesta inmune de tipo Th2 favorecen la susceptibilidad frente al desarrollo de la infección por cisticercosis a través de la activación de STAT6; por otro lado, Rodríguez-Sosa y colaboradores (2004), observaron que ratones deficientes de la molécula STAT4 fallaban en el desarrollo de una respuesta eficaz Th1 promoviendo una respuesta de tipo Th2, convirtiéndolos en ratones altamente susceptibles a la infección por *T. crassiceps*. Además, dicha susceptibilidad podría estar asociada con la incapacidad de los macrófagos para producir cantidades adecuadas de citocinas pro-inflamatorias y óxido nítrico. Así, durante la infección con *T. crassiceps* la vía de señalización JAK-STAT tiene un papel importante, donde STAT4 se encuentra asociada con la resistencia, mientras que STAT6 con susceptibilidad frente al parásito.

Becerra y Terrazas en el 2014 estudiaron la función pro-inflamatoria de macrófagos frente a la infección con *T. crassiceps*, la cual depende en parte de la fosforilación de STAT1. Observaron que existía una menor fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ en células de ratones infectados o estimuladas con los productos TcES. Tanto la infección como el antígeno TcES indujeron la expresión de SOCS3 y SHP1. Con ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) se indujo el restablecimiento de la fosforilación de STAT1 mientras la que expresión de SOCS3 no disminuyó, dado que el ortovanadato de sodio es

un inhibidor de la actividad de las fosfatasa, estos datos sugieren un papel importante de la fosfatasa SHP1 en este fenómeno.

5. Macrófagos

Una de las poblaciones celulares del sistema inmune que posee una gran plasticidad son los macrófagos. Son un componente importante de la respuesta innata por su función efectora como una de las primeras líneas de defensa contra los patógenos invasores y participan en el comienzo y regulación de las repuestas inmunes adaptativas (Duque y Rojas, 2007).

Los macrófagos derivan de células precursoras mieloides en la médula ósea, las células pluripotenciales, que estimuladas con IL-3, GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago) y M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófago) dan origen a promonoblastos que dan lugar a la progenie monocito-macrófago, posteriormente estos se diferencian a monoblastos, promonocitos y finalmente a monocitos, los cuales entran al torrente sanguíneo y se dispersan en los tejidos por la acción de diferentes quimiocinas. Una vez en el tejido, se convierten en macrófagos residentes con un fenotipo específico. Se encuentran distribuidos de forma ubicua en diversos órganos y tejidos de seres humanos y animales; pueden mostrar diferente morfología, se caracterizan por una vida media larga y distintas funciones de acuerdo en el tejido que se encuentren (Duque y Rojas, 2007; Takahashi, 1994). Gracias a su alta capacidad fagocítica, se encargan de vigilar y eliminar patógenos y restos celulares de los tejidos, siendo críticos en el mantenimiento de la homeostasis de éstos últimos. Los macrófagos reconocen patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) por medio de receptores que presentan en la superficie de su membrana, por ejemplo los receptores de tipo *toll* (TLR). Cuando esto pasa, se liberan grandes cantidades de citocinas importantes para iniciar la inflamación y el reclutamiento celular. Además, la capacidad efectora de los macrófagos puede ser potencializada por las células del sistema inmune adaptativo (Sanz *et al.*, 2013).

Desde su descubrimiento por Metchnikoff en 1892 hasta hace más de una década, los macrófagos solo se consideraban grandes células con capacidades fagocíticas y con funciones pro-inflamatorias. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estas células poseen plasticidad fenotípica influida por el microambiente que los rodea, contribuyendo al desarrollo de su alta heterogeneidad, propiedad que poseen los macrófagos al presentar diferentes fenotipos tanto morfológicos como funcionales (Fernando *et al.*, 2014).

6. Clasificación y respuesta de los macrófagos frente a helmintos

En la actualidad, han sido descritas diferentes subpoblaciones de macrófagos con distintas funciones. Los macrófagos clásicamente activados (caMΦ's o M1), población mejor caracterizada, que se induce a este perfil con la exposición a IFN γ , TNF α y/o productos microbianos como lipopolisacáridos (LPS). Presentan una alta capacidad de generar citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-23, pero escasa producción de IL-10; también generan altos niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de óxido nítrico (NO) (Fig. 2). Se han asociado a perfiles de respuestas tipo Th1 y tienen el papel principal de actuar contra parásitos intracelulares y células tumorales (Reyes y Terrazas, 2007).

Los macrófagos alternativamente activados (aaMΦ's o M2) son otra de las principales subpoblaciones de macrófagos. Las citocinas inductoras directas para éstos son la IL-4 e IL-13, pero otras citocinas como IL-25 e IL-33 pueden potenciar dicha polarización de forma indirecta a través de las células Th2, por ello están asociadas a la respuesta inmune de tipo Th2, independientemente si la activación es inducida por inflamación de origen parasitaria, asmática o asociada a un tumor. Además, los aaMΦ's están implicados en la supresión de respuestas inflamatorias Th1 (Donnelly *et al.*, 2007; Mylonas *et al.*, 2012). Generalmente, los aaMΦ's presentan baja producción de las citocinas IL-1 β , IL-12 e IL-23, pero una mayor producción de IL-10 y TGF- β . También tienen un papel central en la reparación de tejidos (Gordon *et al.*, 2010). Se han identificado varios marcadores característicos de esta subpoblación celular, como Arg-1, el receptor de manosa, FIZZ1 y YM1 (Fig. 2). El gen para éste último marcador es expresado en mayor proporción en aaMΦ's de infecciones por parásitos helmintos y estudios recientes han demostrado que la expresión de YM1 inducida por una infección de este tipo puede presentarse independientemente del estímulo con IL-4 e IL-13, lo que indica que su inducción es crítica para la polarización hacia un perfil M2 (Donnelly *et al.*, 2007). Por su parte, el efecto protector de los aaMΦ's es probable que implique el agotamiento de arginasa dependiente de L-arginina, lo cual se requiere para mantener la proliferación de células T y las respuestas Th2 (Maizels *et al.*, 2009).

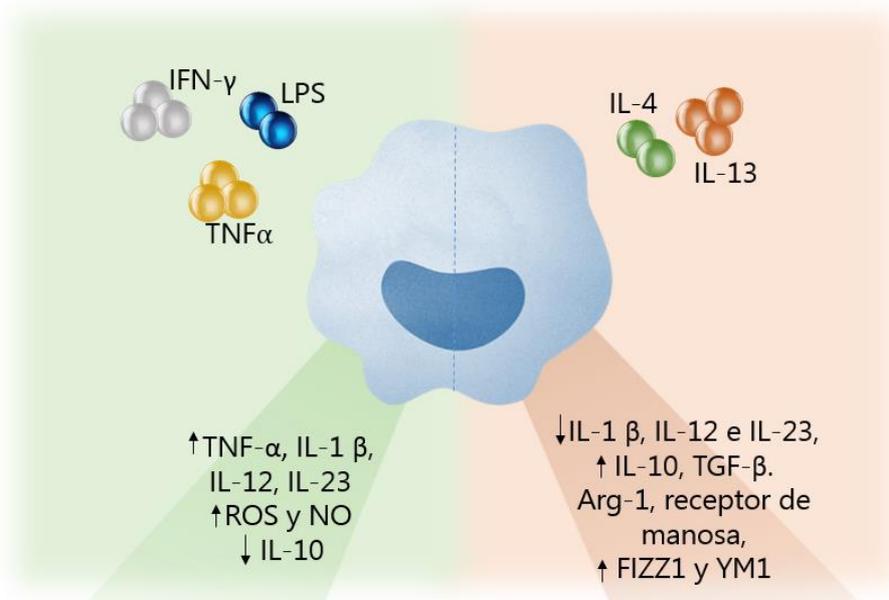


Figura 2. Fenotipos adquiridos por los macrófagos dependiendo del microambiente. Los macrófagos clásicamente activados, inducidos por citocinas como IFN γ y TNF α , o por productos bacterianos como LPS. Producen altos niveles de TNF α , IL-1 β , IL-12, IL-23 así como especies reactivas de oxígeno y bajos niveles de IL-10. Los macrófagos alternativamente activados, con potencial anti inflamatorio están polarizados por citocinas como IL-4 e IL-13, así como M-CSF, presentan una mayor expresión del receptor de manosa FIZZ1, arginasa-1, y YM1. Están asociados a funciones anti-inflamatorias, de cicatrización de heridas y reparación de tejidos.

Los aaM Φ 's presentes en infecciones por parásitos helmintos cumplen principalmente tres funciones. Una es como células reguladoras, ya que pueden suprimir la respuesta inflamatoria al parásito. Al ser una población que se recluta en grandes cantidades se considera que son células efectoras importantes, liberan moléculas contra los helmintos y promueven aún más la respuesta Th2. Finalmente, éstas células también tienen la tarea de reparar el daño causado por los parásitos en los tejidos (Chen *et al.*, 2012; Maizels *et al.*, 2004).

Se han caracterizado otras poblaciones de macrófagos de acuerdo a sus diferentes mecanismos de inducción. Como se mencionó anteriormente, aquellos macrófagos diferenciados con IL-4 e IL-13 son aaM Φ 's, pero de tipo M2a. Los macrófagos polarizados por complejos inmunes y que secretan altos niveles de IL-10 son macrófagos M2b y los M Φ 's que han sido "desactivados" por la exposición a IL-10 se denominan M2c. También existen otras clasificaciones propuestas en relación a macrófagos asociados a tumores (TAM) y células supresoras de origen mieloide (MDSCs) (Fernando *et al.*, 2014), cuya función principal es la de inactivar células de la respuesta inmunológica.

Aunque esta clasificación de acuerdo a los fenotipos de los macrófagos es actualmente la más usada para entender sus funciones, es importante considerar que se subestima la complejidad en condiciones *in vivo*, donde existe una alta diversidad de estados de activación de los macrófagos que surgen en respuesta a diferentes estímulos y ambientes. Por ello es importante seguir estándares para unificar su clasificación, tomando en consideración el origen de los macrófagos, los factores activadores empleados en su diferenciación-activación y determinar un consenso de los marcadores específicos de macrófagos dependiendo su estado de activación, tal como una nomenclatura universal de activación de los macrófagos (Murray *et al.*, 2014).

7. Participación de la vía JAK-STAT

Diferentes funciones y procesos celulares como el crecimiento, supervivencia y diferenciación son activados y regulados por estímulos extracelulares, tales como factores de crecimiento, hormonas y citocinas. La mayoría de estos factores solubles interactúan y son reconocidos por receptores específicos que están ubicados en las membranas celulares. Lo que hace posible que se logren dichas respuestas celulares es la presencia de vías de señalización de transducción de señales, que se caracterizan por la activación o inactivación de manera secuencial de proteínas efectoras que finalmente logran una modificación en la función o estructura celular (Berishaj *et al.*, 2007).

Una de las vías de señalización que se ha demostrado como esencial para la función de múltiples citocinas es la vía JAK-STAT, la cual está conformada por dos diferentes grupos de proteínas, las proteínas JAK (Janus cinasas) y las proteínas Transductoras de Señales y Activadoras de la Transcripción (STAT). Esta vía fue inicialmente descrita en la década de 1990 por Darnell y Stark con el estudio de la transducción de señales intracelulares inducidas por interferón. La vía JAK-STAT participa en múltiples respuestas asociadas a respuestas inmunes, incluyendo la proliferación, migración, diferenciación, apoptosis y supervivencia celular (Heneghan *et al.*, 2013; Nishihara *et al.*, 2007).

Janus cinasas (JAK)

Las proteínas Janus cinasas son componentes cruciales de diferentes vías de señalización. En la actualidad cuatro miembros de la familia JAK se han identificado en mamíferos: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Poseen pesos moleculares que van desde los 120 a los 140 kDa y están conformadas por alrededor de mil aminoácidos; sus estructuras conservadas que las caracterizan se conocen como dominios de homología JAK (JH) que

se han nombrado desde el extremo carboxi-terminal como JH1 hasta JH7 (Fig. 3). Su dominio catalítico (JH1) se encuentra yuxtapuesto con un dominio de pseudocinasa (JH2), característica a la que se atribuye su nombre Janus al ser comparadas con el dios romano Janus que posee dos caras. Cuando algún tipo de receptor acoplado a estas cinasas se une a su ligando, se desarrolla un cambio conformacional que favorece que las JAKs se fosforilen. Dos moléculas JAKs de la misma clase o diferentes deben estar en estrecha proximidad para que sea posible dicha fosforilación (Becerra *et al.*, 2011; Galdiero *et al.*, 2006; Heneghan *et al.*, 2013). Las proteínas JAK fosforiladas tienen diferentes sustratos sobre los que ejercen su función de cinasa. Las STATs se encuentran entre las proteínas que mejor se han caracterizado como sustrato de las cinasas JAK.

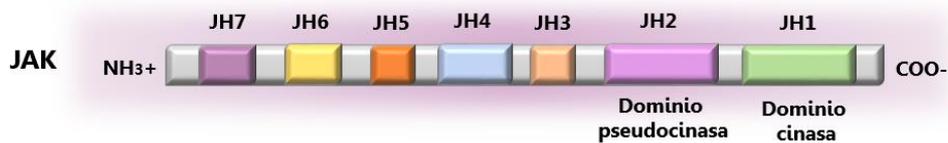


Figura 3. Proteína JAK. Desde el extremo carboxi-terminal se encuentra JH1 hasta JH7. Su dominio catalítico cinasa (JH1) se encuentra yuxtapuesto con un dominio de pseudocinasa (JH2).

Moléculas Transductoras de Señales y Activadoras de la Transcripción (STAT)

Siete son las proteínas STAT que actualmente se han identificado en células de mamíferos: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6, las cuales son activadas por un conjunto distinto de citocinas y factores de crecimiento. El peso molecular de estas proteínas oscilan de los 75 a los 95 kDa, presentan una longitud de 750 a 850 aminoácidos y se componen de cuatro dominios conservados en común y un quinto que le da especificidad a cada STAT (Galdiero *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2005).

En el extremo amino-terminal se localiza el dominio de interacción dímero-dímero, de alrededor de 130 aminoácidos, que favorece la dimerización de las STATs, también regula la translocación al núcleo y el reclutamiento de fosfatasa para algunas STATs. Este es seguido por un dominio en espiral de superenrollamiento ó "coiled-coil", implicado en interacciones proteína-proteína, posteriormente se encuentra un dominio de unión a ADN, que reconocen dos tipos de motivos en este último: el motivo ISRE (Interferon-Stimulated Response Elements) y el motivo GAS (Gamma-Activated Sequence). El dominio SH2 (Src- Homology 2) tiene la capacidad de unir fosfotirosinas que se ubican en regiones específicas de otras proteínas, representa el dominio más altamente conservado de estas proteínas. Las funciones hasta ahora descritas para este dominio son las de participar en el reclutamiento de las STATs al receptor de diferentes ligandos, es

requerido para la fosforilación de tirosinas (Tyr) de las STATs, ya que para formar dímeros estos dominios se unen a una fosfotirosina opuesta de otra STAT muy próxima del extremo carboxi-terminal y es fosforilada en respuesta a estos ligandos. Finalmente se encuentra un dominio de transactivación en el extremo carboxi-terminal, el cual representa la región variable en las STATs (Fig. 4) (Meyer y Vinkemeier, 2004; Valle y Soto, 2005; Vogt *et al.*, 2010).

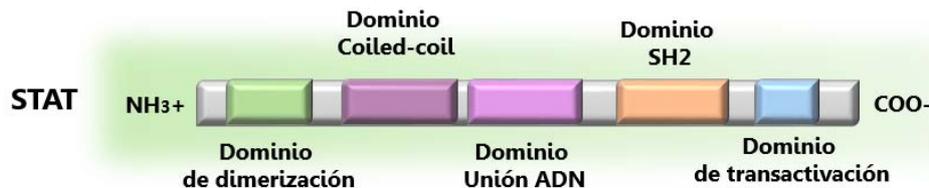


Figura 4. Estructura general de los STAT. Estas proteínas poseen diferentes dominios, desde su extremo amino terminal se encuentra el dominio de dimerización, el dominio "Coiled coil", el dominio de unión al ADN, el dominio SH2 que al fosforarse permite su dimerización con otros STATs, y el dominio de transactivación.

Los factores de transcripción STAT se encuentran latentes en el citoplasma y entran en el núcleo en función a la fosforilación de la tirosina y su dimerización con otras STATs. Sin embargo, las estas proteínas no fosforiladas también son capaces de entrar en el núcleo a través de una lanzadera de las mismas en forma permanente entre el citoplasma y el núcleo, lo que lleva a un estado de equilibrio de las concentraciones de STAT en ambas regiones (Heneghan *et al.*, 2013; Meyer y Vinkemeier, 2004).

Transducción de señales a través de la Vía JAK-STAT

La transducción de señales a través de esta vía da comienzo con la llegada del ligando a un receptor específico. La expresión de receptores en la superficie celular es un proceso dinámico y altamente regulado, por ello la disponibilidad de los componentes del receptor es de fundamental importancia para la transducción de las señales exógenas (Traum *et al.*, 2011). Tras la activación por el ligando, las JAKs fosforilan residuos de tirosina del dominio citoplasmático de los receptores. Estos residuos de fosfotirosina sirven como sitios de unión para moléculas de señalización con un dominio SH2, tales como los factores de transcripción STAT. Estas últimas son reclutadas al receptor fosforilado y se anclan al mismo para dar lugar a la fosforilación de tirosinas específicas en STAT. Ya fosforiladas se disocian del receptor y dimerizan por interacciones recíprocas de su dominio SH2 y así translocan hacia el núcleo celular, donde interactúan con

secuencias específicas de ADN activando genes asociados, resultando en diversas respuestas biológicas (Fig. 5) (Murray, 2007; Samavati *et al.*, 2009, Vogt *et al.*, 2010).

