



TESIS DOCTORAL

Papel de STAT1 y STAT3 en la tolerancia inducida por *Staphylococcal enterotoxin B*

AUTOR

Eder Fredy Mateus Medina

DIRECTOR

Cándido Juárez Rubio

**Programa de Doctorado en Inmunología
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
IIB Institut de Recerca Hospital de la Santa Creu I Sant Pau
Universidad Autónoma de Barcelona, 2015**

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
2. INTRODUCCION	
2.1 Los superantígenos (SAGs)	3
2.2 Los superantígenos de <i>staphylococcus aureus</i> y <i>streptococcus pyogene</i> .	3
2.3 Propiedades de los SAGs	5
2.4 Superantígenos en sepsis y el shock tóxico	7
2.4.1 Citocinas en sepsis y shock tóxico	8
2.5 Inducción de tolerancia mediante el superantígeno (SAG)	
<i>staphylococcal enterotoxin B</i> (SEB)	9
2.6 Señalización de citocinas a través de JAK-STAT	11
2.7 Proteínas <i>Janus Kinase</i> JAK.	12
2.8 Proteínas <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (STAT)	13
2.9 Activación de los STAT	14
2.10 Señalización a través de los STAT	15
2.11 Especificidad de unión de los STAT al DNA	16
2.12 Regulación negativa de los factores de transcripción	18
2.12.1 <i>Protein inhibitor of activated STAT</i> (PIAS)	18
2.12.2 <i>suppresor of cytokine signaling</i> (SOCS)	19
2.12.2.1 Estructura y función reguladora de las proteínas SOCS	20
2.13 Modulación farmacológica de la actividad de los STAT	22
2.14 Heterogeneidad poblacional de los linfocitos T HELPER CD4+	23
2.15 Subpoblaciones Th1/Th2	24
2.15.1 Subpoblación de células CD4 T helper 1 (Th1)	24
2.15.1.1 Implicación de STAT en la diferenciación Th1	25
2.15.2 Subpoblación de células CD4 T helper 2 (Th2)	26
2.15.2.1 Implicación de STAT en la diferenciación Th2	26
2.16 CD4 T helper (Th17) cells	27
2.17 Células T reguladoras	28

2.17.1 Células T reguladoras naturales CD4+ CD25+(nTregs)	28
2.17.1.1 Factores de transcripción y Cèlulas T reguladoras	30
2.17.2 Células T reguladoras inducidas o adaptativas	31
2.17.2.1 Factores de transcripción y células Tr1	31
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	32
Hipótesis	33
Objetivos.	33
4. MATERIALES Y METODOS	
4.1 Animales de experimentación	34
4.2 Diseño de los tratamientos experimentales	
4.2.1 Experimentación <i>in vivo</i>	34
4.2.1.1 Tratamiento de shock tóxico (SK)	35
4.2.1.2 Tratamiento de shock tóxico AG490 (ASK)	35
4.2.1.3 Tratamiento de shock tóxico STAT3 Inhibidor VIII 5,15-DPP(STSK)	35
4.2.1.4 Tratamiento de shock tóxico anti IL6 (AIL6SK)	35
4.2.1.5 Tratamiento tolerogénico (TOL)	35
4.2.1.6 Tratamiento tolerogénico AG490 (Atol)	35
4.2.1.7 Tratamiento tolerogénico STAT3 Inhibidor VIII 5,15-DPP(STTol)	36
4.2.1.8 Tratamiento control	36
4.2.1.9 Tratamiento control de isotipo (III6SK)	36
4.2.1.10 Tratamiento D-galactosamina (Gal)	36
4.3 Extracción de sangre y obtención de suero	37
4.4 Obtención y purificación de los esplenocitos murinos	37
4.5 Diseño de los tratamientos experimentales <i>in vitro</i>	38
4.5.1 Aislamiento de células T CD4+	38
4.5.2 Transferencia adoptiva de esplenocitos e inducción del shock tóxico	39

4.5.2.1	Transferencia adoptiva de esplenocitos	39
4.5.2.2	Inducción del shick tóxico	40
4.5.3	Cultivo de esplenocitos	40
4.5.3.1	Estímulos <i>in vitro</i>	40
4.5.3.2	Ensayo de proliferación	41
4.6	Análisis del perfil proteico	42
4.6.1	Determinación de la concentración de citocinas en sueros Y sobrenadantes de cultivos celulares	42
4.6.2	Determinación de las proteínas celulares mediante <i>western blot</i>	43
4.6.2.1	Obtención de los extractos proteicos de los esplenocitos	43
4.6.2.1.1	Extractos citoplasmáticos	44
4.6.2.1.2	Extractos nucleares	44
4.6.2.1.3	Cuantificación del contenido proteico: método de Lowry	45
4.6.2.1.4	Electroforesis en condiciones desnaturalización	45
4.6.2.1.5	Transferencia	46
4.6.2.1.6	Inmunoblot	46
4.6.2.1.7	<i>Stripping</i>	48
4.7	Análisis poblacional por citometría de flujo	49
4.8	Análisis de la expresión génica	51
4.8.1	Extracción y purificación de RNA	51
4.8.1.2	Retro transcripción (RT)	52
4.8.1.3	Real Time PCR para cDNAs	53
4.8.2	Inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP).	54
4.8.2.1	<i>Cross-linking</i> y lisis celular.	54
4.8.2.2	Fragmentación del DNA	54
4.8.2.3	Eliminación de inespecificidades	55
4.8.2.4	Inmunoprecipitación	55
4.8.2.5	<i>Cross-linking reversion.</i>	56
4.8.2.6	Extracción y purificación de DNA	56

4.8.2.7	<i>Primers y Real Time PCR para DNA</i>	57
4.8.2.8.1	Diseño de <i>primers</i>	57
5. RESULTADOS		
		62
5.1	Evaluación de la respuesta a SEB <i>in vivo</i> .	63
5.1.1	Análisis de supervivencia de los ratones tratados con SEB.	63
5.1.3	Análisis activación de los factores de transcripción STAT1	66
5.1.3.1	STAT1 y STAT3 en citoplasma	66
5.1.3.2	STAT1 y STAT3 en núcleo	67
5.1.4	Evaluación de los efectos inhibidores AG490,	69
5.1.4.1	Evaluación de la supervivencia	69
5.1.4.2	Producción de citocinas en respuesta a la utilización De los inhibidores AG490, <i>iSTAT3</i> y anti IL-6 en ratones tratados Con SEB	70
5.1.5.2	STAT1 y STAT3 en núcleo	73
5.1.5.3	Anti-IL-6 modifica la activación de STAT3 en el shock tóxico.	74
5.1.6	Análisis de la supervivencia de los ratones en los que se realizo Transferencia adoptiva.	75
5.1.6.1	Citocinas en respuesta a la transferencia adoptiva de células T CD4 Purificadas o esplenocitos totales.	76
5.1.7	Análisis de la expresión y modulación de TCRV β 8, de los receptores de citocinas y de CTLA4 por citometría de flujo.	77
5.1.7.1	Análisis de la expresión de TCRV β 8	77
5.1.7.2	Análisis de la expresión del receptor α de IL-2 (IL-2R α).	79
5.1.7.3	Análisis de la expresión del receptor de IL-10 (IL-10R).	80
5.1.7.4	Análisis de la expresión del receptor β de IFN gama (IFN γ R β)	81
5.1.7.5	Análisis de la expresión de CTLA4	82

5.2	Evaluación de la respuesta a SEB <i>in vitro</i>.	84
5.2.1	Determinación de la dosis optima de SEB para estimulación <i>in vitro</i>	84
5.2.2	Evaluación de la capacidad Proliferativa	85
5.2.3	Determinación de los niveles de citocinas en sobrenadante de cultivo.	86
5.2.3.1	Sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con SEB	87
5.2.3.2	Determinación de los niveles de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con anti CD3/CD28	88
5.2.4	Identificación de las poblaciones celulares productoras de IL-10 e INFγ por citometría de flujo.	89
	Análisis de la expresión génica.	92
6.	DISCUSIÓN	95
	.Citocinas en el shock tóxico tras la estimulación con SEB	96
	.AG490, <i>iSTAT3</i> y anti IL-6, modulan los niveles de citocinas y rescatan de la muerte a los ratones estimulados con SEB	97
	.Tolerancia inducida por SEB rescata los animales del shock tóxico.	99
	.Activación de STAT1 y STAT3 en respuesta a la estimulación con SEB.	100
	.Linfocitos T CD4 son los responsables de la tolerancia inducida por SEB.	101
	.SEB modifica la expresión de TCRVβ8 y los receptores de interleucinas.	102
	.Los receptores de Interleucinas	103
7.	CONCLUSIONES	
8.	BIBLIOGRAFÍA	

LISTA FIGURAS

	Página
Figura 2.1 Alineamiento estructural de SEB	4
Figura 2.2 Diferencias en la interacción de un antígeno convencional	6
Figura 2.3 Representación esquemática de la activación de JACK-STAT	12
Figura 2.4 Estructura de la proteína Jak	13
Figura 2.5 Representación esquemática de la estructura de las diferentes proteínas STAT	13
Figura 2.6 Receptores de interferón gamma y activación de la vía de JAK/STAT	17
Figura 2.7 Estructura de las proteínas PIAS	18
Figura 2.8 Mecanismos utilizados por proteínas PIAS	19
Figura 9:a) estructura de las proteínas SOCS	21
Figura 2.10 Diferenciación de distintas poblaciones T helper CD4+	24
Figura 2.11 Descripción gráfica de los diferentes mecanismos de supresión utilizados por el Treg	29
Figura 4.1 Esquema de los tratamientos instaurados ratones	36
Figura 5.1 Análisis de supervivencias	63
Figura 5.2 Expresión de los niveles de citocinas	65
Figura 5.3 Determinación de niveles de factores STAT1 y 3	67
Figura 5.4 Determinación de los niveles de transcripción STAT1 y STAT3	68
Figura 5.5 Análisis de supervivencias de los ratones	69
Figura 5.6 Expresión de niveles de citocinas en suero de ratones	71
Figura 5.7 Determinación de factores de transcripción STAT1 y STAT 3	72
Figura 5.8 Determinación de factores de transcripción STAT1 y STAT 3	73
Figura 5.9 Análisis de fosforilación	74
Figura 5.10 Análisis de supervivencias de ratones	75
Figura 5.11 Niveles de citocinas en ratones	76
Figura 5.12 Análisis de expresión de TCRV β	78

Figura 5.13	Análisis del decremento de TCV β	79
Figura 5.14	Análisis de expresión de receptor de interleucinas	80
Figura 5.15	Análisis de expresión del receptor interleucinas 10	81
Figura 5.16	Análisis de expresión del receptor β de interferon gama	82
Figura 5.17	Análisis de expresión de Cytotoxic	83
Figura 5.18	Niveles de citocinas	84
Figura 5.17	valuación de capacidad Proliferativa	86
Figura 5.20	Niveles de citocinas en sobrenadante	87
Figura 5.21	Niveles de citocinas en sobrenadante de esplenocitos	89
Figura 5.22	Identificación de células productoras	91
Figura 5.21	Población celular productora de IFN γ	92
Figura 22	Niveles de expresión de genes	93
Figura 23	Niveles de expresión de Diacylglycerol Kinase	93
Figura 24	Niveles de expresión de genes	94