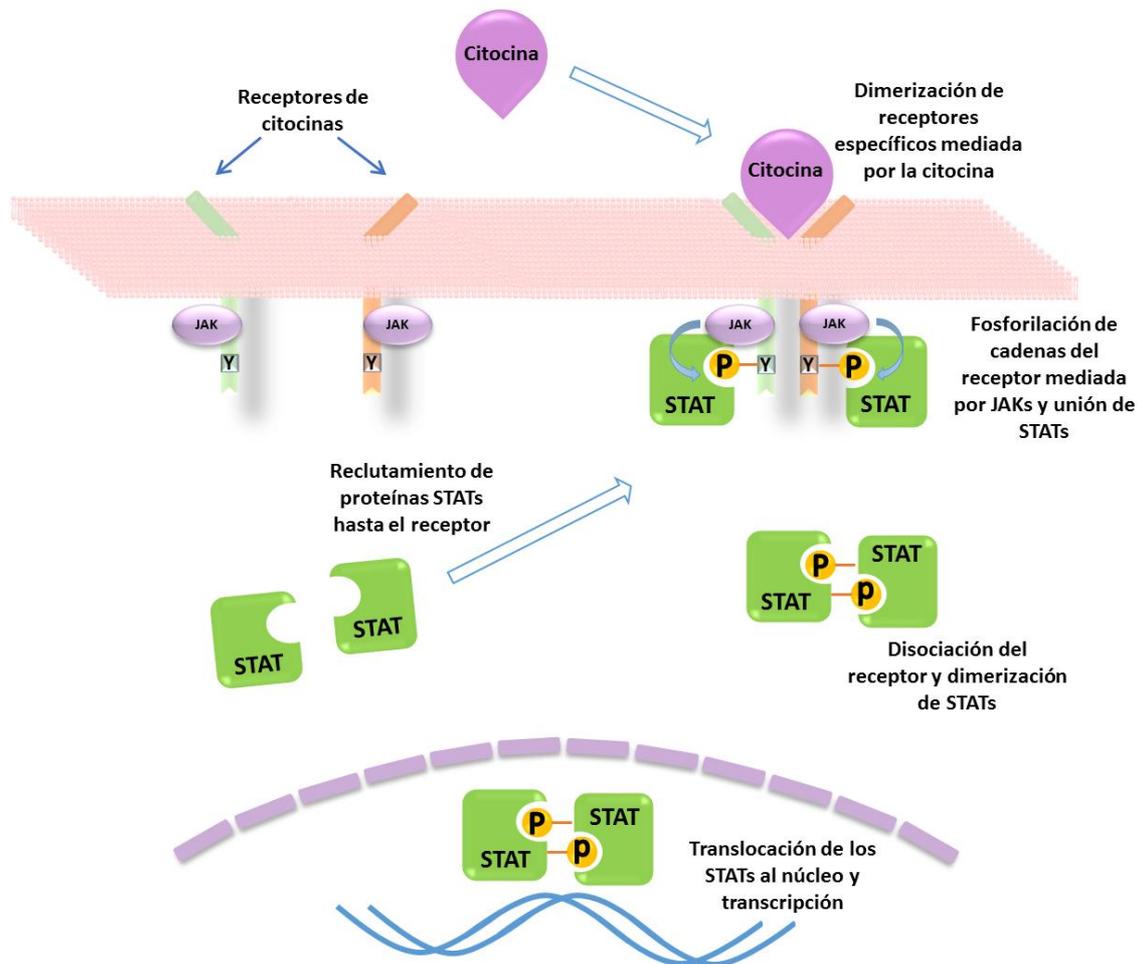


Figura 5. Transducción de las señales de las citocinas a través de la vía de JAK-STAT. La dimerización de los receptores inducida por la unión de las citocinas da como resultado la fosforilación de las cadenas del receptor mediada por la proteína JAK, posteriormente la unión de los STAT inactivos lleva a su fosforilación también por las cinasas JAK, la dimerización de los STAT y su migración hasta el núcleo, y finalmente la estimulación de la transcripción génica.

8. Regulación de la vía JAK-STAT

Todos los procesos de activación de la respuesta inmune deben ser controlados y regulados para que se desarrollen adecuadamente y la vía JAK-STAT no es la excepción. Como importante es la eficiente activación de la misma, también lo es su regulación y se lleva a cabo en muchos niveles de la vía por distintos mecanismos. Se puede desarrollar una regulación negativa al generar formas solubles del receptor de citocina que tengan competencia por el ligando, también se ha observado que para evitar la constante señalización celular se efectúa la endocitosis del receptor de superficie (Valle y Soto,

2015). Por otro lado, existen proteínas que son inducidas por citocinas u otros estímulos que actúan como inhibidores de retroalimentación negativa de la señalización, interactuando directamente con alguno de los intermediarios de esta vía de señalización. En estos reguladores negativos se incluyen a las llamadas proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS), a las proteínas inhibidoras de la activación de STAT (PIAS) y a las fosfatasas de tirosinas específicas del dominio SH2 (SHP) (Lang *et al.*, 2005; Liongue *et al.*, 2012).

Proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS)

Son una familia de proteínas intracelulares conformada por ocho miembros: SOCS1-SOCS7 y CIS. Todas contienen un dominio SH2 (Src-Homology 2), un dominio amino-terminal de longitud variable y un dominio conservado conformado por 40 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal denominado caja SOCS, que interactúa con elementos del proteosoma (Fig. 6) (Alexander, 2002; Tamiya *et al.*, 2011; Yoshimura *et al.*, 2007).

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

Las proteínas SOCS1 y SOCS3 son capaces de inhibir directamente la actividad tirosina cinasa de las proteínas JAKs, a través de su región inhibidora de kinasa (KIR), que se compone de 12 aminoácidos. También ambas moléculas se han caracterizado ampliamente con respecto a su papel en la polarización de macrófagos de M1 a M2 (Babon *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2012).

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

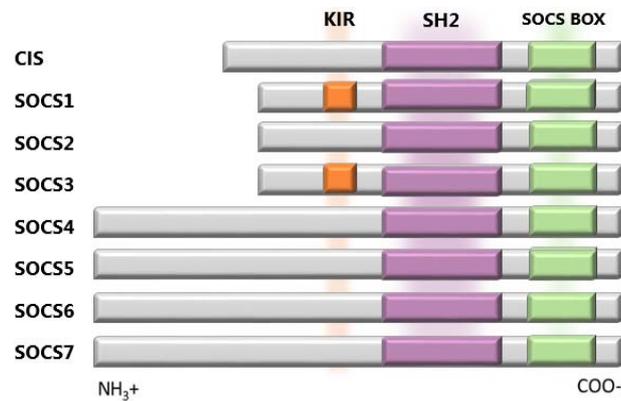


Figura 6. Estructura esquemática de los ocho miembros de la familia SOCS. La caja SOCS y el dominio SH2 se encuentran conservados. SOCS1 y SOCS3 son los únicos que contienen el dominio KIR de inhibición.

Proteínas inhibidoras de la activación de STAT (PIAS)

Cuatro moléculas son las que conforman la familia de las proteínas inhibidoras PIAS en mamíferos: PIAS1, PIAS3, PIASx y PIASy. PIAS1 fue descrita e identificada inicialmente y se caracterizó como un inhibidor específico de la activación de la transcripción mediada por STAT1. Se ha demostrado que las PIAS3 y PIASx pueden inhibir a STAT3 y STAT4, respectivamente, reflejando una especificidad por ciertas proteínas STAT. Recientemente, varios experimentos han dilucidado los mecanismos por los cuales las proteínas PIAS pueden inhibir la actividad de STAT. Dichos mecanismos parecen diferir de unas proteínas con respecto a otras; como se mencionó anteriormente, PIAS1 y PIAS3 se unen a STAT1 y STAT3 para inhibir la asociación con el ADN, mientras que PIASx y PIASy impiden la función de las STATs sin afectar la unión al ADN (Liongue *et al.*, 2012; Wormald y Hilton, 2004).

Fosfatasa de tirosinas específicas con dominio SH2 (SHP)

Diferentes tipos de proteínas pertenecientes al grupo de las tirosinas fosfatasa (PTP) participan activamente en el control de activación de la vía JAK-STAT. Las mejor caracterizadas son SHP-1 y SHP-2. Su estructura consiste en dos dominios SH2 consecutivos en el extremo amino-terminal y un dominio de tirosina fosfatasa en la región

carboxi-terminal. Ya que en las vías de transducción de señales la fosforilación de tirosina, serina o treonina son mecanismos comunes, ambas fosfatasas SHP se unen con sus dominios SH2 a residuos fosfotirosina luego de ser activados. SHP-1 regula negativamente la transducción de señales de citocinas por desfosforilación de JAK2 y está asociado al receptor de la interleucina-4 (IL-4) y al receptor de eritropoyetina. Por otra parte SHP-2 parece funcionar principalmente como un regulador positivo de la señalización, aunque hay evidencia que sugiere que puede inhibir la señalización de citocinas a través del receptor gp130, así como regular negativamente a JAK1 (Liongue *et al.*, 2012; Wormald y Hilton, 2004).

9. Interleucina 6 y 10 en la respuesta inmune frente a helmintos

Las citocinas son moléculas de naturaleza proteica de bajo peso molecular (alrededor de 25 kD) que son producidas por una gran variedad de tipos celulares, por lo general en respuesta a un estímulo activador. Sus acciones pueden ser autocrinas, paracrinas y endocrinas e inducen respuestas mediante la unión a sus receptores específicos. Dentro de sus principales funciones son participar en el desarrollo, crecimiento y activación de las células del sistema inmunológico regulando muchas funciones de las células encargadas de la inmunidad innata y adquirida (Janeway *et al.*, 2009). Durante la respuesta inmune a los estímulos infecciosos, los macrófagos se activan y liberan diferentes interleucinas, entre ellas IL-6 e IL-10 y, dado que expresan los receptores para ambas citocinas, responden a ellas actuando principalmente a través de la misma vía de transducción de señal STAT3 (Niemand *et al.*, 2003).

La interleucina 6 (IL-6) es una glicoproteína de 21 kDa con 184 aminoácidos producida por diversos tipos celulares como monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, células de la glía, adipocitos y células epiteliales intestinales. Junto con otras citocinas de homología estructural, conforman la familia de la gp130, que usan una vía común de transducción de señales que involucra la fosforilación de las proteínas intracelulares Janus cinasas (Hirano *et al.*, 2000; Martínez, 2004; Saavedra *et al.*, 2011). La activación de estas cinasas en respuesta al estímulo por IL-6 conduce a la fosforilación y activación de dos miembros de la familia STAT, que son STAT3 y, en menor proporción, STAT1. La fosforilación de estas proteínas promueve su dimerización a través de sus dominios SH2, lo cual lleva a su translocación hacia el núcleo celular (Murray, 2007), donde interactúan con secuencias específicas de ADN activando genes asociados, resultando en diversas respuestas biológicas (Galdiero *et al.*, 2006; Samavati *et al.*, 2009). De manera similar a IL-6, la unión de IL-10 a las subunidades IL-10R en la célula conduce a

la activación de JAK1 y a la fosforilación del factor de transcripción STAT3 (Fig. 7) (Stephanou *et al.*, 1998).

La interleucina 10 (IL-10) es una proteína no glucosilada de 18 kDa. Su receptor (IL-10R) pertenece a la familia de receptores de citocina de clase II, similar a los receptores de interferones. Es una importante citocina antiinflamatoria producida por diferentes poblaciones celulares, principalmente por linfocitos T y macrófagos activados. Regula la diferenciación y la proliferación de células inmunes como las células T, células B, células cebadas y granulocitos. Los mecanismos inmunorreguladores ejercidos por esta citocina se logran principalmente mediante la inhibición de varias respuestas funcionales de células T, monocitos, macrófagos y neutrófilos, reduciendo la producción de otras citocinas como IFN- γ , IL-2, TNF- α y la expresión del CMH de clase II, el control de la producción de NO, la fagocitosis y la síntesis de citocinas proinflamatorias en respuesta a LPS (Benkhart *et al.*, 2000; Berlato *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2002).

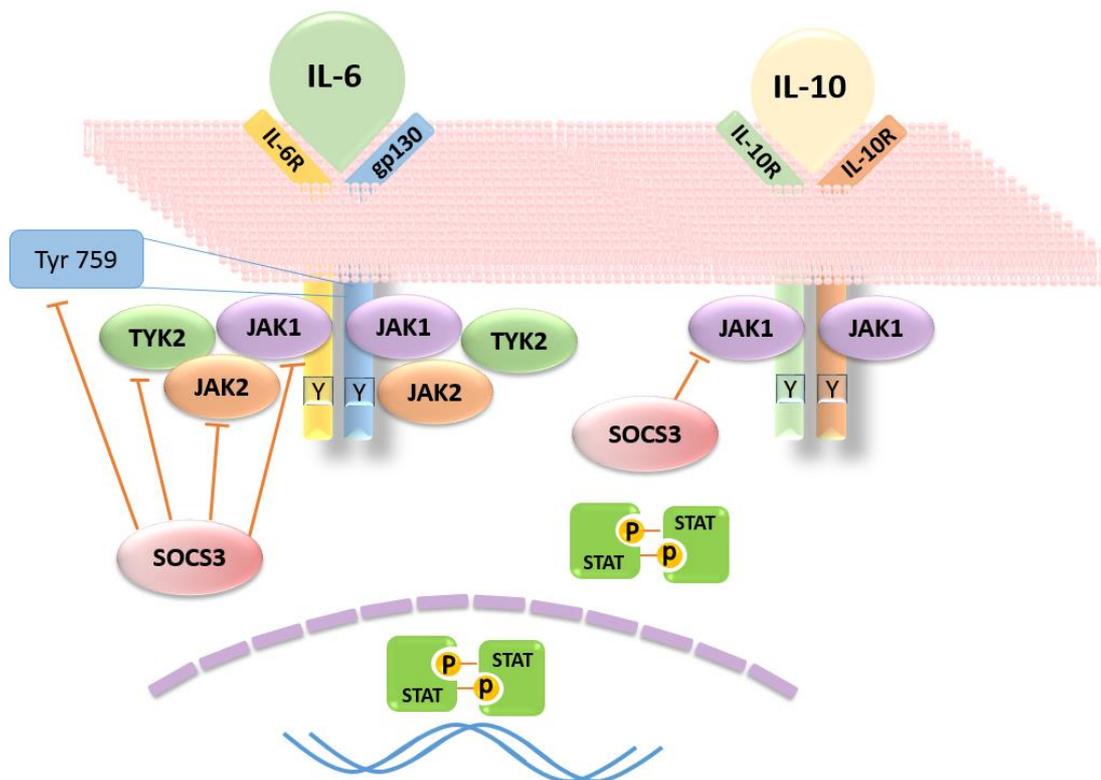


Figura 7. Vía de señalización de IL-6 e IL-10 a través de STAT3. La citocina IL-6 se une a su receptor compuesto por IL-6R α y gp130. Posteriormente se activan JAK1, JAK2 o TYK2 y promueven la fosforilación de STAT3. En contraste, el receptor de unión a IL-10 está compuesto por las subunidades IL-10RI y II, la primera se asocia a JAK1 y es la que participa principalmente en la señalización corriente abajo a través de STAT3. SOCS3 suprime directamente a JAK1, JAK2 y TYK2 bloqueando su capacidad enzimática del dominio JH1, además puede unirse a la tirosina fosforilada de la subunidad gp130 (Tyr759) inhibiéndola.

V. JUSTIFICACIÓN

El análisis y entendimiento de los mecanismos de evasión por *T. crassiceps* pueden ser utilizados contra patologías provocadas por reacciones exacerbadas del sistema inmune, principalmente sobre procesos inflamatorios, en los que intervienen diversos tipos de células de defensa así como diferentes citocinas.

Los efectos de la IL-6 e IL-10 en procesos de inflamación son bien conocidos, ambas citocinas se producen en altos niveles durante la infección por *T. crassiceps* y ejercen de manera importante sus efectos sobre los macrófagos, desde el reclutamiento de sus células precursoras (monocitos) y en su diferenciación o activación. Sin embargo, dado que su señalización depende de la vía JAK-STAT, principalmente mediante la activación de STAT3, no se conoce como ésta podría verse alterada durante la infección por *T. crassiceps*, por lo que es necesario su estudio para conocer más detalladamente los mecanismos de inmuno-modulación generados por éste helminto. Por otro lado, una vez demostrado que SOCS3 se induce por la infección pero no está involucrado en la modulación de la activación de STAT1, se considera que su participación en la respuesta inmune contra *T. crassiceps* podría estar relacionada con la activación del STAT3.

VI. HIPÓTESIS

En un modelo murino, la infección con *T. crassiceps* así como sus productos excretados/secretados, alterarán la fosforilación de la proteína STAT3 de macrófagos en respuesta al estímulo con las interleucinas 6 y 10.

VII. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el grado de fosforilación de la proteína STAT3 en macrófagos obtenidos de la infección murina con *Taenia crassiceps*.

Objetivos particulares

1. Determinar si la infección con *T. crassiceps* tiene algún efecto en los niveles totales del factor de transcripción STAT3 en macrófagos.
2. Determinar si la infección aguda y/o crónica con *T. crassiceps* altera la fosforilación de STAT3 en macrófagos frente al estímulo con IL-6 e IL-10.
3. Determinar si existen diferencias en la activación de STAT3 en macrófagos expuestos *in vitro* al antígeno TcES.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para el desarrollo de este trabajo se empleó un modelo murino de infección experimental con *T. crassiceps*. Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de alrededor de seis a ocho semanas de edad, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; donde se mantuvieron en condiciones estériles estándares durante el tiempo requerido hasta su sacrificio.

Los ratones fueron divididos aleatoriamente en tres grupos de cinco cada uno, conformando un grupo control al que no se le indujo la infección, un grupo de infección aguda con el parásito (dos semanas de infección) y finalmente un tercer grupo de infección crónica (ocho a nueve semanas de infección).