LISTA DE TABLAS

	Página
4.1 Anticuerpos utilizados para determinar la activación de STAT1 y 3	47
4.2 Anticuerpos utilizados para identificación de las poblaciones celulares	50
4.3 Panel de la combinación de anticuerpos	50
4.4 Componentes de volúmenes	52
4.5 Parámetros utilizados para retrotranscripción	52
4.6 Sondas TagMan	53
4.7 Componentes y volúmenes utilizados para q-PCR	53
4.8 Parámetros utilizados para desarrollar la q-PCR	53
4.9 Lista de sondas diseñadas para evaluar los STATs	57
4.10 Componentes y volúmenes para reacción qPCR	58
4.11 Parámetros utilizados para desarrollar la qPCR	58
5.1 Concentración sérica	77
5.2 Concentración de citocinas	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
ASK	Ratones SK tratados con AG490
ATol	Ratones Tol tratados con AG490
Anti IL-6	Anticuerpo anti interleucina 6
AL6SK	Ratones SK tratados con
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
Ctl	Ratones control
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxi-fluorescein-succinil-ester</i>
Chip	<i>Chromatin immunoprecipitation</i>
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
Ccr6	<i>CC-chemokine receptor 6</i>
kDa	KiloDalton
DC	<i>Dendritic cells</i>
DGK α	<i>Diacylglycerol kinaseα</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
Gal	Ratones tratados con <i>D-galactosamine</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DMSO	<i>Dimetilsulfoxide</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EPO	<i>Erythropoietin</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Foxp3	<i>Forkhead box p3</i>
Fyn	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>
GAF	<i>Gamma-activated factor</i>
GAS	<i>IFN-γ Activated Sequences</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
Gzmb	Granzyme B
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
iSTAT3	<i>STAT3 inhibitor VIII,5,15-DPP</i>
ISGF3	<i>IFN Stimulated Gene Factor 3</i>
ISRE	<i>IFN Stimulated Response Element</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
KIR	<i>Kinase Inhibitory Region</i>
Klrg1	Killer cell lectin-like receptor G1
LcK	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
<i>IL12Rβ2</i>	<i>Inteleukine 2 receptor β</i>
LPS	lipopolisacarido
MMVT	Virus del tumor mamario murino
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MHC	<i>Major Hisocompatibility Complex</i>
MLs	<i>Minor lymphocyte stimulating antigens</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>

MODS	Síndrome de disfunción multiorgánica
MW	<i>Molecular Weight</i>
NK	Natural killer
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
nTregs	<i>Natural T regulatory</i>
iTregs	<i>Indued T regulatory</i>
O/N	<i>overnight</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<i>Prf1</i>	Perforin 1
PIAS	<i>Protein Inhibitors of Activated STATs</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i>
ROR γ t	Retinoid-related orphan receptor γ t
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SAg	<i>Superantigen</i>
SEB	<i>Staphylococcal Enterotoxin B</i>
SK	Ratones en los que se induce el shock tóxico
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SHP	<i>SH2 domain containing tyrosine phosphatase</i>
SE	<i>Staphylococcal enterotoxins</i>
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SOCS	<i>Supressor of Cytokine Signaling</i>
SSI	STAT Inducible STAT Inhibitors
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
pSTAT	Phosphorylated STAT
SSK	Ratones SK tratados con iSTAT3
STol	Ratones Tol tratados con iSTAT3
T1	Ratones que recibieron una dosis baja de SEB
T2	Ratones que recibieron dos dosis baja de SEB
T3	Ratones que recibieron tres dosis baja de SEB
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
TAD	<i>TransActivator Domain</i>
T-bet	T-box transcription factor
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
Tol	Ratone tolerizados
TBST	TBS 1X Tween-20 0.1%
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TGF	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	<i>T helper</i>
TSST	<i>Toxic shock syndrome toxin</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	<i>Tumoral Necrosis Factor</i>
Treg	Cèl-lules T reguladores/supresores
Tyk2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
V β	Variable region of the β chain (from the TCR)
Y = Tyr	Tirosina
70 ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase

1. RESUMEN

1 Resumen

La inoculación de *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB) en combinación con D-Galactosamina en ratones BALB/c, induce shock tóxico y provoca la muerte al cien por cien de los ratones. Una pronta y elevada liberación de IL-2, IL-6, IFN γ y TNF α , así como una activación de STAT1 y STAT3 fueron observadas durante este proceso.

Por el contrario, la inoculación periódica de bajas dosis de SEB modificó la respuesta y evitó la muerte de los ratones tras inducirles el shock tóxico. Los niveles séricos de citocinas proinflamatorias IL-2 e IFN γ así como sus receptores celulares fueron bajos en estos ratones, mientras que los niveles de IL-10 fueron muy elevados.

En el shock tóxico IFN γ fue el responsable de la marcada activación de JAK/STAT1 y de provocar la muerte ya que como se probó, al inhibir las Proteínas JAK con AG490 los niveles de IFN γ así como los de su receptor se redujeron y se evitó la muerte. IL-6 fue quien activó STAT3 durante el shock tóxico mientras que IL-10 jugó un papel fundamental en la activación de STAT3 en los ratones tolerizados.

El papel relevante de las células CD4 fue determinado cuando los ratones control que recibieron los linfocitos T CD4 sobrevivieron a la muerte tras la inducción de shock tóxico. Adicionalmente, linfocitos T CD4 purificados a partir de ratones tolerizados, durante el proceso de tolerización proteínas implicadas en la señalización vía TCR como DGK α

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Los superantígenos (SAgs)

Los microorganismos patogénicos han desarrollado numerosas estrategias para escapar de la respuesta inmune, entre ellas esta la síntesis de superantígenos (SAgs).¹

Los SAgs son una familia de exoproteínas no-glicosiladas de bajo peso molecular sintetizadas y secretadas por algunas bacterias y virus que pueden ser divididos principalmente en dos grupos: Los SAgs propios y los SAgs extraños.² Los propios son conocidos como *minor lymphocyte stimulating antigens* (MLs) y son codificados por genes del virus del tumor mamario murino (MMVT) que han sido integrados en el genoma de los ratones infectados.³

El otro grupo de SAgs, son exotoxinas que son sintetizadas y secretadas por varios tipos de microorganismos como las bacterias gram positivas y gram negativas,⁴ virus y micoplasma.⁵

2.2 Superantígenos de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

Los SAgs mejor caracterizados son los secretados por el *Staphylococcus aureus* y por el *Streptococcus pyogenes*.

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva, aerobia facultativa catalasa-positiva, coagulasa-positiva, y es la causa principal de un gran número de enfermedades infecciosas con una elevada tasa de morbilidad/mortalidad.^{4,6}

Aunque *S. aureus* está implicado en infecciones abscedativas, endocarditis bacteriana, neumonías necrotizante, sepsis y síndrome de shock tóxico (TSS) por sus siglas en inglés,⁷ también está presente como parte de la flora bacteriana normal humana.⁷ Se estima que cerca del 30-40% de la población humana puede estar colonizada de manera asintomática.⁸

Streptococcus pyogenes (grupo A streptococcus), es otra bacteria Gram-positiva anaerobia aerotolerante, catalasa-negativa. Al igual que *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* está asociada a infecciones como el impetigo y la faringitis, aunque este

microorganismo también puede causar TSS, desarrollar fiebre reumática, glomerulonefritis aguda⁹ y psoriasis.⁴

Los SAgS sintetizados por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* filogenéticamente comparten secuencia aminoacídica de entre un 15% (SEB y SEK), hasta un 90% (SEA y SEE). Sin embargo todos los SAgS cristalizados hasta la fecha, muestran que estructuralmente conservan residuos que están involucrados en la unión al receptor de la célula T (TCR).¹⁰ (Figura 2.1)

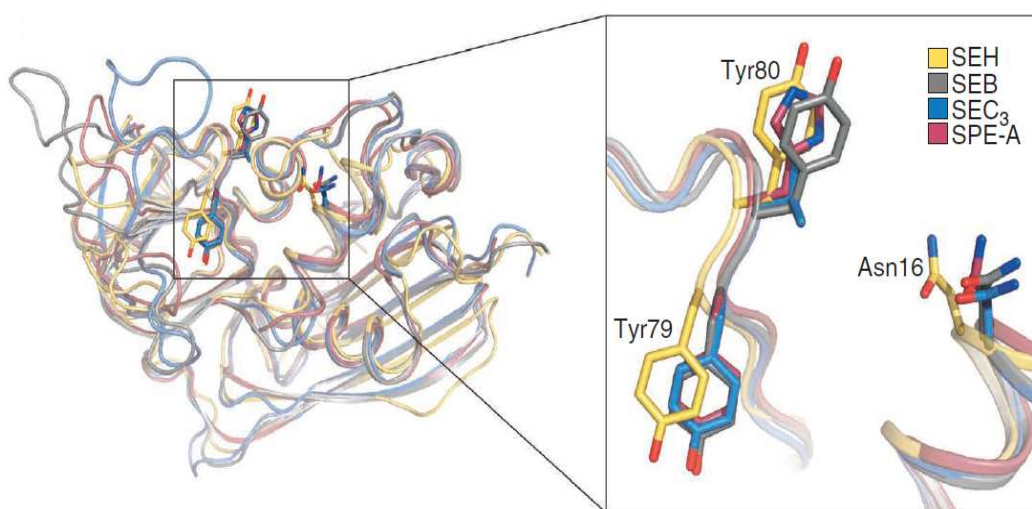


Figura 2.1. Alineamiento estructural de SEB (gris), SEC (azul), SPE-A (rojo) y SEH (amarillo) donde se observan los aminoácidos conservados estructuralmente entre las moléculas y que participan en la unión al TCR. Saline et al 2010

De estos SAgS se han descrito alrededor de 30 toxinas incluyendo *staphylococcal enterotoxins* (SE) de la A a la R y *Toxic shock syndrome toxin* (TSST), la *streptococcal pyrogenic exotoxins* (SPE) A, C, G–M y la Y.^{4,10}

De acuerdo con su homología estructural y al sitio de unión con el *Major Histocompatibility Complex* (MHC), los SAgS pueden dividirse en cinco grupos.