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

Infección experimental

La infección se indujo con la inoculación i.p. de 20 metacístodos de *T. crassiceps* (cepa ORF) utilizando como vehículo 0.5 ml de SSF. Los cisticercos se extrajeron previamente de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c con ocho a diez semanas de infección. Los parásitos se lavaron cuatro veces con SSF y se seleccionaron de acuerdo a su tamaño (no mayor a dos mm) y que no presentaran gemación.

Obtención y cultivo células de exudado peritoneal (PEC's)

Se colectó el exudado de células por lavado de la cavidad peritoneal de los tres grupos de ratones inyectando cinco a seis ml de SSF. El exudado obtenido se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, la pastilla se resuspendió y se agregó uno a dos ml de medio de cultivo RPMI completo (medio suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina/estreptomicina). La viabilidad celular se evaluó por exclusión con azul de Tripano y las células se contaron con una cámara de Neubauer. Las células se ajustaron a 5×10^6 células/ml y se sembraron en placas de seis pozos (Sarstedt) con un ml de medio RPMI. Se dejaron dos horas en la incubadora a 37 °C con un ambiente de CO₂ al 5 %, para permitir que los macrófagos se adhirieran a la placa de cultivo. Las PEC's adherentes fueron en su mayoría macrófagos (de acuerdo a la citometría de flujo >90 % F4/80⁺MHC-

II⁺). Una vez transcurrido este tiempo, se removieron las células no adherentes lavando las placas con medio RPMI y posteriormente se agregó medio de cultivo fresco y se mantuvieron en las mismas condiciones hasta la experimentación.

Aislamiento y diferenciación de macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM)

Se extrajeron los fémures y tibias de ratones BALB/c controles (sanos); los huesos se mantuvieron en SSF y posteriormente se desinfectaron en etanol al 70 % durante un minuto. Para la obtención de la médula ósea se cortaron las epífisis y los huesos se perfundieron con medio RPMI completo con una aguja 25G X 16 mm. El agregado celular obtenido se centrifugó a 1500 rpm por diez minutos. Se decantó y resuspendió la pastilla obtenida y se agregó dos ml de medio para realizar el conteo celular en la cámara de Neubauer. La concentración celular se ajustó a 5×10^6 células/ml en placas de seis pozos con medio de cultivo RPMI (3 ml) y se agregaron 20 ng/ml de M-CSF por ml de medio para la diferenciación celular. Se cultivaron durante siete días a 37 °C, se le agregó nuevamente el mismo volumen de M-CSF cada tercer día hasta completar tres estímulos. La diferenciación de células de médula ósea a macrófagos se cotejó mediante citometría de flujo (>79 % F4/80⁺).

Obtención del antígeno TcES y estímulo *in vitro*

Se obtuvieron los metacéstodos de *T. crassiceps* de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c con ocho a diez semanas de infección, se lavaron hasta cuatro veces con SSF y se incubaron por 24 horas en SSF a 37 °C en cámaras de cultivo (Sarstedt) y se recuperó el sobrenadante con las excreciones y secreciones de los parásitos, se centrifugó durante diez minutos a 5000 rpm. Posteriormente, las proteínas se concentraron por centrifugación en tubos AMICON (Millipore) con una membrana de corte de 50 kDa y se obtuvieron las moléculas de alto peso molecular (>50kDa), la concentración de proteína se determinó con método de Bradford y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Citometría de Flujo (FACS)

Una vez obtenidas las PEC's como se mencionó anteriormente, se contaron por exclusión con azul Tripano y se colocaron 1×10^6 células en tubos de FACS para citometría (BD Falcon). Se centrifugaron y resuspendieron en 50 μ l de buffer de FACS (0.5% azida de sodio y 1 % suero fetal bovino en PBS) con 0.5 μ l de anti-CD16/32 (Tonbo, Bioscience) y se mantuvieron a 4°C durante 15 min. Después se agregaron los Ab marcados con fluorocromos (Cuadro 1) utilizando 24.5 μ l de amortiguador de FACS por tinción, se

mantuvieron durante 30 minutos a 4 °C cubiertos de la luz. Se centrifugaron y se desecharon los sobrenadantes que contenían los restos de Ab libres. Se efectuó otro lavado con amortiguador de FACS y las pastillas se fijaron con paraformaldehído al 4%. En citómetro FACSCalibur se analizaron hasta 10 000 eventos por muestra para las células de los tres grupos de ratones y para BMDMs despegados. Los datos obtenidos se analizaron con el programa Flowing Software 2.4.0.

Cuadro 1. Anticuerpos utilizados para el análisis de citometría

Anticuerpo	Conjugado	Marca	Cantidad (µl)
CMH II	FITC	BioLegend	0.5
F4/80	APC	BioLegend	0.5
IL6-R	PE	BD Biosciences	1.0

FITC: isotiocianato de fluoresceína, APC: alofocianina, PE: ficoeritrina

PCR y ELISA

Posterior al conteo, las PEC's se sembraron en placas de seis pozos colocando 5×10^6 células/ml de células por pozo, diferenciando así tres pozos por grupo de ratón. Se incubaron por dos horas a 37 °C con un ambiente de CO₂ al 5 % y posteriormente se eliminaron las células no adherentes con lavados de SSF. Se agregó un estímulo diferente por pozo a cada grupo (Cuadro 2).

Las células se mantuvieron con este estímulo por 24 horas a 37 °C con un ambiente de CO₂ al 5 % y posteriormente se recolectaron los sobrenadantes para medición de producción de citocinas por ELISA y las células adheridas se lisaron con 600 µl de QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) por pozo, se almacenaron a -20 y a -70 °C respectivamente hasta su tratamiento.

Cuadro 2. Concentraciones utilizadas de las recombinantes de las interleucinas 6 y 10 para cada grupo

- I. RPMI solo
- II. IL-6 (20 ng/ml, PeproTech)
- III. IL-10 (20 ng/ml, PeproTech)

RT-PCR

Se procedió a la obtención de RNA del lisado de células en QIAzol, para ello se agregaron 200 μ l de cloroformo y se centrifugaron a 13500 rpm durante 15 minutos a 4° C. Luego se recuperó el material genético en otro tubo y se le agregó 500 μ l de isopropanol frío. Se centrifugó nuevamente a las condiciones antes mencionadas, la pastilla obtenida se resuspendió en etanol al 75% y se centrifugó de nuevo. Finalmente se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 20 μ l de H₂O Milli-Q (agua esteril). Se efectuó la cuantificación del material genético por espectrofotometría (Epoch) Abs 260 nm y posteriormente se realizó la electroforesis, utilizando geles de agarosa al 8 %, esto para comprobar la integridad del RNA. Una vez cotejada la integridad del material genético se realizó la conversión de RNA (1 μ g) a cDNA, para esto se utilizó el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas).

La amplificación de los genes correspondientes a las citocinas TNF α e IL-10 se evaluó con RT-PCR, utilizando 1 μ g de cDNA por reacción y el kit Amplificasa (BioTecMol) a las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial: a 94 °C por un minuto; posteriormente la desnaturalización, alineamiento y extensión: 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, temperatura correspondiente a T_m de cada gen por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos respectivamente. Las secuencias específicas para cada gen se presentan en el Cuadro 3. Los productos obtenidos se cargaron con 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific) y se corrieron en gel de agarosa al 1.5 % teñido con Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics Europe). Después el gel se analizó en el equipo BioSence Imager para visualizar el tamaño amplificado de las bandas.

Cuadro 3. Secuencias de primers utilizados en análisis de PCR

Gen	Secuencia	T _m (°C)
GAPDH	F: TCg gTg TgA ACg gAT TTg gC	56
	R: CTC TTg CTC AgT gTC CTT gC	
TNF α	F: ggC Agg TCT ACT TTg gAg TCA TTg C	59
	R: ACA TTC gAg gCT CCA gTg AAT TCg	
IL-10	F: ACC Tgg TAG AAg TgA TgC CCC Agg CA	56
	R: CTA TgC AgT TgA TgA AgA TgT CAA A	

F=Forward primer, R=Reverse primer

Detección y análisis de citocinas

La medición de citocinas en los sobrenadantes obtenidos se analizaron por la técnica de ELISA sándwich. Se detectó IL-6, IL-10 y TNF- α , dependiendo del ensayo. Se emplearon placas de 96 pozos MaxiSorp, las cuales fueron sensibilizadas previamente con 50 μ l del Ab de captura correspondiente diluido en PBS a una concentración de 2 μ g/ml, se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, luego de cuatro lavados con PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T), las placas se incubaron a 37 °C con una solución de BSA al 1 % en PBS por dos horas. Luego de tres lavados con PBS-T se agregó en cada pozo 100 μ l de los estándares y las muestras diluidas en PBS. Las placas se incubaron dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió al lavado con PBS-T y se agregó 100 μ l el Ab secundario biotinilado y se incubó por una hora a temperatura ambiente, se efectuaron cuatro lavados con PBS-T y el Ab secundario se detectó con sustrato de avidina o estreptavidina (HRP) 1:4000 en una solución de BSA al 1 % en PBS, añadiendo 100 μ l por pozo. La intensidad de color generado se analizó en el lector de ELISA Multiskan Ascent (Thermo Scientific) a 405 nm.

Para la determinación de las concentraciones de la citocina de interés en las muestras se generó una curva a partir de los valores de densidad óptica (DO) obtenidos para los valores conocidos de recombinante de la curva estándar.

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

Se hizo un lavado de las células con SSF a 37 °C 24 horas después del lavado de células no adherentes, luego se agregó 1 ml de medio RPMI sin suero a cada pozo y se mantuvieron en incubación por tres horas, posteriormente se efectuó el estímulo con IL-6 recombinante (20 ng/ml, PeproTech) e IL-10 (20 ng/ml, PeproTech) por 20 minutos a 37°C. Después de este tiempo se retiró el estímulo y se lisaron las células utilizando buffer de lisis frío (20mM Tris-HCl pH=8, 2mM EDTA, 137mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100 y 1% de inhibidor de proteasas/fosfatasa). Se colectaron los lisados, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y se mantuvieron a -70 °C hasta su análisis. Los macrófagos diferenciados de médula ósea fueron estimulados con 50 μ g/ml de los productos TcES durante tres días; después de este tiempo las células se lavaron, se estimularon y se obtuvieron las proteínas como se mencionó anteriormente.

Western blot

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

Inmunodetección. Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas en cámara húmeda Mini omniPAGE Sub Blot (Clever Scientific Ltd) a membranas de PVDF (Bio-Rad). Previamente, tanto el gel, la membrana como las almohadillas de transferencia fueron equilibrados en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20 %) y el proceso se llevó a cabo durante 100 min a 80 V. Para evaluar la eficiencia de la transferencia, las membranas se incubaron 5 min en una solución de Rojo Ponceau. El exceso de colorante se lavó con agua destilada.

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

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

Para probar otros anticuerpos las membranas fueron lavadas con Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) de 15-30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron nuevamente en el bloqueo.

Cuadro 4. Anticuerpos utilizados en Western blot.

Anticuerpo	Isotipo	Marca	Dilución
Anti- β -actina	Rabbit IgG	Biolegend	1:1000
Anti-STAT3 total	Rabbit IgG	Biolegend	1:500
Anti- STAT3 fosforilado en tirosina 705	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:2000
Anti-SOCS3	Mouse IgG2	Biolegend	1:5000
HRP Donkey anti-rabbit IgG	Donkey Ig	Biolegend	1:5000
HRP Goat anti-mouse IgG	Goat Ig	Biolegend	1:10000

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

Análisis de datos. El análisis estadístico se efectuó mediante la prueba estadística paramétrica de ANOVA para observar la presencia de diferencias significativas y prueba de Tukey para identificar los grupos entre los que hubo diferencias significativas (* $P < 0,1$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,01$; **** $P < 0,001$) con el programa GraphPad Prisma 6.

IX. RESULTADOS

Como primera parte de este trabajo, se evaluó la fosforilación de la proteína STAT3 frente al estímulo de IL-6 en macrófagos alternativamente activados (aaMΦ's), los cuales provenían del peritoneo de ratones BALB/c con ocho semanas de infección con *T. crassiceps*. Para establecer las condiciones adecuadas a las que se debía llevar a cabo la experimentación se realizaron curvas de tiempo de estimulación y concentración con IL-6 recombinante murina con la idea de descartar que en tiempos posteriores la fosforilación de STAT3 presentara un nivel semejante a la de los controles o que el manejo de otras concentraciones de la citocina fueran más eficientes. Como puede observarse en la figura 8, veinte minutos después de la adición de IL-6 a los macrófagos, se detectó claramente la señal de STAT3-P, en este mismo tiempo fue también donde se detectó la mayor fosforilación de STAT3 en los macrófagos de animales infectados por ocho semanas con *T. crassiceps*, ya que al dejar un mayor tiempo del estímulo con IL-6, no se registró un incremento en la señal (Fig. 8a). Con respecto a la mejor dosis de estímulo con esta citocina, observamos que con 20 ng/ml se obtuvo la mejor señal de fosforilación de STAT3 (Fig. 8b). Con base en estos datos, se determinó que la estimulación con IL-6 a una concentración de 20 ng/mL y durante 20 min fueron las condiciones óptimas para obtener la fosforilación de STAT3.

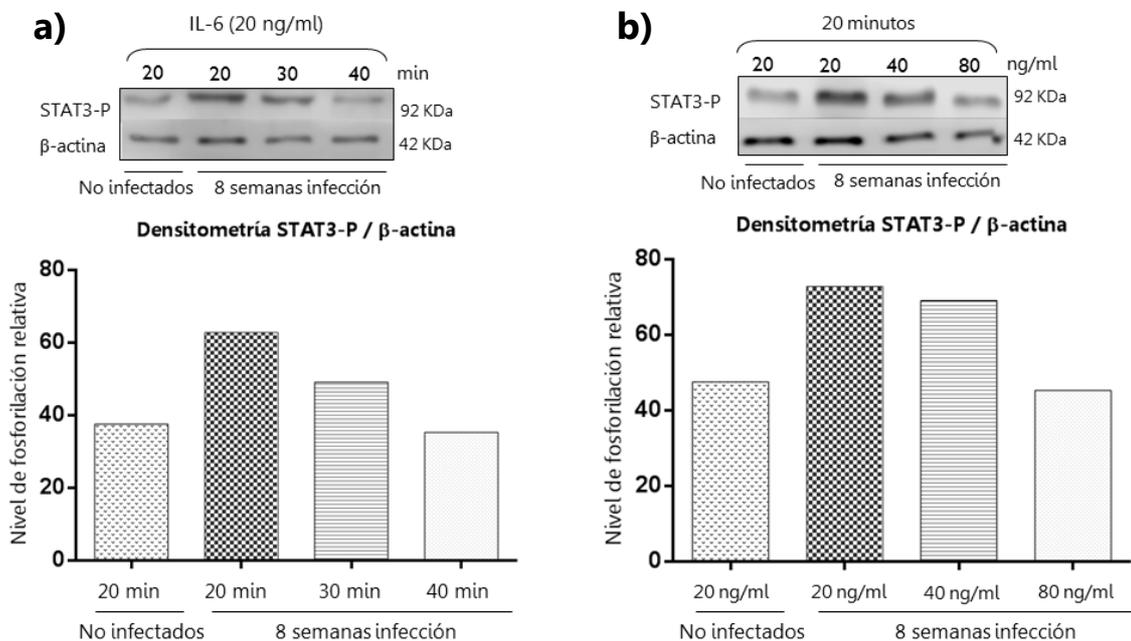


Figura 8. La concentración de 20 ng/ml de IL-6 durante 20 minutos fueron las condiciones óptimas para la experimentación. a) Macrófagos de peritoneo de ratones no infectados y con ocho semanas de infección con *Taenia crassiceps* fueron estimulados con 20 ng/ml de IL-6 durante 20, 30 y 40 min. b) Macrófagos de peritoneo de ratones no infectados y con ocho semanas de infección con *Taenia crassiceps* fueron estimulados con 20, 40 y 80 ng/ml de IL-6 por 20 min. Las proteínas β -actina y STAT3-P fueron analizadas en los lisados celulares por western blot.

La infección crónica con *Taenia crassiceps* induce aumento en la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-6 en macrófagos peritoneales.

Previamente se ha descrito que las infecciones con helmintos, como *T. crassiceps*, logran polarizar la respuesta inmune de un perfil Th1 a uno Th2 y dicha polarización se ve acompañada del cambio fenotípico de los macrófagos (Reyes y Terrazas, 2007), de clásicamente activados (caMΦ's) a los llamados alternativamente activados (aaMΦ's). Debido a que también se ven alteradas sus funciones y producción de citocinas, así como su respuesta a las mismas, es de esperarse que lo hagan de manera diferente, en este caso, frente al estímulo de IL-6. Por ello, una vez determinadas las condiciones antes descritas se efectuó el análisis de la fosforilación de STAT3 en macrófagos provenientes de ratones sanos y de ratones con infección crónica (Fig. 9a).

Los datos obtenidos indicaron que los macrófagos de animales sanos sin ningún estímulo presentaron un nivel de fosforilación basal de STAT3-P incluso por arriba de los niveles en macrófagos provenientes de ratones infectados, pese a esto no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, cuando los macrófagos fueron estimulados con IL-6 (20ng/ml), se observó que la fosforilación de STAT3 fue significativamente mayor en macrófagos que estuvieron en contacto con el parásito durante ocho semanas con respecto a los de ratones sanos (Fig. 9b), lo cual podría indicar que los aaMΦ's provenientes de animales infectados con *T. crassiceps* presentaron una respuesta incrementada a través de esta proteína transductora de señal.

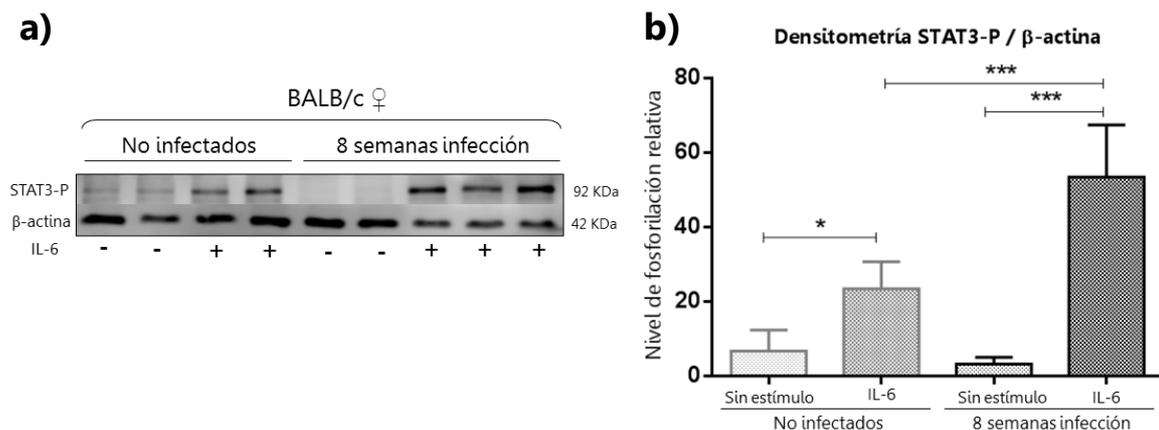


Figura 9. La infección crónica con *Taenia crassiceps* aumenta la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-6 en macrófagos peritoneales. a) Macrófagos peritoneales fueron tratados con IL-6 (20ng/ml) durante 20 min. Las células fueron lavadas y en lisados totales se determinó por western blot la presencia de STAT3 fosforilado y actina como control de carga. b) Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. * $P < 0,1$; *** $P < 0,01$ por ANOVA y post-test de Tukey.

El aumento de STAT3 fosforilada en respuesta a IL-6 no se debe a cambios en los niveles totales de STAT3

Una de las posibles causas de que exista una mayor activación de STAT3 frente al estímulo con IL-6 podría deberse a que la infección ejerciera un efecto regulador positivo, aumentando los niveles totales de la misma, dando como resultado un nivel mayor de fosforilación de esta proteína. Para evaluar esta posibilidad se analizaron los niveles totales de STAT3 mediante western blot en células peritoneales de ratones sanos e infectados (ocho semanas) (Fig. 10a). Al analizar la expresión de STAT3, observamos que los niveles totales de esta proteína no fueron alterados de manera significativa por efecto de la infección (Fig. 10b). Estos datos nos sugieren que una sobreexpresión de STAT3 no es un mecanismo que explique el aumento de la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-6 en macrófagos de animales crónicamente infectados con *T. crassiceps*.

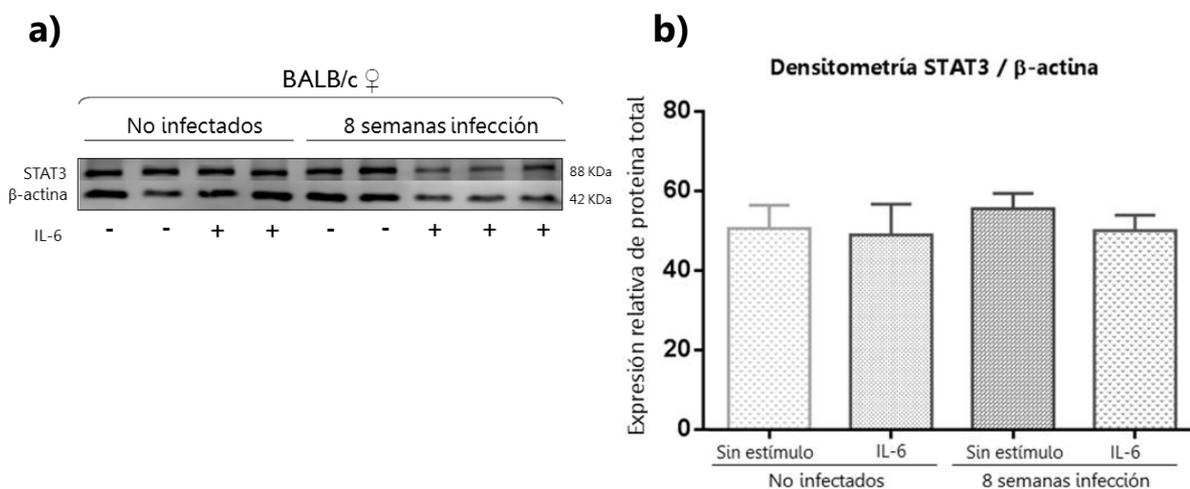


Figura 10. El aumento de la fosforilación de STAT3 frente a IL-6 no es por un aumento en los niveles totales de esta proteína. a) Las células fueron tratadas con IL-6 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó por western blot la presencia de STAT3 total y actina como control de carga. b) Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

El aumento en la fosforilación de STAT3 frente a IL-6 no se debe a mayor expresión del receptor IL-6R α en macrófagos

Existen diferentes factores que pueden influir sobre la respuesta de activación de las vías de señalización. Los mayores niveles de activación de STAT3 podrían ser una consecuencia de eventos previos a este punto, como la unión de IL-6 a su receptor, y las posibilidades de que éste se encuentre expresado en mayor proporción influenciado por la infección con *T. crassiceps* son altas. Por ello se efectuó un análisis de la expresión de este receptor en superficie de células totales de peritoneo de animales sanos y provenientes de ratones con dos y ocho semanas de infección, con la finalidad de detectar posibles cambios de acuerdo al transcurso de la infección. Como se trabajó con células totales de peritoneo, se caracterizó la expresión de diferentes marcadores de superficie (CMH II y F4/80) para identificar a la población celular que correspondiera a los macrófagos. Por citometría de flujo, se observó que el receptor IL-6R α con respecto al marcador F4/80 fue expresado aproximadamente en un 6 al 7 % de células de ratones sin infección presentes en el área seleccionada según el tamaño y la granularidad (Fig. 11a), por su parte, las células de dos semanas de infección mostraron alrededor del 12 % de dicho receptor y del 1-2 % de la expresión en las células de infección crónica. También se analizó la expresión de F4/80 con respecto al marcador CMH II. Como se observa en la figura 10b, alrededor del 36 % de las células de animales sanos expresaron el marcador CMH clase II conjuntamente con F4/80. Con respecto a las células de infección aguda los marcadores CMH II y F4/80 se expresaron aproximadamente en un 42 % de la población. Alrededor de un 90% de las células de infección de ocho semanas expresaron ambos marcadores (Fig. 11b). Con base a esto, se evidenció que la infección sí indujo un incremento en la expresión de IL-6R α en membrana en etapas agudas de la infección, aunado a que la carga parasitaria fue menor y contrario a lo que se esperaba, los niveles de expresión del receptor no aumentaron a las ocho semanas de infección con el parásito, sino que declinaron hasta niveles por debajo de lo expresado en células de ratones sanos.

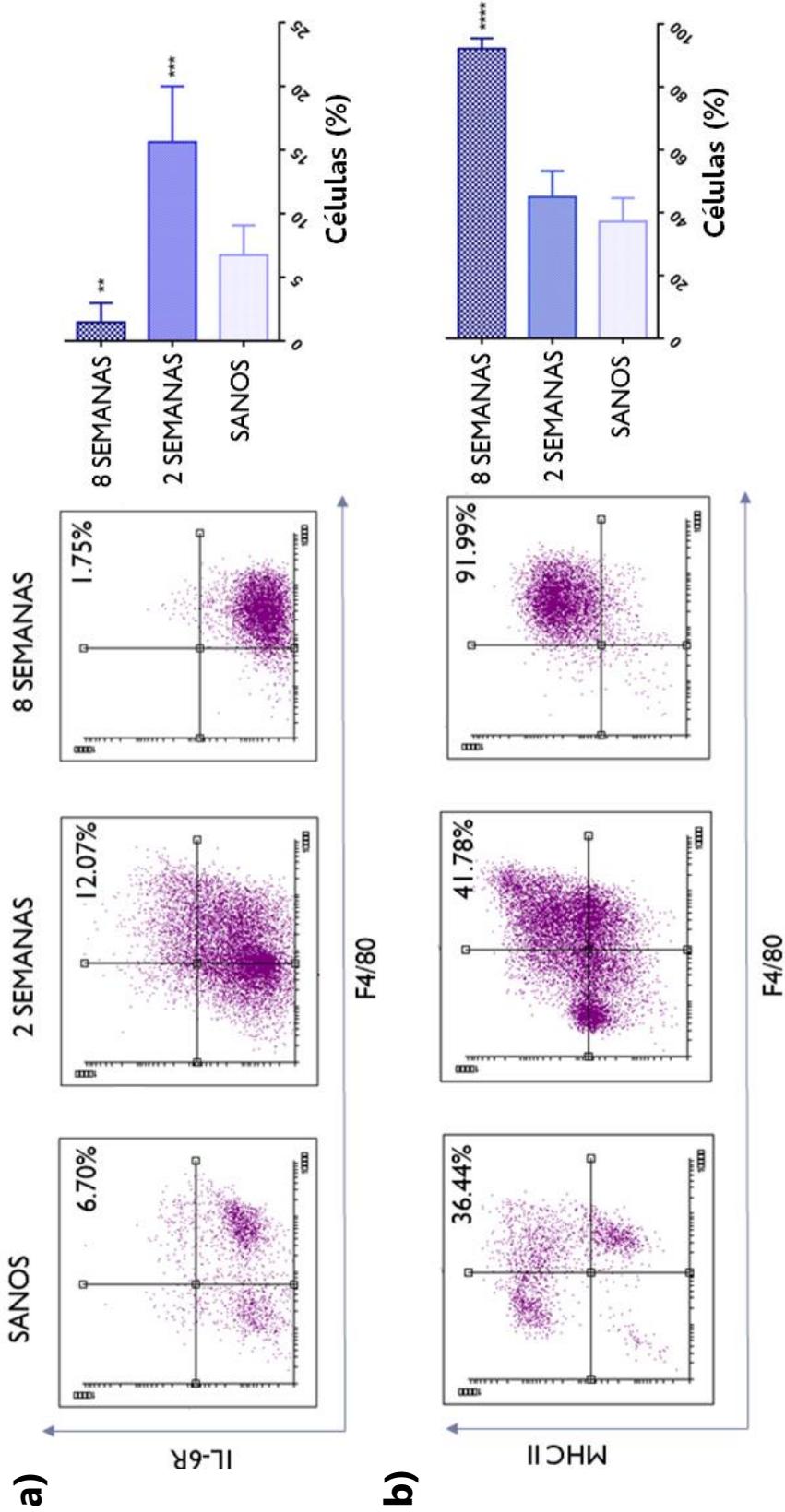


Figura 11. La infección aguda con *Taenia crassiceps* induce un incremento en la expresión de IL-6Rα. Por citometría de flujo se analizó el porcentaje de células totales de peritoneo de ratones sanos, con dos y con ocho semanas de infección que expresaron los marcadores de superficie a) F4/80 y el receptor para IL-6 (IL-6Rα) y b) F4/80 con el marcador del CMH II. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. **P<0,05, ***P<0,01, ****P<0,001 por ANOVA y post-test de Tukey

La infección crónica con *Taenia crassiceps* también incrementa la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-10.

Otro motivo por el cual se vió aumentada la respuesta de STAT3 podría ser porque la infección crónica con este parásito promueve que esta vía en particular se vea potenciada de manera generalizada y la forma de evaluarlo sería llevando a cabo la estimulación de los macrófagos con otra citocina que compartiera la misma vía de señalización. Se decidió investigar la respuesta a IL-10, la cual es una citocina de papel regulador en la respuesta inmune, es producida por macrófagos en altas concentraciones y utiliza la vía de señalización STAT3 para sus efectos biológicos sobre los macrófagos, por tal motivo se utilizó IL-10 para evaluar este posible supuesto. Se efectuaron experimentos similares a los anteriores y se encontró que los macrófagos de ratones sanos presentaron una mayor capacidad de respuesta a IL-10 con respecto a IL-6, aun cuando ambas citocinas utilizan la misma vía de señalización (Fig. 12a). Además, éste aumento de fosforilación fue significativamente mayor en los macrófagos de ratones crónicamente infectados con *T. crassiceps* con respecto a los controles o infectados sin algún tipo de estímulo (Fig. 12b). Esto sugiere que la infección con este helminto utiliza como un mecanismo de evasión la potencialización de la activación de STAT3, principalmente para la acción de la citocina reguladora IL-10, pero no a través de la inducción de una mayor producción de la proteína total.

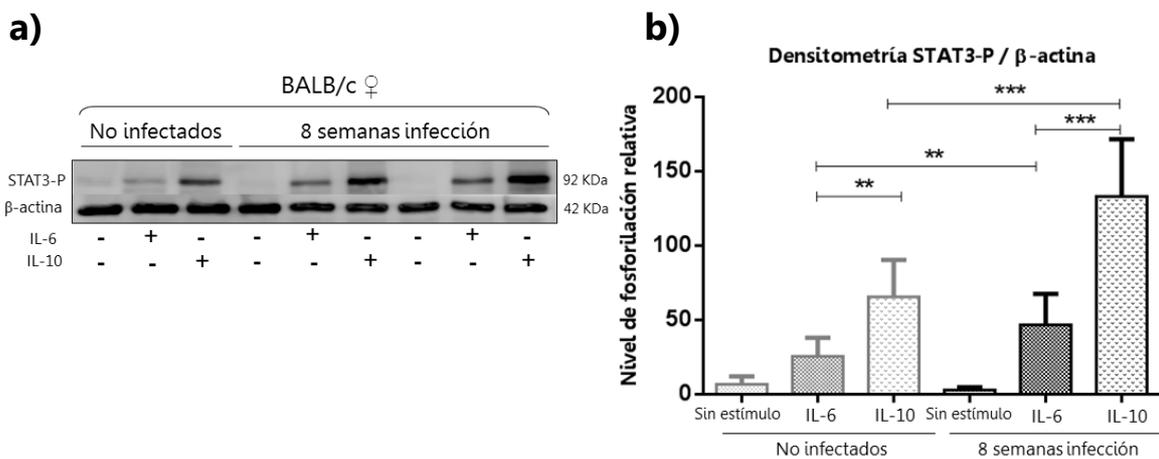


Figura 12. La infección crónica con *Taenia crassiceps* también aumenta la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-10. a) Las células obtenidas de la cavidad peritoneal fueron tratadas con IL-6 e IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó por western blot la presencia de STAT3 fosforilado y actina como control de carga. b) Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. ** $P < 0,05$; *** $P < 0,01$ por ANOVA y post-test de Tukey.

La infección crónica con *Taenia crassiceps* induce la sobreexpresión de la molécula supresora SOCS3 en macrófagos peritoneales

Dentro de la vía de señalización JAK-STAT existen aquellas proteínas que se encargan de regular su activación, por ejemplo las proteínas SOCS (Yoshimura *et al.*, 2007), así una causa probable del aumento en la fosforilación de STAT3 podría tener su origen en que ésta proteína no esté siendo controlada y que esté constantemente activa. El motivo podría estar en la poca expresión de alguna de estas moléculas supresoras, como lo es SOCS3, la cual, como se mencionó anteriormente, tiene la capacidad de unirse directamente a las Janus cinasas que permiten la transcripción de señales hasta STAT3.

Estudios previos efectuados en el laboratorio se demostró que la infección experimental con *T. crassiceps* mantenía una sostenida expresión de esta molécula en macrófagos peritoneales, independientemente a cualquier estímulo (Becerra y Terrazas, 2014), aquí se analizó su expresión en función de IL-6 e IL-10, con el fin de comprobar si el estímulo con estas citocinas tenía un efecto diferente en la expresión de SOCS3 en macrófagos provenientes de la infección crónica. Se observó que los macrófagos de ratones controles presentaron niveles basales de esta molécula y el estímulo con las diferentes citocinas no indujo una mayor expresión de la misma, por el contrario, SOCS3 se detectó ligeramente disminuida con respecto a las células provenientes de infección sin el estímulo con IL-10 (Fig. 13a) y aumentada con el estímulo con IL-6 (Fig. 13c); en ambos casos los datos no tuvieron diferencias significativas. Por otro lado, se observó nuevamente que la proteína SOCS3 estaba altamente expresada en MΦ's provenientes de una infección crónica con el helminto, esta expresión sí representó diferencias significativas en relación a los macrófagos de ratones sanos (13b y d).