Group I: Caracterizado por TSST-1, tienen un solo sitio de unión al MHC II en su pliegue O/B, este sitio de unión es de baja afinidad e interactúa con la cadena alfa de la molécula de MHC II.¹¹ En su unión al MHC II, TSST-1 también puede interactuar con el péptido antigénico localizado en el surco de presentación en el contexto MHC.⁴

Grupo II: Caracterizado por SEB, SEC, y SPE A1-4, estos SAGs contienen en su estructura bucle una secuencia aminoacídica extra de entre 9 y 10 de longitud ricos en residuos de cisteína que es requerida para la actividad emética. Al igual que el grupo I, los SAGs del grupo II, tienen un solo sitio de unión de baja afinidad a la cadena alfa del MHC II.¹²

Grupo III: Este grupo incluye SEA, SED, y SEE, entre otros. Este grupo al igual que el grupo II, contiene en su estructura bucle con una secuencia aminoacídica extra de 9 aminoácidos. También presenta un sitio de unión al MHC II en su pliegue O/B, este sitio de unión es de baja afinidad e interactúa con la cadena alfa de la molécula de MHC II, además presenta un sitio de unión Zn^{2+} dependiente que es de alta afinidad por la cadena β MHC II.¹²

Grupo IV: Estos SAGs son producidos por *Streptococcus pyogenes* (grupo A streptococcus) pero no por *S. aureus* y están representados por SPE C, SPE G, SPE J, and SMEZ.^{12,13} Este grupo al igual que el grupo III presenta un sitio de unión de baja afinidad que interactúa con la cadena alfa de la molécula de MHC II, y un sitio de unión Zn^{2+} dependiente que es de alta afinidad por la cadena β MHC II.^{12,13}

Grupo V: Son de los SAGs recientemente descubiertos y están representados por SE-1K a SE-1M, SE-1Q, SE-1V, y SPEH.¹⁴ Estructuralmente son similares al grupo III pero carecen del bucle que da actividad emética. A cambio presentan una inserción de quince aminoácidos que es fundamental para la interacción específica con su respectivo TCR.⁴

2.3 Propiedades de los SAGs

Los SAGs difieren en varios aspectos de los antígenos convencionales, usualmente son resistentes al calor, a la proteólisis, a los ácidos y son altamente resistentes a la desecación. Características por las que algunos SAGs como el SEB, son catalogados como agentes de bioterrorismo.⁴ Sin embargo, la diferencia más relevante entre los SAGs y los antígenos convencionales es la interacción que ocurre entre la molécula MHC clase II de la células presentadoras de antígenos (APC) y el TCR.^{4 6,15} (Figura 2.2)

Usualmente, los antígenos son procesados por las **APC** en pequeños fragmentos que posteriormente son localizados dentro del surco de unión y presentación del péptido de la molécula MHC class II para ser presentados a la célula T. Esta presentación es altamente restringida por el propio MHC y la interacción entre la APC y la célula T es muy específica, de tal manera que solo una pequeña proporción de células T (1×10^4 - 1×10^6) sea activada.^{2,16}

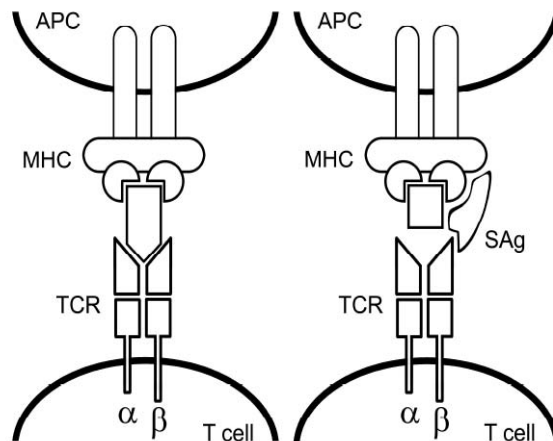


Figura 2.2 Diferencias en la interacción de un antígeno convencional y del SAg con el linfocito T y la APC. Liang et al 2012

Los SAg por el contrario, tienen la capacidad de interactuar como una proteína intacta no modificada con el MHC de clase II de la APC y el dominio V β del TCR Figura 2. Esta propiedad exclusiva de los SAg les otorga la capacidad de activar entre un 30 y un 70% del total de las células T.^{2,5,16}

La especificidad de unión de los SAg se limita al reconocimiento de la zona externa de determinados dominios variables de la cadena β del TCR,¹⁷ y es característico de cada SAg los tipos de elemento V β del TCR con los que puede interactuar.^{5,13,18} Sin embargo, la especificidad de un SAg hacia un elemento V β del TCR no necesariamente es la misma entre especies. Tabla 1.

Aunque un mismo SAg puede presentar especificidad por varios elementos V β del TCR, presenta mayor afinidad por uno de esos elementos. En el caso en particular del

SEB que presenta especificidad por los TCR V β 3, 7, 8.1, 8.2, 8.3 y 17 de ratones,^{5,19} existe una altísima afinidad por el elemento V β 8 y en especial por el subtipo V β 8.2.^{20,21}

Toxina	Organismo	Especificidad V β		Referencia
		Humano	Ratón	
SEA	<i>S. aureus</i>	5, 6, 7, 9, 23	1, 3, 10, 11, 17	127, 156
SEB	<i>S. aureus</i>	3, 12, 14, 17, 20	3, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 17	132, 156, 159
SEC1	<i>S. aureus</i>	3, 6.3, 12, 15	3, 8.2, 8.3, 11, 17	127, 156
SEC2	<i>S. aureus</i>	12, 13.1, 13.2, 14, 15, 17, 20	3, 8.2, 10, 17	156, 157
SEC3	<i>S. aureus</i>	5, 12	3, 7, 8.1, 8.2	127, 156
SED	<i>S. aureus</i>	5, 12	3, 7, 8.2, 8.3, 11, 17	156, 157
SEE	<i>S. aureus</i>	5.1, 6.1, 6.2, 6.3, 8, 18	11, 15, 17	127, 157
TSST-1	<i>S. aureus</i>	2	3, 15, 17	132

Tabla 2.1 Especificidad de los TCRV β que han sido caracterizados tanto para humano como para ratón

2.4 Superantígenos en sepsis y el shock tóxico

Sepsis es uno de los más viejos y elusivos síndromes en medicina en el que las bacterias y los antígenos bacterianos han estado implicados en el desarrollo de enfermedades humanas que van desde la intoxicación alimentaria hasta el propio síndrome shock tóxico (TSS).^{12,22} siendo los responsables del 10% de los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos.²²

Aunque los signos clínicos de la sepsis (Vómitos, diarreas, fiebres elevadas, hipotensión cefaleas intensas, etc) son comunes a los signos del síndrome de shock tóxico, estas dos entidades tienen diferente etiología. La sepsis se caracteriza por una robusta activación del sistema inmune innato por componentes microbianos como lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos, predominantemente a través de su interacción con los *Toll Like Receptors* (TLR),^{22,23} mientras que el TSS está caracterizado por una activación directa del sistema inmune adaptativo inducido por superantígenos.¹⁶

El TSS causa una alta morbilidad y mortalidad de pacientes afectados y se caracteriza por un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y un síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) que solo puede ser tratado sintomáticamente.^{16,24}

Aunque aún no son claros los mecanismos moleculares por los cuales la activación del sistema inmunitario por SAgs lleva a falla multiorgánica y finalmente la muerte, estudios muestran que la pronta y concomitante liberación masiva de citocinas

proinflamatorias,²⁵ quimiocinas y apoptosis, son relevantes para que ocurra el síndrome.²⁴

Esta falta de entendimiento de la inmunopatogenesis del TSS, particularmente los eventos agudos que ocurren prontamente, podrían ser atribuidos a la falta de un buen modelo animal. Los ratones convencionales son altamente susceptibles a la sepsis,^{26,27} sin embargo, no son susceptibles al clásico TSS inducido por SAGs, aún ni en altas concentraciones, debido a una pobre unión entre los de SAGs y la molécula MHC II, posiblemente porque esta carece de un residuo lisina en la cadena alfa.²⁸

En todo caso, la patogénesis del TSS inducido por SAGs bacterianos debe ser bien entendida para poder descifrar las similitudes o diferencias entre sepsis y TSS.

2.4.1 Citocinas en sepsis y shock tóxico

La respuesta inmunológica de un individuo a la sepsis está caracterizada por una liberación masiva de citocinas proinflamatorias con una rápida activación de las células T seguido por la depleción y/o anérgia y una posterior respuesta antiinflamatoria que en muchos casos aumenta la susceptibilidad a infecciones secundarias.^{22,29}

Pacientes con shock séptico presentan elevadas concentraciones de interleucina 1 Beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13), interferon- γ (IFN γ), *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) y *Tumour Necrosis Factor- α* (TNF α) significativamente mucho mas altas que los pacientes que padecen sepsis.²⁹

Adicionalmente, el incremento de IL-6, IL-8 y *Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) en las primeras 24 horas son causa de falla orgánica, mientras niveles elevados de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, MCP-1 y G-CSF provocan la muerte antes de 48 horas.^{29,30}

En ratones, los estudios señalan que la exposición de los ratones a SEB *in vivo*, al igual que en humanos, induce la rápida y aberrante activación de las células T que expresan el receptor de célula T V β 8 (TCR V β 8),³¹ seguido por una de la liberación de citocinas de tipo T *helper* 1 (Th1) principalmente IFN γ e IL-2 , acompañada de una moderada

producción de citocinas tipo T *helper* 2 (Th2) como TNF α , IL-4 e IL6,³² y una concentración tardía y moderada de IL-10, que podría inhibir en los macrófagos la producción de IL-1 β , IL-12 y TNF α inducida por IFN γ .^{33,34}

Esa primera exposición a SEB no llega a causar la muerte, sin embargo un desafío posterior con SEB puede llegar a ser mortal en estos ratones y está asociado con el incremento de IFN γ .³⁵

Estudios en ratones que son expuestos a SEB en combinación con un fármaco sensibilizante como la D-galactosamina, con lo que una sola dosis puede causar la muerte, presentan niveles séricos elevados de un amplio número de citocinas proinflamatorias, donde la expresión génica de IL-6, IFN γ e IL-2, aparece 706, 359 y 237 veces respectivamente, mas aumentada que los ratones control.¹⁶

2.5 Inducción de tolerancia mediante el superantígeno (SAg) *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB)

El shock séptico que se produce en ratones que son expuestos a SEB, puede ser prevenido por varias exposiciones previas a dosis bajas de SEB. Tras las exposiciones, en estos ratones, no se detectaron niveles sericos de IL-2 ni de IFN γ al ser tratados nuevamente con una dosis elevada de SEB.³⁶ No obstante, la producción de IL-10 ni de IL-4 se ve afectada.

La capacidad supresora de células expuestas a SEB se ve cuando células del bazo de ratones que no han sido expuestos a SEB y son transferidas a animales previamente expuestos a SEB en dosis bajas al que posteriormente se le inyecta una dosis alta de SEB, no tienen la capacidad de producir IL-2 ni IFN γ .³⁷ Este fenómeno se explica porque los esplenocitos de ratón expuestos de forma continuada a SEB, presentan células T CD4⁺ TCR V β 8 capaces de suprimir la secreción de IL-2 e IFN γ , limitando la proliferación de las células T CD4⁺ TCR V β 8 reactivas a SEB expuestas por primera vez al SAg.³⁷

Estas células T CD4⁺ no expresan CD25 ni el factor de transcripción *Forkhead box P3* (Foxp3), pero presentan una gran capacidad supresora mediada por IL-10.³⁷⁻³⁹

No obstante, la tolerancia inducida por SEB no se produce en ratones deplecionados de células CD25⁺, lo que implica a las células T CD4⁺CD25⁺ en la inducción de las células T CD4⁺ CD25⁻ responsables del fenómeno supresivo.³⁷

En ratas sometidas a trasplante de córnea se observó un rechazo tardío y un retraso en la neovascularización del injerto en las ratas que fueron expuestas crónicamente a SEB corroborando la capacidad reguladora de las células a SEB y un posible uso de esta molécula en trasplantes.⁴⁰

Aunque aún se debe profundizar en los mecanismos por los cuales ocurre la anergia en las células T memoria, estudios con SAGs revelan una vía de señalización de regulación específica de células memoria por la cual la señalización a través del TCR puede llevar a la tolerancia clonal (anergia). En esta vía el Fyn, una quinasa de la familia Src, es un elemento crítico en la inducción de la anergia en células T CD4 memoria de ratón inducidas por SEB.