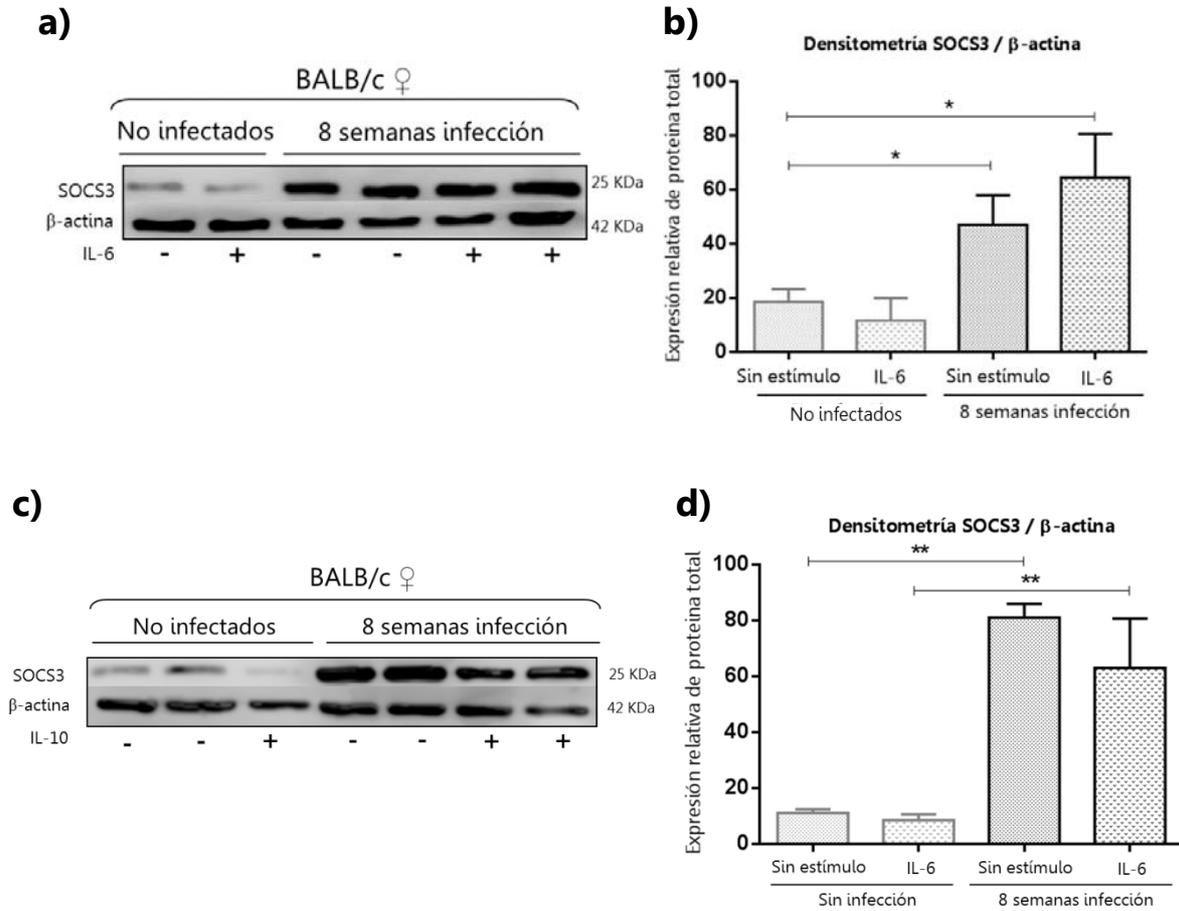


Figura 13. La infección crónica con *Taenia crassiceps* induce la sobreexpresión de la molécula supresora SOCS3 en macrófagos peritoneales. a) Macrófagos peritoneales fueron tratados con IL-6 (20ng/ml) y c) con IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó por western blot la presencia de SOCS3 y actina como control de carga. b) Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga con el estímulo de IL-6 y d) con IL-10. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. * $P < 0,1$; ** $P < 0,05$; por ANOVA y post-test de Tukey.

La infección aguda con *Taenia crassiceps* incrementa la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-6 e IL-10 y la expresión de la proteína supresora SOCS3

Considerando los resultados observados en citometría de flujo y tomando en cuenta que los experimentos anteriores solo se habían efectuado en etapas crónicas de la infección, era importante saber si la activación de STAT3 se daba de la misma forma en etapas agudas de la infección, cuando la carga parasitaria es menor y existe un ambiente característico del perfil TH1 en el organismo. Por lo tanto, se obtuvieron células peritoneales de ratones sanos y con dos semanas de infección y se sometieron a las mismas condiciones de experimentación para las células de infección crónica.

Por análisis en western blot, se encontró que la fosforilación de STAT3 es significativamente mayor en respuesta a IL-10 en las células de ratones sanos (Fig. 14a), sin embargo la respuesta a IL-6 e IL-10 se incrementó en los macrófagos de ratones con dos semanas de infección, siendo significativamente mayor para la IL-10 (Fig. 14b), lo que representó un fenómeno similar a lo observado en las etapas crónicas de la infección.

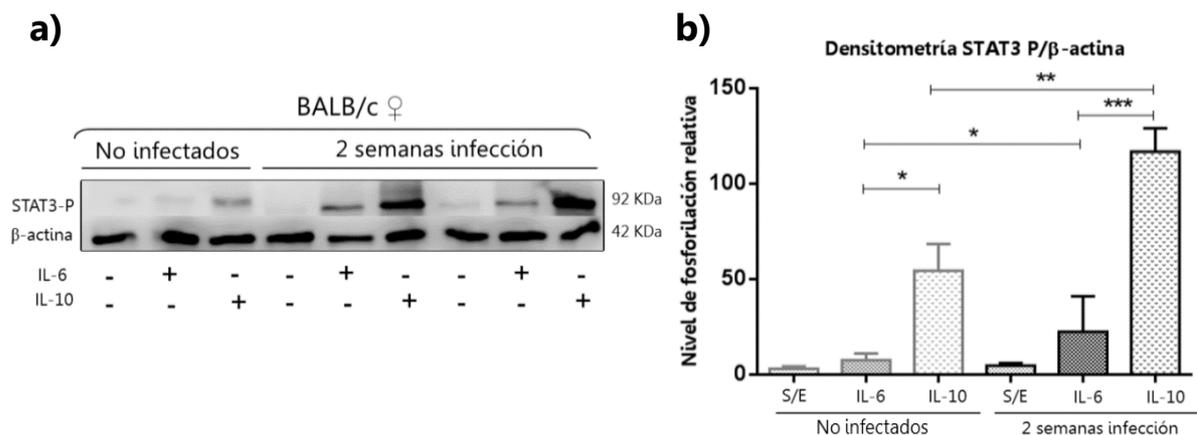


Figura 14. La infección aguda con *Taenia crassiceps* también incrementa la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-6 e IL-10. a) Células provenientes de ratones sanos y con dos semanas de infección con *Taenia crassiceps* fueron estimuladas con IL-6 e IL-10 (20ng/mL) durante 20 min. Se determinó la presencia de STAT3 fosforilado y actina como control de carga por western blot. b) Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. *S/E=sin estímulo. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. * $P < 0,1$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,01$ por ANOVA y post-test de Tukey.

En relación a la expresión de SOCS3, el comportamiento de activación de esta molécula supresora fue muy parecido a lo inducido por *T. crassiceps* a las ocho semanas de infección, es decir, que la molécula fue ligeramente expresada en células de ratones sanos y que en función al estímulo con IL-6 o IL-10 no se elevaron sus niveles, por lo menos no a los 20 min del estímulo con ambas citocinas. También se observó la concomitante sobreexpresión de SOCS3 en macrófagos peritoneales de ratones con dos semanas de infección sin que se produjeran cambios significativos frente a los estímulos con IL-6 o IL-10 (Fig. 15a y b). Así que el efecto del parásito para promover los altos niveles de expresión de SOCS3 inicia desde las etapas agudas de la infección.

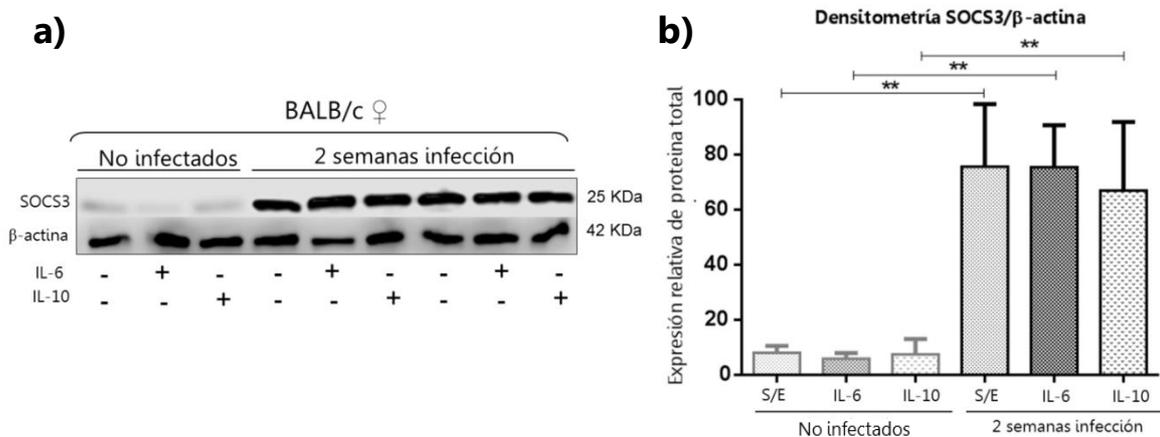


Figura 15. La infección aguda con *Taenia crassiceps* también aumenta la expresión de SOCS3. a) Macrófagos de ratones sanos y con 2 semanas de infección con *T. crassiceps* fueron estimulados con IL-6 e IL-10 (20ng/mL) durante 20 min. Se determinó la presencia de SOCS3 y actina como control de carga por western blot. b) Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. *S/E=sin estímulo. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. **P<0,05 por ANOVA y post-test de Tukey.

La infección con *Taenia crassiceps* no induce cambios importantes en la expresión de ARNm de las citocinas IL-10 y TNF α

Una vez fosforilada la proteína STAT3 tiene la capacidad de dimerizar a través de su dominio SH2 con otra STAT3 fosforilada o con STAT1, haciéndose competente para translocar hacia el núcleo celular y poder interactuar con secuencias específicas de ADN, activando genes específicos. Por ello, la fosforilación y activación de STAT3 se puede ver reflejada en los efectos que induce corriente abajo, es decir, en la expresión de ARN mensajeros específicos. Con la finalidad de estudiar la capacidad del *T. crassiceps* para promover la expresión de ARNm a tiempos agudos y crónicos, se analizó el nivel de expresión de las citocinas IL-10 y TNF α en macrófagos de ratones sanos e infectados de dos y ocho semanas con estímulos de 24 h con IL-6 e IL-10 ((Fig. 16a).

Los niveles de ARNm de IL-10 mostraron una tendencia a aumentar en respuesta a IL-6 e IL-10 en células de ratones infectados, sin embargo no se mostraron diferencias significativas en los diferentes grupos (Fig. 16b). La expresión de TNF α a nivel de ARNm tampoco presentó diferencias significativas, a excepción de los niveles de TNF α en el grupo de macrófagos de ratones con dos semanas de infección con el estímulo de IL-6, donde aumentaron significativamente (Fig. 16c).

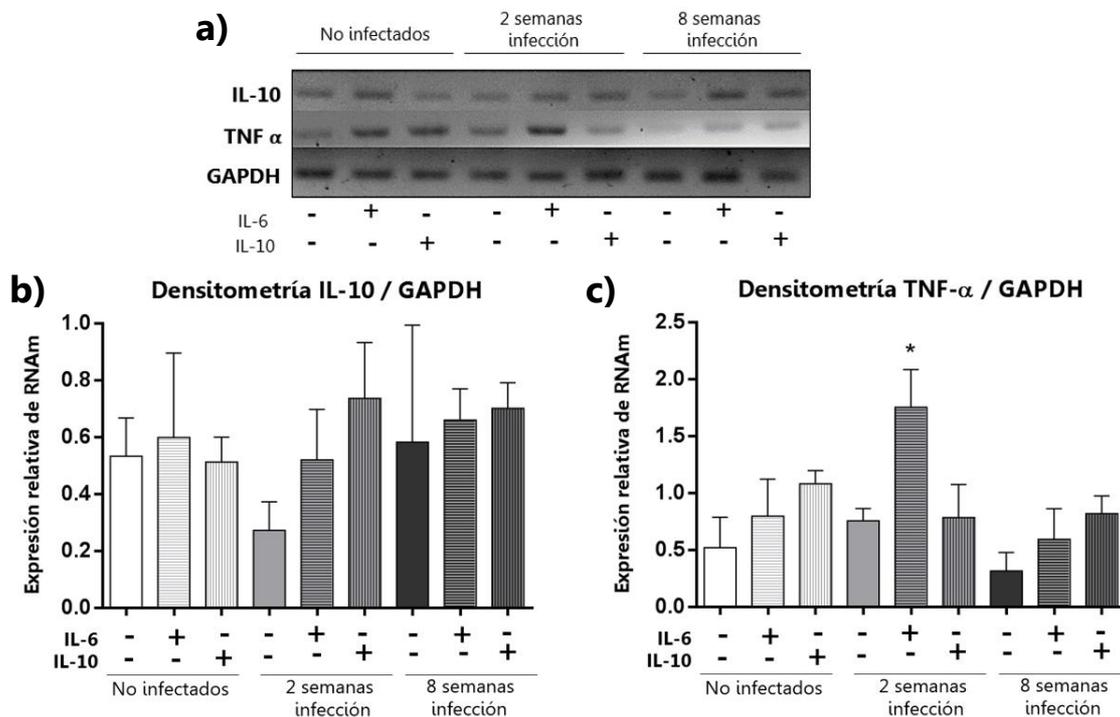
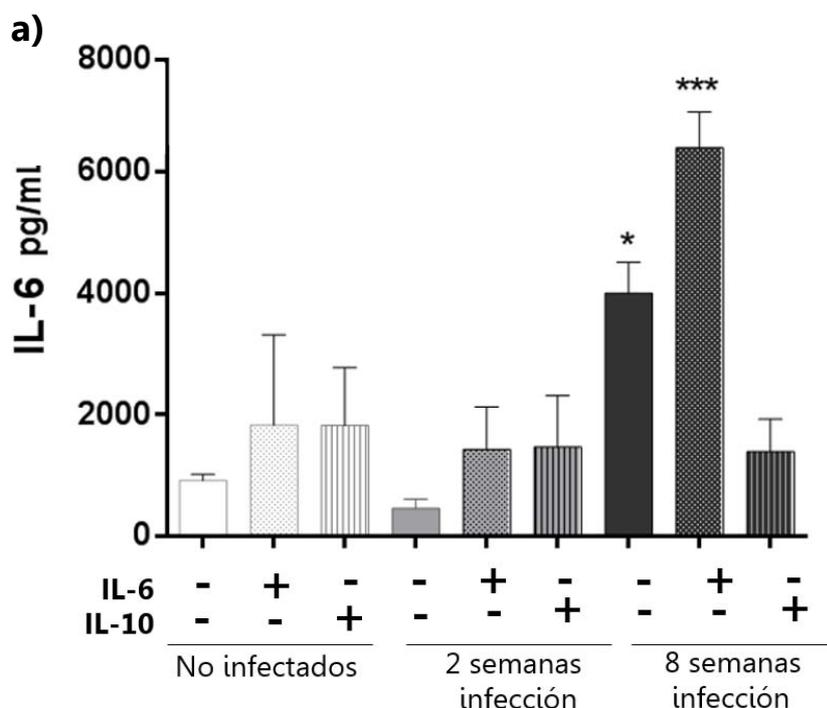


Figura 16. Expresión génica de IL-10 y TNF α por PCR en macrófagos. a) Niveles de expresión de ARNm de IL-10 y TNF α en macrófagos procedentes de ratones sin infección, con dos y ocho semanas de infección. b y c) Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga (GAPDH). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. *P<0,5 por ANOVA y post-test de Tukey

La infección con *Taenia crassiceps* modula la producción de IL-6, IL-10 y TNF α durante el tiempo de infección

La expresión de ARNm específicos no implica que se complete el proceso de traducción de la proteína para la cual codifican. Por ello, también fue importante analizar la producción de citocinas, la cual está finamente regulada en los macrófagos. Luego del tratamiento con los distintos estímulos durante 24 h analizamos la secreción de las citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF α así como la citocina antiinflamatoria IL-10.

Como se puede observar en la figura 17, los macrófagos de ratones sanos sin y con estímulos no presentaron cambios importantes en la producción de estas citocinas. Los macrófagos de animales con dos semanas de infección sin estímulo no produjeron niveles detectables de IL-10, sin embargo sí se detectaron niveles basales de IL-6 y un aumento significativamente mayor de TNF α . Por otro lado, los macrófagos provenientes de ratones con ocho semanas de infección sin estimular produjeron una mayor concentración de IL-6 con respecto a los macrófagos controles, el estímulo de IL-6 aumentó significativamente la liberación de IL-6 y con IL-10 disminuyó su concentración. En contraste, frente al estímulo de IL-10 se observó una marcada inducción de IL-10 en estas células y descendió significativamente la producción de TNF α .



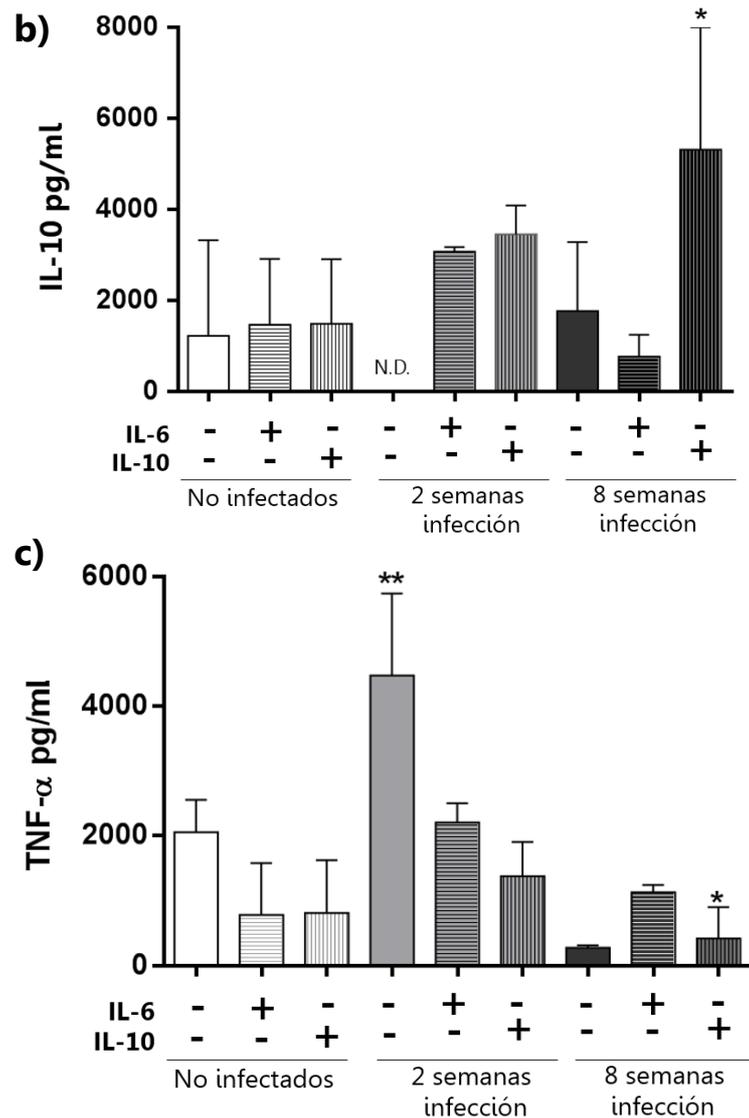


Figura 17. La infección con *Taenia crassiceps* modula la producción de IL-6, IL-10 y TNF α en macrófagos peritoneales murinos. 5×10^6 células/ml fueron incubadas en ausencia o presencia de IL-6 (20ng/ml) e IL-10 (20ng/ml), ambos durante 24 h. En los sobrenadantes de cultivo se midió a) IL-6, b) IL-10 y c) TNF α por ELISA. ND: no detectado. Los resultados están expresados como media \pm de tres experimentos independientes. * $P < 0,1$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,01$ por ANOVA y post-test de Tukey.

Efecto de los productos de excreción/secreción de *Taenia crassiceps* (TcES) sobre BMDMs en un modelo de cultivo *in vitro*.

Desarrollo y caracterización de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM).

Los macrófagos se caracterizan por ser un tipo celular muy heterogéneo (Gordon *et al.*, 2014). Los BMDM murinos pueden ser identificados por la expresión del marcador de superficie F4/80 (Gordon y Martínez, 2010). Por lo tanto, el siguiente objetivo de este trabajo fue caracterizar la diferenciación de macrófagos a partir de células de médula ósea murina siguiendo el método descrito por Dorrington (2011), con algunas modificaciones.

Luego del cultivo de las células de médula ósea en presencia de M-CSF durante 7 días, se caracterizó el porcentaje de células compatibles con macrófagos por citometría de flujo. Se seleccionó la región para análisis, que contenía las células grandes y granulosas con respecto a los BMDM (Fig. 18a). Observamos que el número de células F4/80+ cambió a lo largo del tiempo, el marcador F4/80 fue expresado en aproximadamente un 79.25 % de células presentes en el área seleccionada según tamaño y granularidad. También se observó que de las células en cultivo durante 7 días sin estímulo con M-CSF, sólo el 53.11 % expresaron el marcador F4/80. En contraste, las células de médula ósea recién extraídas, sólo el 0.38% mostraron dicho marcador (Fig. 18b). Este incremento fue acompañado con el cambio fenotípico de las células ya que presentaron características morfológicas típicas de los macrófagos, como las extensiones por adherencia en la superficie celular (Fig. 18c).

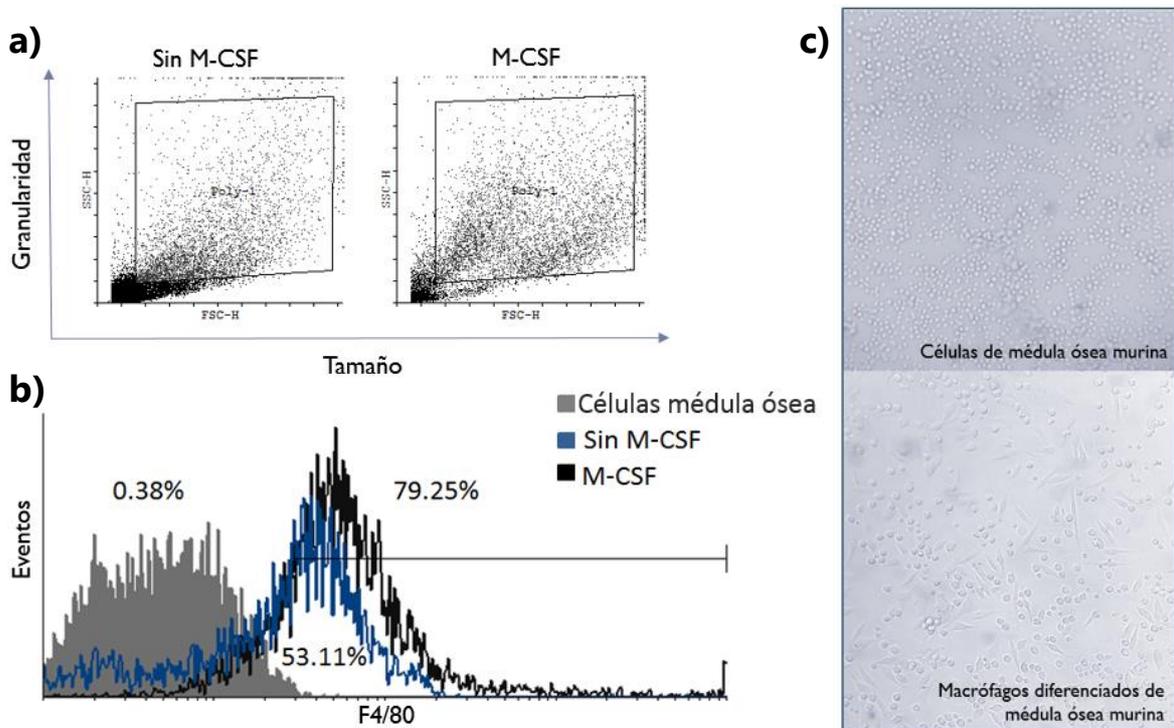


Figura 18. Caracterización del fenotipo de BMDM, obtenidos tras siete días de cultivo en presencia de M-CSF. a) Región analizada por citometría de flujo, que contiene células grandes y granulosas con respecto a los BMDM. b) Se analizó el perfil de expresión de la molécula de superficie F4/80 por citometría de flujo. Las células fueron marcadas con anticuerpo monoclonal conjugado al fluorocromo APC. El histograma negro representa el perfil de expresión del marcador F4/80 para las células con M-CSF por 7 días. El histograma azul muestra la intensidad de fluorescencia de células sin estímulo con M-CSF en cultivo por 7 días y el histograma gris representa a las células de médula ósea. c) Morfología de células de médula ósea de ratón y macrófagos diferenciados de médula ósea (BMDM) tras siete días de cultivo. El presente es un experimento representativo de tres.

Estudios previos han demostrado que los antígenos de *T. crassiceps* tienen un efecto modulador en la respuesta inmune al ser capaz de modificar la respuesta de ciertas poblaciones celulares, tal es el caso de células dendríticas diferenciadas de médula ósea (Reyes *et al.*, 2010; Terrazas *et al.*, 2013). Para determinar la importancia y el papel de los productos de excreción/secreción de *T. crassiceps* en macrófagos diferenciados de médula ósea, se diseñó un modelo de cultivo *in vitro* para simular el efecto del parásito sobre macrófagos de peritoneo a las 8 semanas de infección. Por lo que fue necesario obtener el antígeno de *T. crassiceps*, como se mencionó previamente en la metodología, y evaluar si las proteínas que lo constituían se encontraban intactas.

La siguiente imagen muestra las bandas correspondientes al corrimiento electroforético de las proteínas obtenidas de los productos de excreción-secreción de *T. crassiceps*, esto con la finalidad de poder presenciar la integridad de las mismas (Fig. 19).

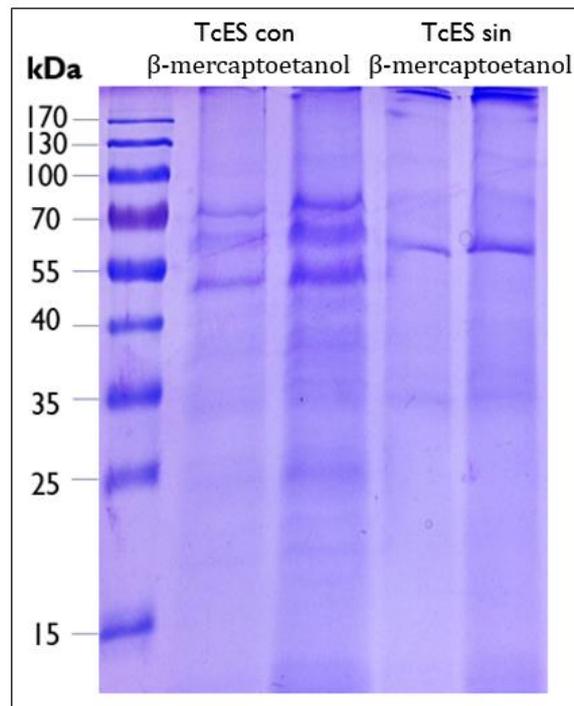


Figura 19. Corrimiento electroforético de las proteínas que componen los productos de excreción/secreción de *Taenia crassiceps* (>50 kDa). Los cisticercos de *Taenia crassiceps* recientemente extraídos fueron cultivados en SSF e incubados 37°C de 24 a 48 hrs. Se recuperaron los sobrenadantes y se centrifugaron como se describió en el apartado de materiales y métodos. Posteriormente fueron analizados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% con 30 µg de proteína por carril

Los productos de excreción/secreción de *Taenia crassiceps* sobre BMDMs aumentan la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-10

El efecto modulador de los productos excretados-secretados de *T. crassiceps* sobre macrófagos y las proteínas STAT ha sido estudiado previamente en respuesta a IFN γ (Becerra y Terrazas, 2014), al igual que en células dendríticas derivadas de médula ósea en ausencia de STAT6 (Terrazas *et al.*, 2013), sin embargo no se han reportado los efectos que este antígeno pueda ejercer sobre macrófagos derivados de médula ósea ni como participa en la respuesta de STAT3. Una vez comprobada la integridad del antígeno, se quiso evaluar si el fenómeno observado en los macrófagos de peritoneo frente a la infección con *T. crassiceps* era reproducible en macrófagos diferenciados de médula ósea expuestos a los productos TcES, para ello se agregó 50 μ g/ml de los productos TcES a las células previamente diferenciadas *in vitro* durante tres días y posteriormente fueron estimuladas con IL-6 e IL-10 recombinantes murinas. Se pudo observar que la fosforilación de STAT3 frente a IL-6 en BMDMs expuestas previamente a los productos TcES fue similar a las células no expuestas al antígeno. Sin embargo, los BMDMs expuestos a los productos TcES presentaron un nivel de fosforilación de STAT3 mayor en respuesta al estímulo de IL-10 (Fig. 20a), mostrando diferencias significativas (Fig. 20b).

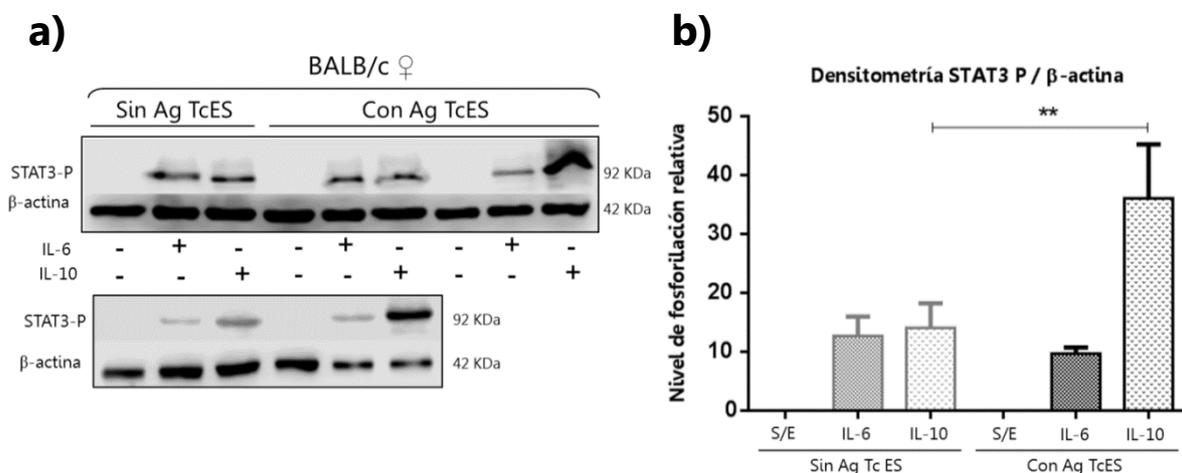


Figura 20. Los productos de excreción/secreción de *Taenia crassiceps* sobre BMDMs aumenta la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-10. Macrófagos diferenciados de médula ósea con M-CSF (20ng/ml) fueron expuestos por tres días con TcES (50 μ g/ml) y posteriormente estimulados con IL-6 e IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó la presencia de STAT3 fosforilado y actina como control de carga por western blot. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. *S/E=sin estímulo. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. **P<0,05; por ANOVA y post-test de Tukey.

La proteína supresora SOCS3 se expresa de manera general en los macrófagos diferenciados de médula ósea (BMDMs)

También se analizó la expresión de SOCS3 en respuesta a los antígenos de *T. crassiceps* y los estímulos de IL-6 e IL-10, esto en las mismas condiciones en las que se efectuó el ensayo anterior. Los niveles de expresión de esta proteína supresora se mostraron sobre-expresados en todos los grupos estudiados (Fig. 21a), no existiendo diferencias significativas (Fig. 21b). En este caso, el estímulo previo con M-CSF para diferenciar macrófagos de células de médula ósea fue el factor común, en todos los grupos, que posiblemente influyó en el incremento de la expresión de esta molécula. Esto nos impide presenciar un posible aumento en la expresión de SOCS3 frente a los antígenos TcES y/o en respuesta a los estímulos con las citocinas utilizadas.

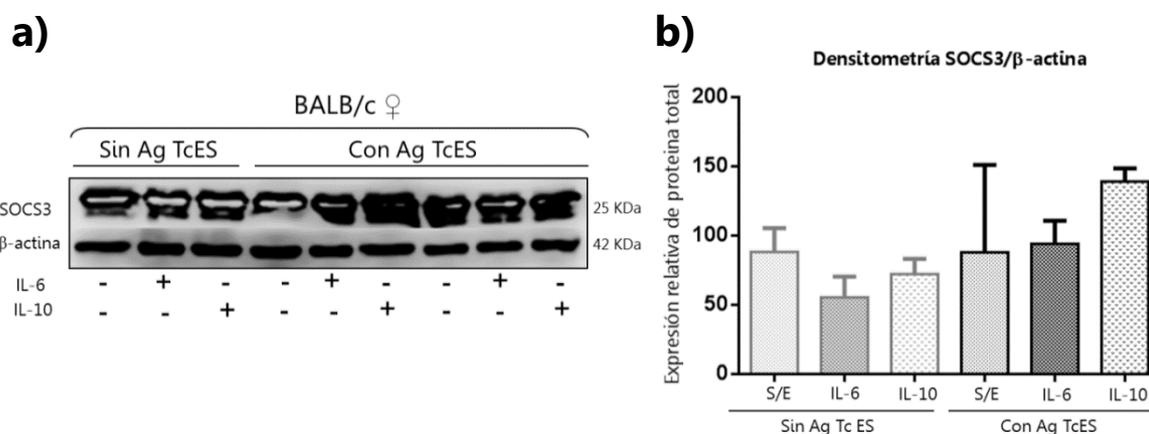


Figura 21. La proteína supresora SOCS3 es activada por el estímulo con M-CSF. a) Macrófagos diferenciados de médula ósea con M-CSF (20ng/ml) fueron estimuladas por tres días con los productos TcES (50 mg/ml) y posteriormente con IL-6 e IL-10 (20ng/ml) durante 20 min. Se determinó la presencia de SOCS3 y actina como control de carga por western blot. b) Se realizó un análisis densitométrico de las bandas, normalizando cada una con su respectivo control de carga. *S/E=sin estímulo. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

X. DISCUSIÓN

Existen múltiples evidencias que demuestran que, evolutivamente, los parásitos han desarrollado numerosas estrategias de evasión contra los mecanismos de defensa de su hospedero, lo que favorece el éxito de su persistencia en un organismo inmunocompetente. En general, se ha observado que las infecciones causadas por parásitos helmintos desencadenan una respuesta inmune que polariza a un perfil de tipo Th2 (Maizels *et al.*, 2009). En el caso particular de *T. crassiceps*, el cual se ha utilizado en el estudio de interacciones parásito-hospedero en la cisticercosis se observa el mismo comportamiento (Terrazas *et al.*, 2005; 2010). Estas variantes en la respuesta inmunológica también se han asociado a los cambios fenotípicos de los macrófagos frente a los cambiantes microambientes que se presentan en el organismo frente a la defensa contra los parásitos y sus antígenos.

Comúnmente se han considerado a los macrófagos como una de las principales poblaciones de células efectoras, responsables de responder frente a invasiones parasitarias (Maizels *et al.*, 2004). Esto no se basa solo en su capacidad fagocítica y presentación de antígenos, sino también en el gran potencial que tienen como células productoras de citocinas pro y antiinflamatorias, así como en su respuesta ante las mismas.