La exposición a SEB altera negativamente la señalización proximal del TCR y esta alteración resulta en una falla en las células para proliferar y producir citocinas. La señalización del TCR se afecta debido a una disminución en la formación del complejo CD3/ZAP-70 en el que además, la transducción de señal a través del TRC permanece bloqueada de manera similar cuando las células memoria anérgicas son subsecuentemente expuestas a un péptido antigénico agonista.

La inhibición farmacológica o la delección de Fyn restablece la activación del complejo CD3/ZAP-70 llevando a la pérdida de la anergia en las células memoria, resultando en una proliferación celular inducida por SEB.⁴¹

Adicionalmente y debido a que en células memoria tratadas con SEB ZAP70 no interactúa con el complejo TCR/CD3 para llegar a ser accesible a Lck, el papel de esta tirosin quinasa en la inducción de anergia debería ser evaluado.⁴²

Otro mecanismo involucrado en la inducción de anérgia que aunque no es específico para SEB, pero que debería ser estudiado, es el que ocurre por alteración del metabolismo del diacilglicerol.

En un estudio en el que fueron manipuladas las diacilglicerol quinasas (DGKs), enzimas que finalizan las señales dependientes de glicerol, se observó que la sobreexpresión de Diacilglicerol quinasa alfa (DGK- α) resultó en un defecto en la señal del TCR que es característico de anérgia.

In vivo, ratones DGK α deficientes presentaron un aumento en la señalización del TCR dependiente del glicerol y la inducción de anérgia fue marcadamente disminuida. Estos hallazgos sugieren que el metabolismo del diacilglicerol es crítico en la activación o anérgia de las células T después de su estimulación.⁴³

2.6 Señalización de citocinas a través de JAK-STAT.

La complejidad y funcionamiento del sistema inmunitario no sería eficiente si no existieran mecanismos que capaciten a las células para responder a diferentes estímulos. Las citocinas y su receptor específico tienen un papel importante en el control de la respuesta inmune, y su función biológica depende de la activación o represión de genes inducido por citosinas.⁴⁴

La unión de una citocina a su receptor específico es necesaria para que ocurra la señalización, sin embargo, los receptores hematopoyéticos carecen de actividad tirosín kinasa intrínsecamente, por lo que necesitan de otra molécula para completar la señalización intracelular.⁴⁵ Fue solo cuando estudios en la inducción de genes por interferones (IFNs) llevaron al descubrimiento de la señalización a través de *Janus Kinase* (JAK)- *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT), una vía de señalización que es común para muchas citocinas.⁴⁶

Una vez la citocina se une a su receptor específico, este dimeriza y permite la subsecuente activación de las proteínas JAK específicas del receptor que a su vez fosforila residuos de tirosina en la cadena del receptor, creando así sitios de unión para

los STAT.^{44,47} Una vez activados los STAT dimerizan y translocan al núcleo. (Figura 2.3)

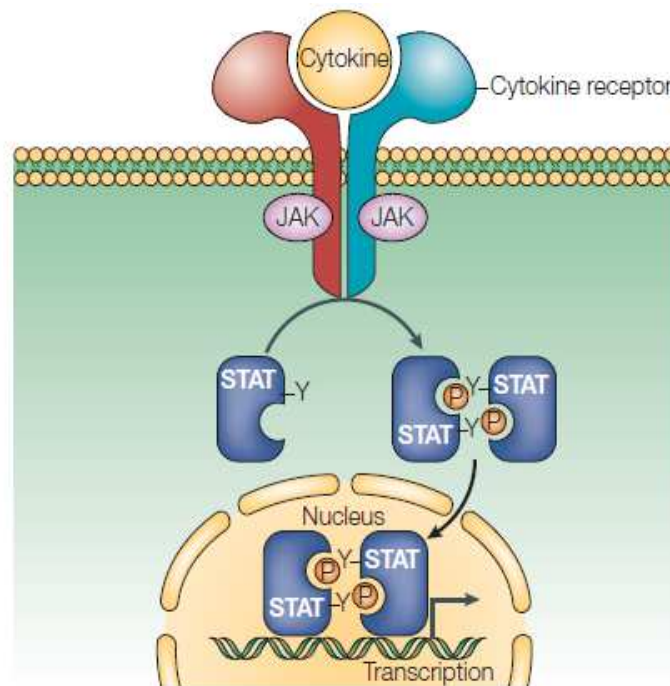


Figura 2.3: Representación esquemática de la activación de JAK-STAT y translocación al núcleo. Shuai et al 2003

2.7 Proteínas *Janus Kinase* JAK.

Las *Janus Kinase* (JAK) son una familia de proteínas quinasas con un peso molecular de entre 120 y 135 kilodalton (kDa), pueden ser activadas una o varias de las cuatro proteínas (JAK1, JAK2, JAK3 o Tyk2) una vez la citocina se une a su receptor.^{48,49}

JAKs tienen en su estructura siete dominios homólogos (JH1 – JH7). En JH1 se localiza su actividad quinasa, JH2 que contiene una pseudoquinasa y JH3 – JH7 participan en la unión de JAK a su receptor.^{44,49} (Figura 2.4)

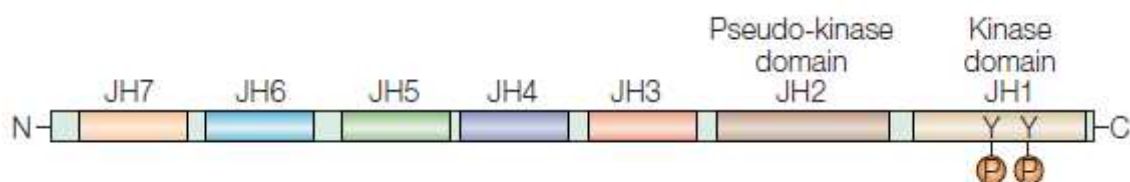


Figura 2.4 Estructura de la proteína JAK en la que se observan los 7 dominios comunes en los 4 miembros conocidos de esta familia. Shuai et al 2003

2.8 Proteínas *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)

Como el nombre lo sugiere, estas proteínas tienen la habilidad para transducir señales desde la membrana celular hasta el núcleo para activar la transcripción de genes. STAT 1 y STAT 2 fueron los primeros genes identificados de esta familia a la que también pertenecen STAT 3, STAT 4, STAT 5a, STAT 5b y STAT 6.^{48,50}

Estructuralmente los STAT comparten seis dominios. Un dominio amino terminal, un dominio coiled-coil, un dominio de unión al DNA, un *linker*, un dominio SH2 y un dominio de transactivación.^{48,50,51} Todos los STAT contienen un residuo de tirosina y uno de serina en el dominio transactivador, exceptuando STAT 2 y STAT 6 que carecen del residuo de serina.^{50,51} (Figura 2.5)

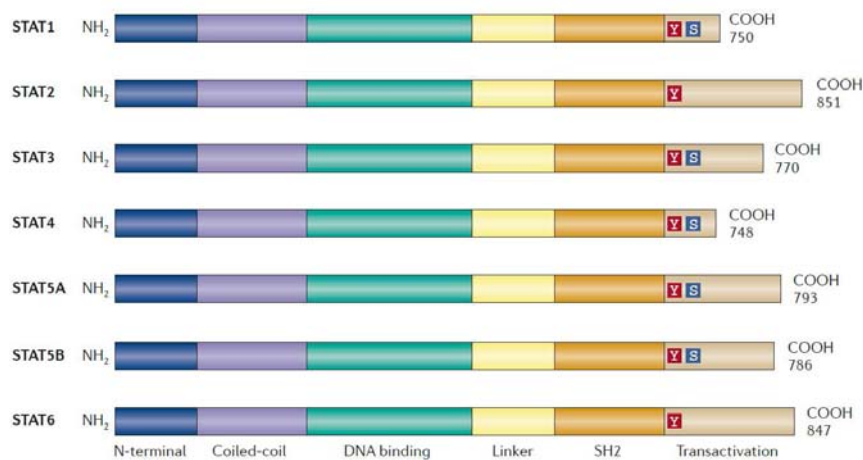


Figura 2.5. Representación esquemática de la estructura de las diferentes proteínas STAT, representación lineal de los dominios de los 7 miembros de la familia STAT. Miklossy et al; 2013

Las proteínas STAT tienen una longitud de entre 700 y 850 aminoácidos, sin embargo, *splicing* alternativos en el extremo 3' de los genes de STAT 1, 3, 4, 5a y 5b, han dado origen a una isoforma β de estas proteínas.⁵⁰ Adicionalmente procesos proteolíticos pueden generar isoformas gamma y delta de las proteínas STAT.⁵²⁻⁵⁴

2.9 Activación de los STAT

Varios modelos de activación de los STAT han sido descritos. El principal y mayoritariamente utilizado, es la clásica activación vía JAK-STAT, en donde la citocina se une a su receptor provocando la dimerización/oligomerización del mismo, seguido por la activación de los JAKs asociados al receptor.

JAKs transfosforila el dominio intracelular del receptor y este residuo de tirosina fosforilado provee un sitio de anclaje para los STATs que se unen al receptor a través de su dominio SH2.

Una vez STAT se une al receptor JAKs, es fosforilado en un residuo específico de tirosina. Posteriormente se da la homo o heterodimerización de los STAT y ocurre por unión recíproca de la tirosina fosforilada de un monómero de STAT con el dominio SH2 de otro. Estos STAT dimerizados son liberados del receptor al citoplasma desde donde translocan al núcleo vía importinas y se unen a elementos específicos de unión del DNA activando la transcripción.^{48,50} Esta transcripción es altamente eficiente cuando se da la fosforilación en serina.⁵¹

Se han reportado otras moléculas capaces de activar directa o indirectamente a las proteínas STATs, entre las que se encuentra *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), oncoproteínas como la del virus del sarcoma de Rous (v-src),⁵⁵ receptores para MIP-1 y RANTES,⁵⁶ y MEKK1-C.⁵⁷

Adicionalmente la estimulación de células T con anticuerpos anti CD3 y anti CD28, resultan en la fosforilación del residuo serina 727 de STAT1 y del residuo tirosina 705 de STAT 3 respectivamente.^{58,59}

2. 10 Señalización a través de los STAT

Una incógnita inherente a la inmunología, es que alrededor de 50 citocinas han sido implicadas en distintos procesos de la inmunidad celular, mientras que solo existen siete moléculas de STAT que intervienen para transmitir la señal.⁶⁰

Una de las posibilidades para que esto ocurra es la modificación en la fosforilación de los STAT. La fosforilación en los residuos de tirosina y serina representa un posible punto de integración para múltiples vías de señalización.⁶⁰ Una citocina podría activar la fosforilación de serina y tirosina, mientras que otra solo necesita inducir la fosforilación de tirosina llevando a distintos resultados transcripcionales. Por ejemplo, la fosforilación de la serina de STAT 4 es esencial para la producción de IFN γ , sin embargo es prescindible para la proliferación celular.⁶¹

Otro ejemplo claro es lo que ocurre con STAT 6. Aunque STAT6 no presenta el clásico residuo serina en el extremo carboxiterminal de los STAT, presenta múltiples residuos serina susceptibles de fosforilación para regular negativamente su actividad transcripcional.⁶²

Un segundo mecanismo por el cual los STAT pueden señalizar, es a través de la heterodimerización. Aunque el mecanismo por el cual el receptor promueve esta activación es desconocido, células B estimuladas con interferones tipo I, promueven la generación del heterodímero STAT2:STAT6 presumiblemente debido a la expresión de un receptor de IFN tipo I alternativo en células B.^{63,64}

Aunque STAT5 homodímero y STAT3:STAT5 heterodímero pueden ser activados en respuesta a M-CSF, solo STAT3:STAT5 heterodímero puede unirse a una secuencia en particular.⁶⁵

Citocinas como IL-2, e IL-21 además de compartir la cadena gamma de su receptor, pueden activar STAT 5, y STAT 3 respectivamente, la heterodimerización/trimerización de su receptor generará un nuevo patrón de activación de STAT. Así IL-2 promueve una fuerte activación de STAT5: STAT5, mientras que IL-21 activa STAT5: STAT3.⁶⁶

Otro mecanismo utilizado para que se de la señalización a través de los STAT puede ser el que juegan los STAT no fosforilados y la heterodimerización con otras moléculas.

Recientemente se ha demostrado que por lo menos STAT 1 y 3 no fosforilado, se da como respuesta al incremento de su propia activación por la estimulación con IFN γ e IL-6 respectivamente y que juegan un papel importante en la expresión génica ya que

conducen a la expresión de genes que son distintos a esos activados por los STAT fosforilados.⁶⁷

STAT 3 no fosforilado se une a la molécula NFkB no fosforilada resultando en un complejo STAT3:NfkB y activa genes kB dependientes.⁶⁸

Por su parte, experimentos realizados con levaduras muestran que la cola citoplasmática de CTLA 4 puede unirse a STAT 5 inhibiendo su transcripción.⁶⁹

2.11 Especificidad de unión de los STAT al DNA

Aunque en el genoma murino hay alrededor de 1.3 millones de potenciales sitios de unión de STAT3,⁷⁰ experimentos concluyentes realizados con ChIP-seq demuestran que STAT 3 solo es reclutado por unos miles.^{71,72}

Estos sitios de unión son estrictamente seleccionados en parte por la conformación, homodimérico, heterodimérica o pentamérica que ocurre en los STAT como resultado de su activación por las diferentes citocinas. Como se presenta en la señalización por IFNs.⁷³

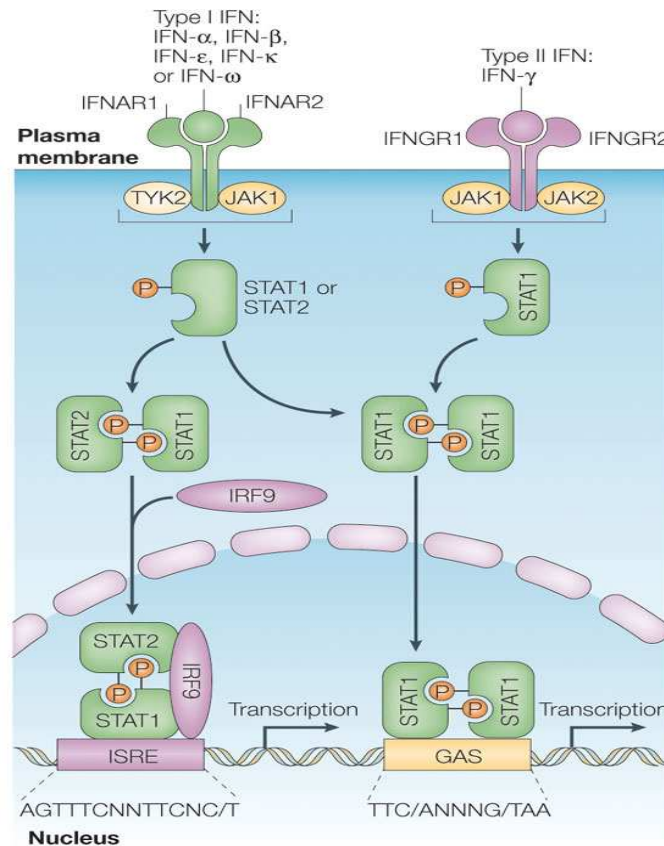
IFN γ induce la fosforilación de STAT1, este a su vez homodimeriza y genera un dominio SH2 (*gamma-activated factor*, or GAF) que se une a secuencia palindrómica denominada GAS (Gamma-Activated Sequences).^{73,74} (Figura 6)

Aunque la secuencia de las cajas GAS varía considerablemente, básicamente esta conformada por una estructura nucleotídica TT(N)5AA común para casi todos los miembros de la familia STAT.⁷⁵ Una secuencia palindrómica TT(N)4AA selectivamente une complejos que contienen STAT 3, mientras que una secuencia TT(N)6AA une selectivamente complejos STAT activados por IL-4,⁷⁶ mientras que STAT 1 y STAT 5 prefieren secuencia TT(N)3AA.

En contraste, los interferones tipo I inducen STAT1-STAT2 heterodímeros, los cuales requieren del IRF9 (interferon-regulatory factor 9), una molécula adicional para su función. Este complejo heterotrimérico llamado ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene

Factor 3) inicia la transcripción por unión a distintos ISRE (IFN-stimulated response elements).^{73,74} (Figura 2.6)

A diferencia de las cajas GAS, los elementos ISRE no son secuencias palindromicas, son mas extensas y más variables. Comúnmente un elemento ISRE presenta una secuencia AGTTTC(N2-3)TTCNC/T.



Nature Reviews | Immunology

Figura 2.6: Receptores de interfeon gama y activación de la via clasica de JAK/STAT por interferones tipo I y tipo II. Platanias 2005

2.12 Regulación negativa de los factores de transcripción

2.12.1 Protein inhibitor of activated STAT (PIAS)

Esta familia de proteínas está compuesta por PIAS1, PIASx (también llamada PIAS2), PIAS3 y PIASγ (llamada PIAS4). Su peso molecular oscila entre los 57 y 74 kDa.

Los miembros de la familia PIAS, conservan una identidad secuencial entre si de más del 40%, además de dominios y motivos funcionales conservados. Se han identificado dos isoformas para cada proteína excepto para PIAS1, PIAS α y PIAS β , PIAS3 y PIAS3 β , y PIAS γ y PIAS γ E6^{-44,77,78} (Figura 2.7)

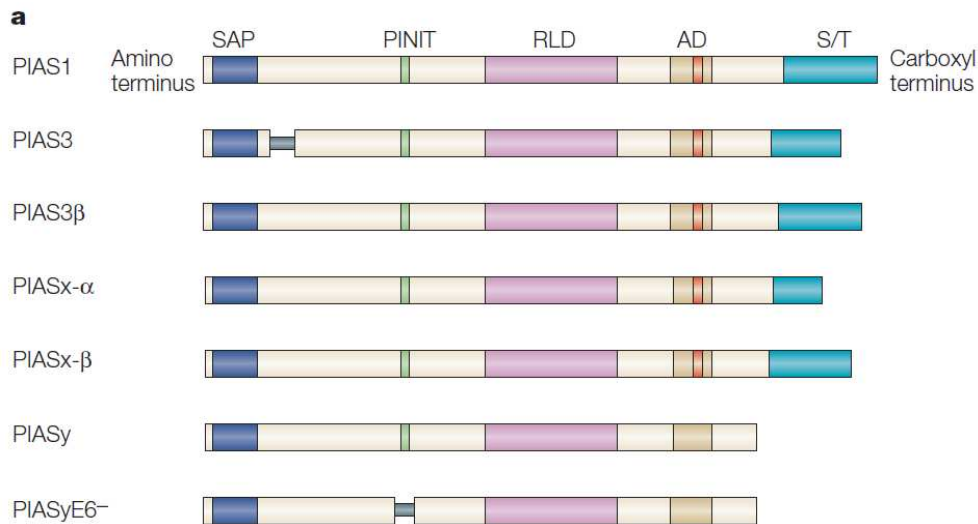


Figura 2.7: Estructura de las proteínas PIAS. Shuai et al; 2005

La actividad reguladora negativa de la transcripción por las proteínas PIAS, se puede dar por cuatro mecanismos moleculares que pueden ser ejecutados tanto en el citoplasma como en el núcleo.

PIAS podría bloquear el anclaje del factor de transcripción. Aunque la base molecular no está clara, PIAS1 puede inhibir la unión de STAT1 y NF- κ B p65 *in vitro*.⁷⁹ (PIAS podría reclutar otros coreguladores como histonas deacetilasas (HDACs) que catalizan la eliminación del grupo acetil del residuo serina en proteínas histónicas y no histónicas y de esta manera reprimir la transcripción a través de la modificación de la cromatina. PIASx- β ha sido reportado por interactuar con HDAC3.⁷⁸ (Figura 2.8)

De otro lado, PIAS podría reprimir la transcripción por promover la sumolación de un factor de transcripción, esta hipótesis está basada en que las proteínas PIAS tienen actividad SUMO-E3 ligasa.⁷⁸

Por último, PIAS podría reprimir la transcripción por secuestro de factores de transcripción en determinadas estructuras nucleares.⁸⁰

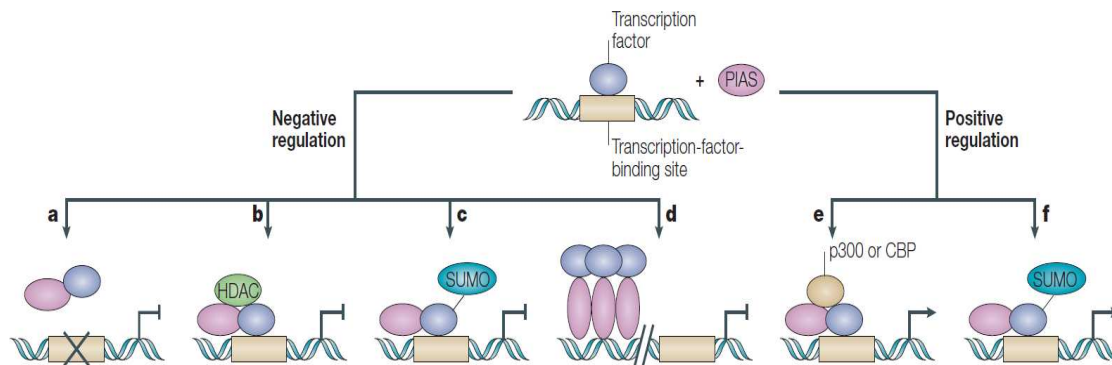


Figura 2.8: Mecanismos utilizados por las proteínas PIAS para lograr su acción supresora en los STAT activados.