El presente estudio se ha centrado en el análisis de los mecanismos de modulación que ejerce *T. crassiceps* sobre los macrófagos y su respuesta de activación a través de la vía JAK-STAT, específicamente en el transductor de señal STAT3. Las proteínas STAT se han identificado como factores de transcripción fundamentales en la señalización de prácticamente la mayoría de las citocinas. Previamente se han realizado estudios relacionados con la activación diferencial de macrófagos provenientes de animales infectados con *T. crassiceps*. Por ejemplo, la proteína STAT6 se catalogó como fundamental para la supresión de la respuesta inmune de tipo Th1 y en consecuencia fue necesaria para el control de la cisticercosis experimental murina (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002), o en el caso de ratones deficientes de la molécula STAT4, que no desarrollaron una respuesta eficaz Th1, promoviendo una respuesta de tipo Th2 y dando lugar a ratones altamente susceptibles a la infección por este parásito (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2004). Recientemente, Becerra y Terrazas en el 2014, investigaron esta relación entre la vía JAK-STAT y la infección murina con *T. crassiceps* y sus productos excretados-secretados (TcES), enfocándose en la activación de STAT1 en respuesta a IFN- γ . Este trabajo demostró que *T. crassiceps* puede inducir un decremento en la fosforilación de STAT1 en poblaciones celulares distintas (macrófagos y esplenocitos), mientras que la actividad de STAT6 en

esas mismas poblaciones en respuesta a IL-4 estuvo sobreexpresada. Así aparentemente la infección y los TcES pueden modular de manera específica la vía JAK-STAT, sugiriendo una participación relevante de ésta vía en el establecimiento de *T. crassiceps*. Basado en lo anterior, se consideró importante estudiar la actividad de la proteína STAT3, que es la vía de transducción de señal de dos citocinas muy importantes en la infección por este helminto, que son IL-6 y la IL-10.

Para analizar la respuesta de activación de la molécula STAT3 en función de su fosforilación se desarrolló un modelo de infección crónica murina para trabajar con los macrófagos peritoneales. Una de las citocinas candidatas para evaluar la fosforilación de esta proteína fue IL-6, la cual activa STAT3 a través de la glicoproteína gp130 y JAK1, JAK2 y TYK2. La IL-6 es una citocina multifuncional que desempeña múltiples papeles tanto en las respuestas inmunes innatas y durante el desarrollo de la inmunidad adquirida contra los agentes patógenos invasores (Ahmed y Ivashkiv, 2000). Debido a esto las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de IL-6 (20, 30 y 40 ng/ml), las cuales son semejantes a las que se han manejado sobre macrófagos en otros estudios para fines similares (Fernando *et al.*, 2014; Niemand *et al.*, 2003). Por otro lado, la activación de las STATs es un proceso transitorio, por ello caracterizamos la activación de la vía de STAT3 a los 20, 40 y 60 min de tratamiento para establecer las condiciones óptimas para desarrollar todos los experimentos del presente trabajo. Se observó que la fosforilación de STAT3 fue breve y que tiempos posteriores a los 20 min de estímulo ésta fue en decremento, lo cual se explica con lo reportado para esta molécula, que en condiciones fisiológicas la activación de STAT3 tiene una duración, por lo general, de unos pocos minutos (Bromberg y Darnell, 2002) y en macrófagos de humanos ha alcanzado un máximo de 20-30 min después de la estimulación (Niemand *et al.*, 2003). Considerando esto y manteniendo las mismas condiciones de experimentación, se procedió a evaluar la respuesta a IL-6 en macrófagos peritoneales de ratones no infectados y con dos y ocho semanas de infección para analizar los niveles de fosforilación de STAT3.

El mecanismo usual con el que el macrófago responde a la IL-6 es a través de la fosforilación de STAT3, que fue lo observado en los macrófagos provenientes de ratones no infectados. La fosforilación basal observada de STAT3 en células de ratones sin estímulo puede deberse a bajos niveles citocinas que se encuentren en el medio circundante producidos por los macrófagos en las 24 h de reposo y que pudieran activar STAT3. Sin embargo, la respuesta de los macrófagos provenientes de animales con ocho semanas de infección fue significativamente mayor ya que observamos un aumento en su nivel de fosforilación frente a IL-6, siendo evidente en el análisis por densitometría. La

regulación positiva de la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-6 no se ha reportado anteriormente como un mecanismo favorecedor en infecciones por parásitos helmintos, no obstante se ha demostrado que células de bazo en cultivo con *Trypanosoma cruzi* aumenta la fosforilación de STAT3 frente al estímulo con IL-6 (Ponce *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, una posible explicación de los mayores niveles de fosforilación de STAT3 frente a IL-6 es que la infección ejerza un efecto regulador positivo, aumentando los niveles totales de STAT3. Esto se tomó en consideración ya que existen estudios con parásitos intracelulares como *Leishmania donovani* que, por el contrario, tienen la capacidad de regular negativamente los niveles de proteína total mediante su degradación en el proteosoma (Oliver *et al.*, 2005). Sin embargo, al analizar la expresión de STAT3, concluimos que los niveles totales de esta proteína no fueron alterados de manera significativa por efecto de la infección.

A raíz de estos resultados, se planteó la siguiente pregunta ¿Cuál es el mecanismo por el cual la infección con *T. crassiceps* potencia la respuesta de activación de STAT3 frente a IL-6? Para responder esta interrogante se dirigió la investigación al receptor de IL-6, dado que la regulación de activación podría estar dada previamente a la fosforilación de STAT3, es decir, en la recepción de la citocina. Para que esto sea posible el ligando (IL-6) debe unirse a su receptor correspondiente, el cual está compuesto por la subunidad alfa (IL-6R α) y la glicoproteína transmembranal gp130. Esta última es una subunidad común de los complejos receptores de citocinas pertenecientes a la familia de IL-6, que incluye a IL-11, IL-31, al factor inhibidor de leucemia (LIF), a oncostatina M (OSM), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), a cardiotrofina-1 (CT-1) y a la citocina similar a cardiotrofina (CLC) (Ahmed y Ivashkiv, 2000), así que se optó por analizar la expresión de IL-6R α en la membrana de los macrófagos, que representaba un receptor más específico para IL-6, además de que se expresa de manera restringida en células como hepatocitos, neutrófilos, monocitos/macrófagos y algunos linfocitos (Álvarez, 2009). Paradójicamente, los resultados mostraron que las células totales de peritoneo de ratones con infección de ocho semanas expresaron en menor medida el receptor IL-6R α que las células de ratones sanos y de dos semanas de infección. Esta subunidad del receptor tiene la particularidad de encontrarse en la superficie membranal o en forma soluble en ambientes inflamatorios, esto es posible gracias a dos procesos celulares, uno por splicing alternativo del ARN mensajero de IL-6R α , que da lugar a una variante que carece del dominio de anclaje a la membrana celular; otro es mediante rompimiento proteolítico de la membrana que libera al medio la forma previamente anclada a la membrana de células como neutrófilos o macrófagos (Peters *et al.*, 1998). Si el parásito regulara de alguna forma estos mecanismos

de producción de receptor soluble a largo plazo, se podría explicar la disminución de expresión del receptor en la membrana para IL-6 en células de animales de las dos a las ocho semanas post-infección, puesto que el receptor soluble aún tiene la capacidad de unirse a IL-6 circulante y, a diferencia de la mayoría de los casos en que los receptores solubles funcionan como inhibidores competitivos por el ligando, éste actúa como un agonista (Scheller *et al.*, 2006), de tal modo que si existieran altas concentraciones de este receptor soluble, aumentarían las probabilidades de fijarse a la citocina y así propiciar su señalización a través de la vía de STAT3. Por lo tanto, para descartar lo anterior sería necesario realizar nuevos ensayos enfocados en buscar la variante del receptor soluble de IL-6, tanto en el sobrenadante del cultivo de macrófagos como en el suero de animales infectados.

Retomando los mecanismos a nivel citoplasmático, para evaluar el posible supuesto de que la activación de STAT3 esté siendo potenciada por la infección con *T. crassiceps* se procedió a estimular macrófagos peritoneales de animales sanos y con postinfección aguda y crónica con IL-10, que además de IL-6, también juega un papel importante en la regulación del nivel de activación de STAT3, puesto que es la única vía de señalización que utiliza y en macrófagos peritoneales ambos inducen fuertemente la fosforilación de STAT3 (Moya *et al.*, 2011; Yakusawa *et al.*, 2003). Se pudo observar que la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-10 estaba por arriba de los niveles de fosforilación producidos por IL-6 en células de ratones sin infección, no obstante la inducida por IL-10 en STAT3 de macrófagos de ratones con infección aguda y crónica fue significativamente mayor. Esto nos demuestra que la activación de STAT3 no solo es potenciada por la infección, sino que responde de forma más eficiente a IL-10 desde las primeras dos semanas de infección. Incluso se podría descartar la posibilidad de que *T. crassiceps* induzca la fosforilación de STAT3 por sí solo, como en el caso de *Toxoplasma gondii* donde los parásitos vivos inducen una rápida activación y acumulación nuclear de STAT3 en macrófagos, independientemente a su estimulación con IL-6 e IL-10 ó a su deficiencia (Butcher *et al.*, 2005). Entonces ¿Cuáles son los factores que inducen una mayor fosforilación de STAT3 por IL-10?, o en su defecto, ¿Qué mecanismos son los que regulan negativamente la respuesta de IL-6 en contraste con IL-10?

Estudios previos demuestran que STAT3 cumple un papel importante en la actividad inmunoreguladora asociada a IL-10, incluyendo el control de su expresión (Benkhart *et al.*, 2000). Además, los mecanismos inmunoreguladores ejercidos por IL-10 se enfocan principalmente a la inhibición de varias respuestas de monocitos/macrófagos y neutrófilos, incluyendo la producción de IL-12, IFN γ , TNF α , NO, quimiocinas, y

prostaglandinas a través de bloqueo de la expresión de la ciclooxygenasa 2 (Berlato *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2002). Todos estos argumentos nos llevan a pensar que *T. crassiceps* esté favoreciendo la respuesta de STAT3 a IL-10 para desarrollar un ambiente propicio para su establecimiento, denotando el potencial regulatorio de esta citocina.

Dado que estudios anteriores en nuestro laboratorio muestran que la infección experimental con *Taenia crassiceps* mantiene una sostenida expresión de SOCS3 (Becerra y Terrazas, 2014), se evaluaron los niveles de esta proteína reguladora en función a IL-6 e IL-10 en macrófagos provenientes de ratones con infección aguda y crónica. Como se ha detallado en el capítulo de introducción; las proteínas SOCS regulan negativamente la señalización de las citocinas, siendo muy importantes para el adecuado progreso y finalización de una determinada respuesta inmune. En este caso, se pudo confirmar la sobreexpresión de esta proteína reguladora a causa de la infección, ya fuese en tiempos tempranos o tardíos de la infección, pero no se alteró en respuesta a las citocinas IL-6 e IL-10.

Para tratar de explicar la sostenida expresión de SOCS3 por la infección, podemos citar los mecanismos de regulación de esta proteína. Los niveles intracelulares de SOCS3 están fuertemente regulados por proteólisis. Una de las características de su dominio SH2 es la presencia de un motivo de alrededor de 35 aminoácidos, principalmente prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST). Los motivos PEST se estudiaron inicialmente en proteínas con altas tasas de renovación, probablemente porque estos estimulan la degradación vía proteasomal. La omisión de este motivo lleva al aumento de la vida media de SOCS3 incluso una vez que la señalización de citocinas ha cesado, sin afectar su capacidad de unión de péptidos con residuos tirosina fosforilados (Babon *et al.*, 2006). Por otro lado, es importante considerar que la regulación de la polarización de macrófagos está controlada en parte por la expresión de SOCS3, pues recientemente se ha descrito que la deficiencia de esta proteína induce el fenotipo $\text{caM}\Phi$'s y por lo tanto un ambiente proinflamatorio (Murray y Wynn, 2011). Así la estimulación temprana y sostenida de SOCS3 por *T. crassiceps* favorecería el sesgo al perfil alternativo de los macrófagos para propiciar el establecimiento en su hospedero y probablemente uno de los mecanismos moleculares que pueda manipular para este fin es la alteración de los motivos PEST en SOCS3. Las proteínas SOCS también pueden ser reguladas por los mismos miembros de la familia SOCS, como SOCS2, SOCS6 y SOCS7. Tal es el caso de SOCS2, que promueve la degradación vía proteasoma de SOCS1 y SOCS3, a través de su caja SOCS (Piessevaux *et al.*, 2006), por lo que probablemente un decremento de esta molécula (SOCS2) inducido por la infección también mantendría los altos niveles intracelulares de SOCS3.

Los altos niveles de SOCS3 inducidos por la infección por *T. crassiceps* también se pueden asociar con la diferente capacidad de activación de STAT3 con IL-6 e IL-10. La expresión de SOCS3 es altamente inducida por IL-10, pero ésta no actúa inhibiendo la señalización de dicha citocina (Lang *et al.*, 2003; Yasukawa *et al.*, 2003), si no que se requiere para bloquear la señalización de otros receptores de citocinas (O'shea y Murray, 2008). Así que los mecanismos de acción de SOCS3 subyacen en su capacidad selectiva y efectora sobre las moléculas que inhibe. Esta proteína se une específicamente a tirosinas fosforiladas de receptores de citocinas como el residuo fosforilado de tirosina 800 (Tyr800) de la subunidad $\beta 2$ del receptor de IL-12, el de Tyr985 del receptor de leptina y el de Tyr759 de la subunidad gp130 (Bjorbak *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2000), y enfatizando en éste último, podemos sugerir que SOCS3 participa como un supresor relativamente específico de IL-6.

Como se mencionó anteriormente, la señalización de IL-6 comienza con su unión al receptor IL-6R α y a la subunidad gp130, la cual se asocia con JAK1, JAK2 o TYK2, activándolas y promoviendo la fosforilación de STAT3. En contraste, el receptor de unión a IL-10 está compuesto por las subunidades IL-10RI y II, la primera se asocia a JAK1 y es la que participa principalmente en la señalización corriente abajo a través de STAT3. IL-10RII actúa como una subunidad accesoria que recluta una segunda cinasa, TYK2 (Niemand *et al.*, 2003; Nishihara *et al.*, 2007).

La proteína SOCS3 no inhibe la fosforilación de STAT3 mediada por IL-10 debido a que no se une a los receptores de IL-10. Por ello, IL-10 es capaz de inducir y potenciar la activación de STAT3, mientras que la activación de STAT3 mediada por IL-6 es débil y transitoria, además esto explica porque estas dos citocinas que señalizan a través de la misma vía tienen diferentes efectos en las células. Esto se respalda con los estudios efectuados por Yasukawa y col. (2003), que catalogaron a SOCS3 como un regulador esencial de gp130 en los macrófagos y que, incluso en ausencia de esta proteína reguladora en macrófagos, gp130 puede inducir una respuesta antiinflamatoria similar a la de IL-10R.

Por otra parte, se ha demostrado que SOCS3 puede unirse directamente a JAK1, JAK2 y TYK2 bloqueando su capacidad enzimática del dominio JH1 y actuando como un inhibidor no-competitivo (Babon *et al.*, 2012). Estas son las JAK sobre las que actúa específicamente la subunidad gp130, y que, si bien no es inhibida previamente en su residuo fosforilado de tirosina por SOCS3, lo puede hacer posteriormente a este nivel, evitando la transducción de señal hacia STAT3.

Anteriormente se había mencionado que la activación de STAT3 puede ser analizada a través de la respuesta que desencadena cuando transloca al núcleo celular y se une a secuencias específicas de ADN, esto hace referencia a la expresión de ARNm y su posterior codificación a proteína, que en este caso se vería reflejado en la producción de citocinas. En un principio, observamos que la interacción del parásito con los macrófagos peritoneales, ya sea a etapas agudas o crónicas de infección, no modificó los niveles de expresión basal de ARNm de IL-10 o TNF α aún frente al estímulo de IL-6 e IL-10, con la excepción de la inducción de la expresión de ARNm de TNF α por el estímulo de IL-6 a las dos semanas de infección. Esto podría deberse a que a las 24 h de estímulo con ambas citocinas el transcrito inducido por STAT3 ya se haya traducido a proteína. Por ello, un análisis complementario fue la medición de citocinas en los sobrenadantes de los macrófagos expuestos a los estímulos de IL-6 e IL-10.

Se ha reportado que IL-10 ejerce efectos reguladores sobre la producción TNF α e IL-6 en los macrófagos y que también regula su propia producción en monocitos (Takeda *et al.*, 1999), basados en esto, se pudo observar que los macrófagos, provenientes de infecciones agudas, que no produjeron niveles detectables de IL-10 presentaban niveles basales de IL-6 y un aumento en la concentración de TNF α , denotando la falta de regulación de IL-10 sobre estas citocinas. De manera opuesta, los macrófagos provenientes de ratones con ocho semanas de infección liberaron mayores concentraciones de IL-6 en respuesta al estímulo con la misma citocina y con IL-10 disminuyó su concentración. En contraste, frente al estímulo de IL-10 se observó una marcada inducción de IL-10 en estas células y descendió significativamente la producción de TNF α . Este comportamiento solo se observó en células de ratones infectados por lo que el parásito reguló positivamente la producción de la citocina inmunoreguladora IL-10 en etapas crónicas y se observó una mayor producción de citocinas proinflamatorias en etapas agudas. La producción de altas concentraciones de IL-6 por estímulo de la misma citocina es porque IL-6 induce la expresión del factor de transcripción denominado NF-IL6, que a su vez es un potente inductor de la expresión de IL-6 (Stephanou *et al.*, 1998).

El efecto de los productos excretados-secretados de *T. crassiceps* sobre los macrófagos diferenciados de médula ósea mostraron un fenómeno diferente en relación al estímulo con IL-6 e IL-10, ya que no se observó la misma respuesta de STAT3 frente al estímulo con IL-6 como en los macrófagos de peritoneo y la infección con este helminto. La fosforilación de IL-10 se vio reforzada con la exposición al Ag TcES. Conjuntamente, la expresión de SOCS3 en los BMDMs fue claramente observada, indistinto al grupo estudiado, es decir, que los mecanismos que indujeron esta sobreexpresión no se puede

atribuir a la exposición de los antígenos de *T. crassiceps* o a los diferentes estímulos, ya sea con IL-6 o IL-10.