2.12.2 Suppressor of cytokine signalling (SOCS)

La familia SOCS esta compuesta por 8 miembros, SOCS1-SOCS7 y un CIS (*cytokine-inducible SH2-containing protein*), con un peso molecular de 24-26 kDa. Estas proteínas tienen un papel importante en la regulación de la señalización de citocinas, proliferación, diferenciación y señalización de las respuestas inmune. Ratones SOCS1^{-/-} mueren prontamente al nacer debido a una hiperinflamación generalizada, en los que se encuentran niveles muy altos de INF- γ .^{81,82}

SOCS1, además, es esencial para un adecuado desarrollo de las células T en el timo. SOCS1 es altamente expresado en las células doble positivas (DP: CD4+CD8+) en las cuales SOCS1 podría mantener un mecanismo seguro para prevenir señales de citocinas pro-supervivencia como la IL-7.⁸³ Se ha mostrado que el desarrollo de timocitos single-positivos, es severamente perturbado en SOCS1^{-/-} con una fuerte inclinación al desarrollo de CD8+.^{84,85}

SOCS3 se considera una proteína clave en la regulación divergente de IL-6 e IL-10. IL-6 es una citocina proinflamatoria que está vinculada con muchas enfermedades, mientras IL-10 es una citocina inmunoreguladora con potente actividad antiinflamatoria en la que la activación de STAT3 juega un papel esencial.^{86,87}

2.12.2.1 Estructura y función reguladora de las proteínas SOCS

En general las proteínas STATs contribuyen significativamente a la transcripción de los genes de CIS, SOCS1 y SOCS3 principalmente, sin embargo también transcriben para los otros miembros de la familia SOCS.⁵⁰

La expresión de SOCS1 y SOCS3 es inducida por eritropoyetina (EPO), IFN γ , y TNF- α ,⁸⁸ y principalmente por STAT1 y STAT3, que respectivamente contribuyen a su transcripción.⁸⁹

En su estructura hay un extremo N-terminal variable (*extended SH2 subdomain (ESS)*), en el cual se encuentra *small kinase inhibitor region (KIR)* presente solo en SOCS 1 y SOCS 3, un dominio central SH2 y en su extremo C-terminal tiene una estructura de 40 aminoácidos conocida como *SOCS-box*.^{88,90} (Figura 2.9a)

Todos los SOCS hacen uso de su dominio SH2 para unirse a residuos de tirosina fosforilados a través de su dominio SH2. De la familia de proteínas SOCS, CIS y SOCS2, se pueden unir a fosfotirosinas de los receptores y así inhibir la vía de transducción de señales por competir con los STATs por el complejo del receptor.⁸²

SOCS1 y SOCS3 son reportados por inhibir la actividad de la vía JAK a través de su dominio KIR. Sin embargo, se sugiere que SOCS1 se une directamente a JAK2 y actúa como un pseudosustrato, mientras SOCS3 se une a los receptores de citocinas con una especial afinidad por los residuos Y757 de la cadena gp130.^{81,89,90} (Figura 2.9b)

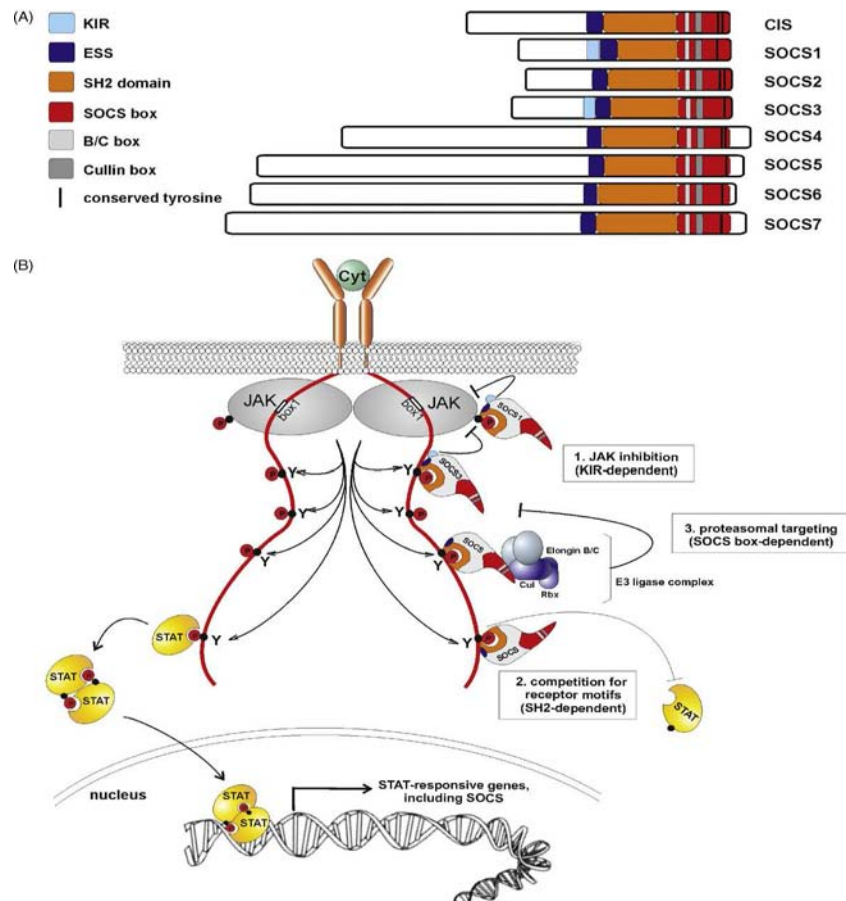


Figura 9: a) Estructura de las proteínas SOCS. B) Sitios de unión que usan las proteínas SOCS para realizar su acción supresora. Piessevax 2008

Las proteínas SOCS pueden regular la transducción de señales uniendo los sustratos de los factores de transcripción a la maquinaria de ubiquitinación, a través de SOCS-box, llevándolo a una degradación proteosomal. Figura 9.7b

SOCS3 está implicado en la regulación negativa de la IL-6, leptina,⁹¹ hormona del crecimiento,⁹² receptores de quimiocinas⁹³ e insulina,⁹⁴ entre otros. Además SOCS3 esta ligada patológicamente a respuestas alérgicas,⁹⁵ enfermedades inflamatorias⁹⁶ y shock endotóxico.⁹⁷

SOCS1 regula negativamente la diferenciación celular tanto de Th1 como Th2 en respuesta a IL-2 e IL-4 respectivamente.⁹⁸ La expresión de SOCS1 es 5 veces más alta en células Th1, que Th2, mientras que SOCS3 se expresa 25 veces más en células Th2,⁹⁹ lo que modificaría el tipo de respuesta T frente a un estímulo.

Utilizando modelos deficientes de STAT3 se ha podido observar un mecanismo compensatorio entre estos. En fibroblastos deficientes en STAT3 estimulados con IL-6, producen una respuesta antiviral con gran cantidad de INF γ debido al incremento en la activación de STAT1 y sobre regulación de genes inducidos por INF γ .^{100,101} Sugiriendo así que el inhibidor SOCS3 que regula la magnitud y duración de activación de STAT1 y STAT3 citoquinoinducida, podría afectar el balance entre la respuesta STAT1 (INF γ) y la respuesta STAT3 (IL-6, IL-10).¹⁰²

En muchas instancias la expresión de las proteínas SOCS se ha mostrado por ser particularmente STAT- dependiente. Así, SOCS1 y SOCS3 son rápidamente inducidos después de la estimulación con citocinas y son prontamente degradadas cuando cesa la señal.⁸⁴

2.13 Modulación farmacológica de la actividad de los STAT

Como se ha mencionado anteriormente, los STAT forman parte crucial en la señalización no solo del sistema inmunitario, sino en el desarrollo de un amplio número de procesos biológicos. Razón por la cual está dotado de controles sincronizados y eficientes por parte de proteínas especializadas en su control, pues la actividad anormal en la señalización de los STAT esta implicada en muchos procesos patológicos.

Una inapropiada regulación de los STATs puede conducir a múltiples enfermedades: STAT1 (Arteroesclerosis y desórdenes inmunológicos), STAT2 (Desórdenes inmunológicos y cáncer), STAT3 (Cáncer), STAT4 (Lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple), STAT5a/b (Leucemia y cáncer) y STAT6 (Asma y alergia). Así como mutaciones en STAT3 conducen al síndrome de hiper Ig E.¹⁰³

Esta condición hace de los STAT un objetivo terapéutico en el cual se ha involucrado fuertemente la industria farmacéutica. En la actualidad existen alrededor de 50 moléculas que modulan la activación de los STAT, ya sea inhibiendo las moléculas que activan los STAT como el AG490 un inhibidor de JAK2, o inhibiendo directamente la dimerización de los STAT como lo hace el STAT3 inhibitor VIII,5,15-DPP.⁵¹

2.14 Heterogeneidad poblacional de los linfocitos T helper CD4+

A finales de la década de los 80, Mosmann and Coffman clasificaron los linfocitos T CD4+ en T helper 1 (Th1), y T helper 2 (Th2) en función de las citocinas que sintetizan.^{104,105} Sin embargo, el repertorio de linfocitos T CD4+ se ha expandido al identificar nuevas subpoblación de células T helper como las T helper 17 (Th17),¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ y las T helper 9 (Th9).^{109,110}

Adicionalmente, la identificación de una subpoblación de células reguladoras (Treg) capaces de moderar y/o suprimir la actividad de las células T helper, minimizando la inflamación de los tejidos y la autoinmunidad,¹¹¹⁻¹¹³ ha dado lugar a la expansión de la dicotomía Th1/Th2 y a una visión más amplia, aunque también más compleja, sobre las poblaciones y funcionalidad de las células T CD4.¹¹⁴

La formación de una población de linfocitos T helper es un proceso complejo influenciado por diversos factores ambientales y genéticos, que intervienen durante el fenómeno de presentación antigénica. Factores como la ruta de entrada del antígeno, el tipo, dosis y estructura física del mismo, la presencia de adyuvantes,^{115,116} el grado de reconocimiento del péptido antigénico por el receptor de la célula T (TCR) y señales coestimuladoras proporcionadas por células presentadoras de antígeno (APCs),¹¹⁷ están implicados en el destino de la célula T.

Sin embargo, datos obtenidos a partir de experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*, usando células humanas y murinas, indican que las citocinas producidas por los sistemas innato y adaptativo y que circundan la célula en el momento de la activación, son determinantes en el destino de la célula T *naive*.^{114,118}

La presencia de determinadas citocinas conlleva a su vez a la activación de algunos factores de transcripción como los STAT, que son determinantes en la diferenciación de las células T naive hacia las diferentes subpoblación de células T helper.^{114,117} (Figura 2.10.)

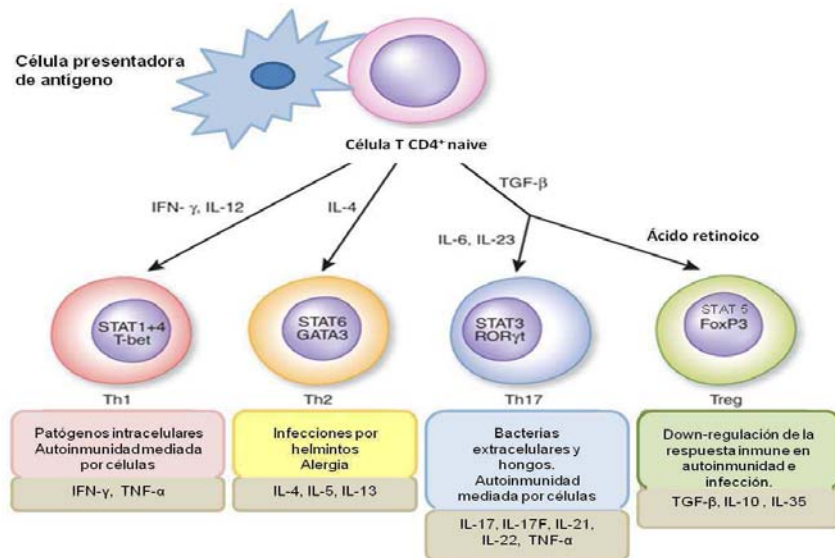


Figura 2.10. Diferenciación de distintas poblaciones de linfocitos T helper CD4+. Se representan los factores básicos que influyen en la diferenciación de los distintos linajes: estímulo antigénico, microambiente de citocinas y factores de transcripción específicos. También se muestra el tipo de respuesta inmune en la que participan, patologías inmunes en las que están implicados, y el perfil de citocinas característico. Turner et al; 2010

2.15 Subpoblaciones Th1/Th2

Una vez se da la activación inicial y el reconocimiento del péptido presentado por una célula presentadora de antígeno en contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la célula T *naive*, puede diferenciar en dos subpoblaciones fenotípicamente distintas; T helper 1 (Th1), y T helper 2 (Th2).

Los requerimientos para alcanzar la polarización hacia cualquiera de las dos subpoblaciones Th1 o Th2, son probablemente diferentes en muchos aspectos. Las respuestas Th1, requiere un tiempo corto de activación del receptor de la célula T (TCR), y requieren poca división celular para montar una respuesta polarizada detectable.^{119,120} Adicionalmente, la polarización Th1 requiere un estímulo de alta afinidad y altas concentraciones de antígeno en comparación con las necesarias para la activación Th2.¹²¹

2.15.1 Subpoblación de células CD4 T helper 1 (Th1)

La interleucina 12 (IL12) producida por los monocitos/macrófagos y células dendríticas (DC) activadas, y el IFN γ producido por las células natural killer (NK),¹¹⁸ son factores

dominantes en la promoción de la polarización hacia Th1 tanto en humanos como en ratones.

Las células de la subpoblación Th1 se caracterizan por la producción de interleucina 2 (IL2) y de interferon gama ($IFN\gamma$),^{117,122} la inducción y activación de macrófagos, y son muy efectivas en el control de infecciones con patógenos intracelulares.^{117,118}

2.15.1.1 Implicación de STAT en la diferenciación Th1

IL-12/STAT4 pathway

STAT4 es el responsable de las funciones biológicas mediadas por IL12 incluyendo la diferenciación Th1 y la producción de $IFN\gamma$.^{123,124} Cultivos de células Th1 de pacientes con linfoma que han adquirido una deficiencia en STAT4, presentan una disminución en la expresión de los genes Th1; $IFN\gamma$, cadena beta 2 del receptor de interleucina 12 ($IL12R\beta2$), y factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) comparados con cultivos de células Th1 control.¹²³

Una vez IL12 se une a las cadenas beta 1 y beta 2 de su receptor ($IL12R\beta1$ e $IL12R\beta2$), STAT4 es activado.¹²⁴ Subsecuentemente dimeriza y transloca al núcleo donde se une y promueve la expresión de múltiples genes Th1 incluyendo $IFN\gamma$.¹²⁴ STAT4, además induce modificación de la cromatina favoreciendo la actividad del factor de transcripción T-bet.

La expresión de *T-bet* es inducida por señalización del TCR y es fuertemente elevada por la activación del STAT1, el cual ocurre en respuesta a la producción auto/paracrina de $IFN\gamma$.¹²⁵

Uno de los genes inducidos por T-bet es *Runx3*, que junto con T-bet promueven la inducción del gen de $IFN\gamma$.¹²⁶ *Runx3* y T-bet también se unen para silenciar el gen de la interleucina 4 (IL4), resultando en la represión transcripcional de los genes Th2.¹²⁷ T-bet promueve la expresión de $IL12R\beta$,¹²⁶ incrementando la respuesta a IL12.

Adicionalmente, T-bet presenta actividad represora de la transcripción del gen de la interleucina 2 (*IL2*)¹²⁸ y antagoniza GATA3.¹²⁶

En ausencia de T-bet, la expresión de IFN γ y respuestas Th1 son altamente susceptibles a ser suprimidas por IL6 y por el *Transforming growth factor beta* (TGF β), favoreciendo fuertemente la respuesta Th17.¹²⁹

2.15.2 Subpoblación de células CD4 T helper 2 (Th2)

La desviación de las células T *naive* hacia Th2 está determinada por la IL4, que es secretada por las células CD4 *naive* y que actúa de forma autocrina para inducir la desviación Th2.^{130,131} Esta población se caracteriza por la síntesis elevada de IL4,¹³² IL5¹³³ e IL13.¹³⁴

Las células Th2 están implicadas en la respuesta inmune contra patógenos y parásitos extracelulares,^{117,126} en la respuesta inmune humoral¹¹⁸ y en el desarrollo de enfermedades alérgicas como el asma.¹³⁵ La secreción de IL4 favorece la interacción entre las células T y B y la síntesis de IgE por parte de las células B.^{132,136} Así mismo, junto con la IL13, la IL4 induce activación alternativa de macrófagos.^{134,137}

Las células Th2 reclutan eosinófilos a través de la IL-5,^{133,138} activan mastocitos a través de la IL-9^{139,140} y junto con la IL13, actúan en las células epiteliales.^{141,142} También produce IL-10, IL-21 e IL-23,^{143,144} las cuales están involucradas en la regulación de la magnitud de la respuesta Th2.

2.15.2.1 Implicación de STAT en la diferenciación Th2

IL-4/STAT6 pathway

En cultivos de células T *naive* la presencia de IL4 exógeno genera una desviación clara hacia Th2, indicando la importancia de la IL4 en el destino de las células T *naive* en el cultivo.¹⁴⁵ De igual manera se ha observado el papel relevante de la IL4 en la respuesta Th2 *in vivo*, en ratones IL4 deficientes, disminuye drásticamente la capacidad de controlar la infección con *Nippostrongylus brasiliensis*.¹⁴⁶

Además de las células T, varios tipos celulares, incluyendo basófilos,^{147,148} mastocitos,^{149,150} células T *natural killer*¹⁵¹ y células T *helper* foliculares (Thf),¹³⁰ son fuentes potenciales *in vivo* de IL-4 para la diferenciación Th2.

Una vez las células T *naive* son estimuladas a través del TCR, producen IL2, activando STAT5, este trasloca al núcleo y junto con GATA3 incrementa la accesibilidad al gen de la *IL4* facilitando la producción temprana de IL4.¹⁵²

Cuando la IL4 se une a su receptor, activa la fosforilación de STAT6, este dimeriza y transloca al núcleo donde se une y activa los genes de *IL4*, *IL5*, *IL13* y *GATA3*.¹⁵³⁻¹⁵⁵ STAT6 también activa el promotor distal y proximal del gen *GATA-3*, llevando a la expresión de *GATA3-1a* y *GATA3-1b* respectivamente.¹⁵⁶ *GATA3* inhibe la señalización de IL12 reprimiendo la expresión de *IL-12Rβ2*, favoreciendo la desviación Th2.¹⁵⁷

STAT6 junto con *GATA3* disminuye la metilación en la histona 3 en lisina 9 (H3K9) y aumenta la metilación de la histona 3 lisina 27 (H3K27), dos mecanismos para silenciar el gen de IFNγ y favorecer la respuesta Th2.¹⁵⁸

2.16 CD4 T helper 17 (Th17) cells

La activación de células T en presencia de interleucina 23 (IL-23), llevó a la expansión de células T productoras de interleucina 17 (IL-17), resultando en la identificación de la subpoblación Th17.¹⁵⁹

La diferenciación Th17 requiere de IL-23 *in vivo* pero no *in Vitro*¹⁶⁰ y la función de interleucina 23 (IL-23), es en parte dependiente de interleucina 21 (IL-21). IL-21, principalmente producida por células T CD4 estimuladas con IL-6,^{161,162} activa a través de su receptor la vía STAT1/STAT3^{163,164} así IL-21 eleva la expresión de RORγt que a la vez induce la expresión de IL-21 contribuyendo así con una retroalimentación positiva paracrina.¹⁶⁵

IL-2, puede inhibir la diferenciación Th17 a través de la vía STAT5 que se une directamente al promotor de *IL-17*. IL-2 además, favorece la reducción en la expresión de ROR γ t a la vez que favorece la expresión de TGF β y Foxp3, sugiriendo que IL-2 podría inhibir la diferenciación Th17 por influencia en el balance ROR γ t-Foxp3.¹⁶⁶

2.17 Células T reguladoras

La modulación de la respuesta inmune es un proceso complejo que involucra la tolerancia frente a auto antígeno, sin perder la capacidad de responder frente a microorganismos patógenos y agresiones medioambientales. Para este fin, el sistema inmunológico ha desarrollado mecanismos de control como la eliminación clonal y la inducción de anergia,^{167,168} y la inducción de células T reguladoras^{112,169}

Hasta la fecha, se han descrito varias poblaciones de células T reguladoras, entre las que se encuentran las células T CD8+ reguladoras (CD8+Tregs),^{170,171} las células T *natural killer* reguladoras (NKT reguladoras),^{172,173} y las células T CD4+ reguladoras (Treg).¹⁶⁹

Las células Treg se han clasificado en dos grandes subpoblaciones de acuerdo a la función, especificidad y mecanismo de acción: Las células T reguladoras naturales (nTregs) y las células T inducidas o adaptativas (iTreg).^{112,172-174}

2.17.1 Células T reguladoras naturales CD4+ CD25+ (nTregs)

Las células T reguladoras naturales (nTregs) se desarrollan durante un proceso normal de maduración de las células T CD4+ en el timo. Típicamente expresan altos niveles del receptor alfa de interleucina 2 (IL-2R α) (CD25), *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA4) y factor de *transcripción forkhead box p3* (Foxp3) y *Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor* GITR.¹⁷⁵

Los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de las nTreg necesitan tres señales básicas.¹⁷⁶

Primero, la señalización vía receptor de la célula T (TCR) ya que TCRs con alta afinidad por auto antígenos son preferencialmente desviados hacia el linaje nTreg.^{177,178}

Segundo, La coestimulación vía CD28 que podría maximizar la intensidad de la señal en aquellos TCR que presentan baja afinidad antigénica.^{179,180}

Tercero, las señales a través del receptor de la IL-2.^{181,182} Conjuntamente la señalización vía TCR y CD28 generan unas nTreg progenitoras que carecen de la expresión de Foxp3, posteriormente la señalización vía, IL2/STAT5 que se une directamente al promotor de Foxp3,^{175,183} resulta en la rápida conversión de las nTreg progenitoras en nTregs maduras que expresan FOXP3⁺¹⁷⁶

Funcionalmente, las células Treg suprimen la respuesta inmune a través de muchos mecanismos que pueden ser agrupados en cuatro modos de acción. I) Secreción de citocinas inhibitoras, II) Actividad citolítica, III) Disrupción del metabolismo celular, IV) Por contacto y modulando las células dendríticas,^{112,184} (Figura 2.11)