Todos los efectos biológicos producidos por el M-CSF son mediados específicamente por el receptor M-CSFR, que es una glicoproteína transmembranal que pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa (RTK) de tipo III. El M-CSFR murino posee cinco dominios emparentados con los dominios de las inmunoglobulinas, de los cuales tres primeros tienen alta afinidad por el M-CSF. Su región citoplasmática tirosina quinasa se subdivide en cinco subdominios, una región cercana a la membrana; el sitio de unión de ATP en el dominio quinasa; la región de aminoácidos hidrofílicos insertados, conocida como KI (kinase insert); la región catalítica principal del dominio tirosina-quinasa y una región C terminal (C-tail). En la región KI están localizados tres lugares de fosforilación en tirosina, Y697, Y706 y Y721. El motivo Y (706) se ha relacionado con la activación de STAT1 y STAT3 (Comalada, 2002). Ya que la activación de ambas STATs promueven la expresión de SOCS3, esto podría explicar la sobreexpresión sostenida detectada de esta proteína supresora en los macrófagos diferenciados de médula ósea, que fueron estimulados previamente con M-CSF.

En conjunto, nuestros resultados indican que la infección con *Taenia crassiceps*, así como sus productos excretados-secretados, tienen efectos importantes en la activación de STAT3 en respuesta a IL-6 e IL-10 y que la proteína supresora SOCS3 posee un papel relevante en la modulación de dicha respuesta, lo que podría representar un mecanismo que este parásito utiliza para modular la respuesta inmune.

XI. CONCLUSIONES

1. La infección aguda y crónica con *T. crassiceps* induce un incremento de la fosforilación de STAT3 en macrófagos peritoneales en respuesta a IL-6 e IL-10, siendo mayor frente a esta última.
2. La infección crónica con *T. crassiceps* no altera los niveles totales de STAT3 en macrófagos peritoneales.
3. La proteína supresora SOCS3 es inducida por la infección aguda y crónica con *T. crassiceps* en macrófagos peritoneales.
4. La infección aguda y crónica con *T. crassiceps* regula la producción de citocinas frente al estímulo con IL-6 e IL-10.
5. La exposición a los antígenos TcES en BMDMs incrementa la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-10.
6. El estímulo de BMDMs con M-CSF induce la sobreexpresión de la proteína supresora SOCS3.

XII. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación mostraron que la infección con *T. crassiceps* induce un incremento en la fosforilación de STAT3 de macrófagos murinos, pero es necesario esclarecer y describir los mecanismos a través de los cuales se logró esto, así como estudiar otros fenómenos asociados. Algunas de las perspectivas a desarrollar para complementar este trabajo son:

1. Evaluar la fosforilación de STAT3 de manera diferencial en núcleo y citoplasma de macrófagos peritoneales de infección con *T. crassiceps*.
2. Analizar los niveles de las proteínas supresoras PIAS y SHP2 de macrófagos peritoneales de infección con *T. crassiceps*.
3. Determinar la fosforilación de STAT3 en macrófagos peritoneales expuestos a los productos excretados/secretados de *T. crassiceps in vitro*.
4. Medir la variante soluble del receptor de IL-6 en suero y en sobrenadantes de macrófagos peritoneales de animales infectados con *T. crassiceps*.
5. Analizar la expresión de SOCS2 en macrófagos peritoneales provenientes de la infección con *T. crassiceps*.
6. Inhibir la proteína supresora SOCS3 en macrófagos peritoneales y en macrófagos diferenciados de médula ósea expuestos a los productos excretados/secretados de *T. crassiceps* y analizar la fosforilación de STAT3.
7. Analizar los niveles de fosforilación de STAT1 en macrófagos peritoneales de infección y en macrófagos diferenciados de médula ósea expuestos a los productos excretados/secretados de *T. crassiceps*.
8. Analizar la proporción de homodímeros y heterodímeros de STAT3 y STAT1 formados en la señalización de IL-6 a través de la vía JAK-STAT.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Lichtman, A. & Pallai, S. (2006) *Inmunología celular y molecular*. 6ta ed. Elsevier, España. 552 p.
- Ahmed, S. T., & Ivashkiv, L. B. (2000). Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and STAT activation by inflammatory and stress pathways. *Journal of Immunology*. **165**(9): 5227-5237.
- Alexander, W. S. (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nature Reviews, Immunology*. **2**(6): 410-416.
- Álvarez, J. L. P. (2009). La interleucina 6 en la fisiopatología de la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*. **5**(1); 34-39.
- Arruda, G. C., Da Silva, A. D. T., Quagliato, E. M. A. B., Maretti, M. A., & Rossi, C. L. (2005). Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Tropical Medicine and International Health*. **10**(10): 1005-1012.
- Babon, J. J., Kershaw, N. J., Murphy, J. M., Varghese, L. N., Laktyushin, A., Young, S. N., Lucet, I. S., et al. (2012). Suppression of cytokine signaling by SOCS3: Characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. *Immunity*, **36**(2): 239-250.
- Babon, J. J., McManus, E. J., Yao, S., DeSouza, D. P., Mielke, L. a, Sprigg, N. S., Willson, T. a, et al. (2006). The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Molecular Cell*, **22**: 205-216.
- Becerra-Díaz, M. (2011). Signal transducers and activators of transcription (STAT) family members in helminth infections. *International Journal of Biological Sciences*. **7**(9): 1371-1381
- Becerra-Díaz, M., & Terrazas, L. I. (2014). *Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ . *International journal for parasitology*. **44**(9): 613-23.
- Benkhart, E. M., Siedlar, M., Wedel, A., Werner, T., & Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000). Role of STAT3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *Journal of immunology*. **165**(3): 1612-1617.
- Berishaj, M., Gao, S. P., Ahmed, S., Leslie, K., Al-Ahmadie, H., Gerald, W. L., Bornmann, W., et al. (2007). STAT3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast cancer research: BCR*, **9**(3): R32.
- Berlato, C., Cassatella, M. A., Kinjyo, I., Gatto, L., Yoshimura, A., & Bazzoni, F. (2002). Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *Journal of immunology*. **168**(12): 6404-6411.
- Bjørnbæk, C., Lavery, H. J., Bates, S. H., Olson, R. K., Davis, S. M., Flier, J. S., & Myers, M. G. (2000). SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(51), 40649-40657.
- Bromberg, J., & Wang, T. C. (2009). Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell*. 79-80

- Butcher, B. A., Kim, L., Panopoulos, A. D., Watowich, S. S., Murray, P. J., & Denkers, E. Y. (2005). IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *Journal of immunology*. **174**(6): 3148-3152.
- Carvalho, L., Sun, J., Kane, C., Marshall, F., Krawczyk, C., & Pearce, E. J. (2009). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. *Immunology*. **126**: 28-34
- Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Rozo, C., Bowdridge, S., Millman, A., Van Rooijen, N., et al. (2012). An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nature Medicine*. **18**(2): 260-266.
- Comalada, V. M. 2002. Decisiones en los macrófagos: proliferar, activarse o morir. Tesis doctoral, Barcelona, España. 376p.
- Donnelly, S., Stack, C. M., O'Neill, S. M., Sayed, A. a, Williams, D. L., & Dalton, J. P. (2008). Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *The FASEB journal*. **22**(11): 4022-4032.
- Dorrington, B. (2011). Isolation Bone Marrow-Derived Macrophages. Bowdish Lab, McMaster University Hamilton. Canadá. 10-13p.
- Duque, M. & Rojas, M. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*. **26**: 73-86
- Escobedo, G., Roberts, C. W., Carrero, J. C., & Morales-Montor, J. (2005). Parasite regulation by host hormones: An old mechanism of host exploitation? *Trends in Parasitology*. **21**: 588-593
- Fernando, M. R., Reyes, J. L., Iannuzzi, J., Leung, G., & McKay, D. M. (2014). The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS ONE*: **9**(4).
- Galdiero, M., Vitiello, M., D'Isanto, M., Raieta, K., & Galdiero, E. (2006). STAT1 and STAT3 phosphorylation by porins are independent of JAKs but are dependent on MAPK pathway and plays a role in U937 cells production of interleukin-6. *Cytokine*. **36**(5-6): 218-228.
- Garside, P., Kennedy, M. W., Wakelin, D., & Lawrence, C. E. (2000). Immunopathology of intestinal helminth infection. *Parasite Immunology*. **22**(12): 605-612.
- Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity*. **32**: 593-604
- Gordon, S., Plüddemann, A. & Martinez, E. 2014. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunology Review* **262**(1):36-55
- Hammerschmidt, K., & Kurtz, J. (2005). Surface carbohydrate composition of a tapeworm in its consecutive intermediate hosts: Individual variation and fitness consequences. *International Journal for Parasitology*. **35**(14): 1499-1507.
- Heldwein, K., Biedermann, H. G., Hamperl, W. D., Bretzel, G., Löscher, T., LaRegina, D., Frosch, M., et al. (2006). Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **75**(1): 108-111.
- Heneghan, A., Pierre, J. & Kudsk, K. (2013). JAK-STAT and intestinal mucosal

- immunology. *JAK-STAT*. **2**:4
- Hirano, T., Ishihara, K., & Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*. **19**(21): 2548-2556.
- Janeway, C., Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2009). *Inmunología de Janeway*. 7a ed. McGraw-Hill, México, D.F. 887 p.
- Klotz, C., Ziegler, T., Figueiredo, A. S., Rausch, S., Hepworth, M. R., Obsivac, N., Sers, C., et al. (2011). A helminth immunomodulator exploits host signaling events to regulate cytokine production in macrophages. *PLoS Pathogens*. **7**(1): e1001248
- Lang, R. (2005). Tuning of macrophage responses by STAT3-inducing cytokines: Molecular mechanisms and consequences in infection. *Immunobiology*. **210**: 63-73
- Lang, R., Patel, D., Morris, J. J., Rutschman, R. L., & Murray, P. J. (2002). Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *Journal of immunology*. **169**(5): 2253-2263.
- Liongue, C., O'Sullivan, L., Trengove, M. & Ward A. (2012) Evolution of JAK-STAT Pathway Components: Mechanisms and Role in Immune System Development. *PLoS ONE*. **7**(3): e32777
- MacDonald, A. S., Araujo, M. I., Edward, J., & Pearce, E. J. (2002). Immunology of parasitic helminth infections immunology of parasitic helminth infections. *Infection and immunity*. **70**(2): 427-433.
- Maillard, H., J. Marionneau, B. Prophette, E. Boyer, & P. Celerier. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *AIDS*. **12**: 1551-1552
- Maizels, R. M., & Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature reviews. Immunology*. **3**(9): 733-744.
- Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., & Allen, J. E. (2004). Helminth parasites - Masters of regulation. *Immunological Reviews*. **201**: 89-116
- Maizels, R. M., Pearce, E. J., Artis, D., Yazdanbakhsh, M., & Wynn, T. A. (2009). Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *The Journal of experimental medicine*. **206**(10): 2059-2066.
- Martínez, L. 2004. STAT1 en la apoptosis inducida por fludarabina e inhibidores de JAK Kinasas en las células de LLC-B. Papel de las células adherentes en la apoptosis inducida por fludarabina. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 81p.
- Mejri, N., Muller, N., Gottstein, B., 2011. Intraperitoneal murine *Echinococcus multilocularis* infection induces differentiation of TGF β -expressing DCs that remain immature. *Parasite Immunol*. **33**: 471-478.
- Meyer, T. & Vinkemeier, U. (2004) Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur. J. Biochem*. **271**: 4606-4612
- Moya, C., Huang, Z., Cheng, P., Jayaraman, A., & Hahn, J. (2011). Investigation of IL-6 and IL-10 signalling via mathematical modelling. *IET systems biology*. **5**(1): 15
- Murray, P. J. (2006). Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Current Opinion in Pharmacology*. **6**: 379-386
- Murray, P. J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of immunology*. **178**(5): 2623-2629.

- Murray, P. J. J., Allen, J. E. E., Biswas, S. K. K., Fisher, E. A. A., Gilroy, D. W. W., Goerdts, S., Gordon, S., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. **41**(1): 14-20.
- Murray, P. J., & Wynn, T. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *Journal of leukocyte biology*. **89**(4): 557-563.
- Mylonas, K. J., Hoeve, M. A., MacDonald, A. S., & Allen, J. E. (2013). Alternative activation of macrophages by filarial nematodes is MyD88-independent. *Immunobiology*. **218**(4): 570-578.
- Niemand, C., Nimmesgern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P. C., et al. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *Journal of immunology*. **170**(6): 3263-3272.
- Nishihara, M., Ogura, H., Ueda, N., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Tsuji, F., Aono, H., et al. (2007). IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *International Immunology*: **19**(6): 695-702.
- Olivier, M., Gregory, D. J., & Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*. **18**(2): 293-305.
- O'Shea, J. J., & Murray, P. J. (2008). Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*. **28**(4): 477-487.
- Peón, A. N., Espinoza-Jiménez, A., & Terrazas, L. I. (2013). Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *BioMed Research International*. 2013
- Perrigoue, J. G., Marshall, F. A., & Artis, D. (2008). On the hunt for helminths: Innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. *Cellular Microbiology*. **10**: 1757-1764.
- Peters, M., Muller, A. & Rose-John, S. (1998). Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *The Journal of The American Society of Hematology. Molecular Biology*. **92**(10): 655-663
- Piessevaux, J., Lavens, D., Montoye, T., Wauman, J., Catteeuw, D., Vandekerckhove, J., Belsham, D., et al. (2006). Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. *Journal of Biological Chemistry*. **281**(44): 32953-32966.
- Ponce, N. E., Carrera-Silva, E. A., Pellegrini, A. V., Cazorla, S. I., Malchiodi, E. L., Lima, A. P., Gea, S., et al. (2013). *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. **1832**(3): 485-494.
- Qin, H., Holdbrooks, A. T., Liu, Y., Reynolds, S. L., Yanagisawa, L. L., & Benveniste, E. N. (2012). SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *Journal of immunology*. **189**(7): 3439-3448.
- Reyes, J. L. H., Leung, G., & McKay, D. M. (2013). Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases. *International Journal for Parasitology*. **43**: 233-243
- Reyes, J. L., & Terrazas, L. I. (2007). The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunology*. **29**(12): 609-619.

- Rodríguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., & Terrazas, L. I. (2002). Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *Journal of immunology*. **168**(7), 3135-3139.
- Rodríguez-Sosa, M., Saavedra, R., Tenorio, E. P., Rosas, L. E., Satoskar, A. R., & Terrazas, L. I. (2004). A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and Immunity*. **72**(8): 4552-4560.
- Saavedra Ramírez, P. G., Vásquez Duque, G. M., & González Naranjo, L. A. (2011). Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*. **24**(2): 157-166.
- Samavati, L., Rastogi, R., Du, W., Hüttemann, M., Fite, A., & Franchi, L. (2009). STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. *Molecular Immunology*. **46**(8-9): 1867-1877.
- Sanz, M., Martín, M., Reyes, E. y Prieto M. (2013). Células presentadoras de Antígeno. *Medicine*. **11**(28):1720-7
- Scheller J, Grötzinger J, Rose-John S. (2006). Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling. *Signal Transduction*. **6**(4): 240-259
- Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C., & Schaper, F. (2000). SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem*. **275**(17): 12848-12856.
- Stephanou, A., Isenberg, D. A., Akira, S., Kishimoto, T., & Latchman, D. S. (1998). The nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signalling pathways co-operate to mediate the activation of the hsp90beta gene by interleukin-6 but have opposite effects on its inducibility by heat shock. *The Biochemical journal*. **330**(1): 189-195.
- Takahashi, K. (1994). Development and differentiation of macrophages and their related cells. *Hum Cell*. **7**(3):109-15.
- Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., & Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of STAT3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. **10**(1): 39-49.
- Tamiya, T., Kashiwagi, I., Takahashi, R., Yasukawa, H., & Yoshimura, A. (2011). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: Regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. **31**(5): 980-985.
- Terrazas, C. a, Gómez-García, L., & Terrazas, L. I. (2010). Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *International Journal for Parasitology*. **40**(9): 1051-1062.
- Terrazas, C., Alcántara-Hernández, M., Bonifaz, L., Terrazas, L. I., & Satoskar, A. R. (2013). Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *FASEB Journal*. **27**(11): 4547-4560.
- Terrazas, I., R. Bojalil, T. Govezensky, y C. Larralde. (1998). Shift from an early protective TH1-Type immune response to a late permissive TH2-Type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of Parasitology*. **84**(1):74-81

- Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C. A., Reyes, J. L., & Rodríguez-Sosa, M. (2005). Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *International Journal for Parasitology*. **35**(13): 1349-1358.
- Traum, D., Timothee, P., Silver, J., Rose-John, S., Ernst, M., & LaRosa, D. F. (2012). IL-10-induced gp130 expression in mouse mast cells permits IL-6 trans-signaling. *Journal of Leukocyte Biology*. **91**: 427-435
- Valle, M. A. & Soto, C. I. (2005). Vía JAK-STAT: una visión general. *VERTIENTES Revista Española en Ciencias Sal.* **8**(1-2): 14-25
- Vogt, M., Domszalai, T., Kleshchanok, D., Lehmann, S., Schmitt, A., Poli, V., Richter, W., et al. (2011). The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3. *Journal of cell science*. **124**(6): 900-909.
- Walsh, K.P., Brady, M.T., Finlay, C.M., Boon, L., Mills, K.H., 2009. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF β mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *J. Immunol.* **183**: 1577-1586.
- Willms, K. & Zurabian, R. (2010). *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*. **137**(3): 335-346.
- Wilson, H. M. (2014). SOCS proteins in macrophage polarization and function. *Frontiers in Immunology*. **5**(7): 1-5
- Wormald, S. & Hilton, D. 2004. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem*. **279**(2):821-4
- Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., et al. (2003). IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nature immunology*. **4**(6): 551-556.
- Yoshimura, A., Naka, T., & Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature reviews Immunology*. **7**(6): 454-465.
- Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J. C., & Ortiz-Ortiz, L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology*. **18**(6): 272-278.