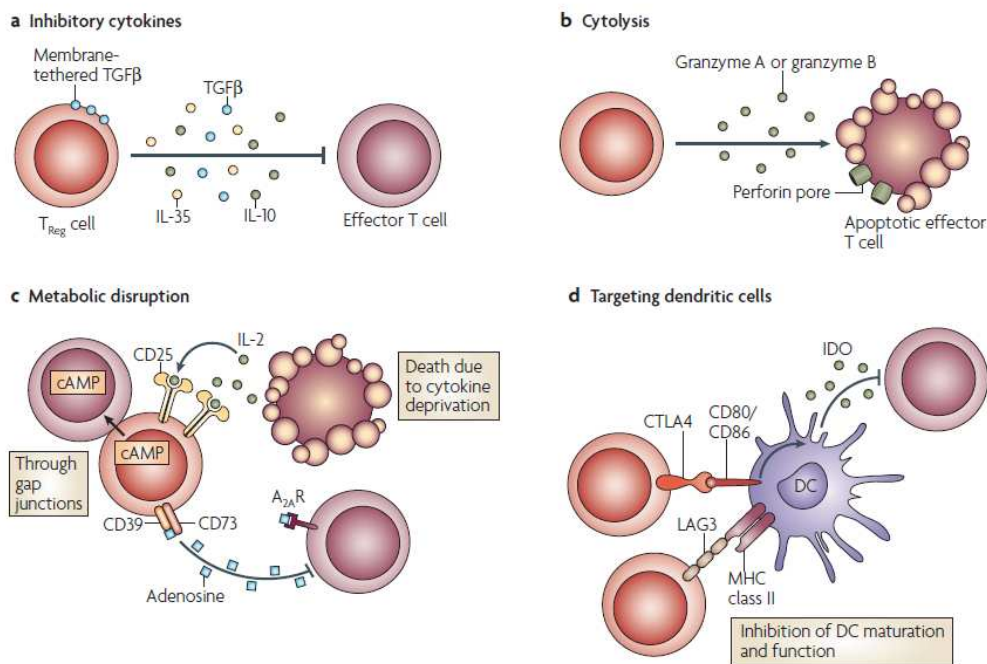


Figura 2.11: Descripción gráfica de los diferentes mecanismos de supresión utilizados por las Treg. Vignali et al 2008

2.17.1.1 Factores de transcripción y células T reguladoras

La conversión de las progenitoras FOXP3⁻ a Treg FOXP3⁺ en el timo ocurre independientemente del TCR pero dependiente de IL2/STAT5.¹⁸⁵

La unión de IL-2 a su receptor induce a la fosforilación, por JAK1 y JAK3, de tres residuos de tirosina localizados en el dominio citoplasmático del IL2R β . La fosforilación de la tirosina 510 y en menor grado tirosina 392 favorece la activación de STAT5. mientras que la fosforilación de la tirosina-338 facilita la activación otras tirosin quinasas como RAS/MAPK/ ERK y PI3K/AKT.¹⁷⁶

STAT5 fosforilado dimeriza y transloca al núcleo para unirse al promotor y al primer intrón del gen *Foxp3* activando su transcripción.¹⁸³ Adicionalmente STAT5 influye en la supervivencia de las Treg por regulación de la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2R) y de la proteína antiapoptótica.¹⁸⁶

A diferencia de STAT 5 que favorece la expresión de FOXP3, otros STAT influyen negativamente en FOXP3, como STAT6 y STAT 4 que una vez son activados por IL-4 e y IL-12 respectivamente se unen al DNA afectando la remodelación de la cromatina en el gen FOXP3 disminuyendo así su expresión.^{187,188}

Aunque STAT 3 activado por IL-6 inhibe la expresión de *FOXP3*, (REF. 91). cuando se hizo delección de *Stat3* a una población Treg de ratones, esta perdió su capacidad para regular la respuesta patogénica de las Th17 mientras que la capacidad supresora sobre las Th1 y Th2 se mantuvo.¹⁸⁹ Este dato podría indicar que la activación de STAT 3 en Treg dota a estas células con la habilidad para suprimir específicamente las respuestas de Th17.

Análisis de la expresión genica de células Treg deficientes en STAT 3, muestran que en estas células disminuye la expresión de genes que contribuyen potencialmente en la función supresora de las Treg como lo son *Prfl* (perforin 1), *Gzmb* (granzyme B), *Klrg1* (killer cell lectin-like receptor G1), *Ccr6* (CC-chemokine receptor 6), entre otros.¹⁸⁶

2.17.2 Células T reguladoras inducidas o adaptativas

Varias clases de células T CD4⁺ han sido descritas, las cuales tienen actividad reguladora principalmente a través de la secreción de citocinas supresoras como la IL-10 y el *Transforming growth Factor beta* (TGF β).^{112,174} De estas células, que se generan

en la periferia a partir de las convencionales células T CD4+CD25- se han descrito dos poblaciones: Las células productoras de TGF- β (Th3),^{174,190} y las células tipo 1 productoras de IL-10 (Tr1),^{174,191} que no expresan Foxp3 pero tienen una función reguladora comparable a la aportada por las nTreg.¹⁹²

Las células Tr1 pueden ser generadas *in vitro* e *in vivo* una vez la célula T *naive* es activada con antígeno en presencia de IL-10. Las células Tr1 son caracterizadas por un perfil de citocinas que es diferente al de las Th1 y Th2, producen elevados niveles de IL-10, TGF- β e IL-5, niveles bajos de IFN- γ e IL-2 y muy bajos de IL-4.^{193,194}

Estas células T CD4+ IL10+ Foxp3-, son reconocidas fenotípicamente por la coexpresión de CD49b y *Lymphocyte-activation gene 3* (LAG3) en su membrana.¹⁹⁵

Su actividad supresora al igual que las células Treg, está dada por actividad citolítica, disrupción del metabolismo celular, y por contacto posiblemente a través de CTLA-4,¹⁹⁶ sin embargo, el mecanismo principal por el que las células Tr1 controlan la respuesta inmune, es por la secreción de altas cantidades de IL-10.¹⁹⁷

2.17.2.1 Factores de transcripción y células Tr1

IL-27 se ha presentado como la citocina clave en la generación de células Tr1, por un lado suprime las células Treg inducidas por TGF- β -, mientras que induce IL-10, IFN γ en células T, un fenotipo de las células Tr1 arriba mencionadas.

El papel de IL-27 fue demostrado en ratones, durante procesos de infección con el virus de la influenza IL-27 genera células que inhiben las células Th17 por secreción de IL-10 e IFN γ .¹⁹⁸

La activación de IL-27, lleva a fosforilación de JAK 1 y activación de STAT 1. Este por su parte induce la expresión de T-bet, y T-bet no solo induce la expresión de IFN γ ,¹²⁶ si no que también reprime el programa genético Th17.¹⁹⁹

La activación de STAT3 y STAT1 mediada por IL-27 son esenciales para iniciar la secreción de IL-10 en células T CD4+.²⁰⁰ La activación sostenida de STAT3 lleva a la

inducción del factor de transcripción Maf.²⁰¹ Este factor de transcripción es esencial en la síntesis de IL-10 inducida por IL-27.²⁰²

En adición a Maf, la producción de IL-10 inducida por IL-27 está regulada por un activación de el factor de transcripción *Aryl hydrocarbon receptor* (AhR) que se une a Maf resultando en un complejo que induce *IL-10*.²⁰³

3. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Los microorganismos han desarrollado una serie de estrategias para asegurar su supervivencia. Tras la gran hiperactivación inicial del sistema inmune con la consiguiente producción de citocinas, los superantígenos son capaces de inducir tolerancia periférica *in vivo*, lo que pone de manifiesto que los microorganismos podrían estar utilizando estas moléculas para inducir tolerancia frente a sus componentes en el huésped. Dicho estado no es el resultado de un simple bloqueo de la activación de las células T por superantígenos, sino que es el resultado de la generación de células reguladoras. Esta tolerancia puede ser la consecuencia de la capacidad que tienen los superantígenos de cambiar los programas de activación transcripcional de las células en respuesta a diferentes estímulos (superantígenos o citocinas, entre otros). Así mientras otros autores han puesto de manifiesto dichos cambios en la respuesta del receptor de la célula T a superantígenos, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la vía IFN- γ /STAT1 está claramente afectada en la respuesta a dichos superantígenos. Por tanto, el análisis de las alteraciones que los superantígenos inducen en los factores de transcripción de la familia STAT puede ser de gran importancia para entender la respuesta a dichos superantígenos y a la posterior generación de tolerancia. Este conocimiento será de gran utilidad para entender los procesos patológicos debidos a dichos microorganismos y plantear aproximaciones terapéuticas adecuadas. Además, los datos obtenidos sobre generación de tolerancia podrían tener aplicabilidad en el control de procesos autoinmunes y de rechazo en trasplantes

Objetivos.

Objetivo principal:

El objetivo general del presente estudio es conocer el papel que distintos factores de transcripción de la familia STAT, concretamente STAT1 y STAT3, juegan en la en el shock séptico y en generación de tolerancia que se desarrollan en la respuesta al superantígeno SEB.

Objetivos específicos:

1. Analizar los cambios en la producción de citocinas y en la activación de STAT1 y STAT3 que ocurren tras la respuesta a SEB en los modelos de shock séptico y tolerancia en ratón y su correlación con la supervivencia observada en dichos modelos.
2. Evaluar los efectos del tratamiento con anticuerpos anti-IL-6 e inhibidores de la vía JAK/STAT, concretamente AG490 y *STAT3 VIII inhibitor 5, 15, DPP*, en la producción de citocinas y en la activación de STAT1 y STAT3 que ocurren tras la respuesta a SEB en los modelos de shock Tóxico y tolerancia y su correlación con la supervivencia observada en dichos modelos.
3. Analizar las características de los linfocitos CD4+ y su capacidad de inducir tolerancia en experimentos de transferencia celular.
4. Evaluar los cambios en expresión de genes implicados en la activación de células T y generación de células reguladoras tras el tratamiento con SEB y su regulación por STAT1 y STAT3.

3. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Los microorganismos han desarrollado una serie de estrategias para asegurar su supervivencia. Tras la gran hiperactivación inicial del sistema inmune con la consiguiente producción de citocinas, los superantígenos son capaces de inducir tolerancia periférica *in vivo*, lo que pone de manifiesto que los microorganismos podrían estar utilizando estas moléculas para inducir tolerancia frente a sus componentes en el huésped. Dicho estado no es el resultado de un simple bloqueo de la activación de las células T por superantígenos, sino que es el resultado de la generación de células reguladoras. Esta tolerancia puede ser la consecuencia de la capacidad que tienen los superantígenos de cambiar los programas de activación transcripcional de las células en respuesta a diferentes estímulos (superantígenos o citocinas, entre otros). Así mientras otros autores han puesto de manifiesto dichos cambios en la respuesta del receptor de la célula T a superantígenos, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la vía IFN- γ /STAT1 está claramente afectada en la respuesta a dichos superantígenos. Por tanto, el análisis de las alteraciones que los superantígenos inducen en los factores de transcripción de la familia STAT puede ser de gran importancia para entender la respuesta a dichos superantígenos y a la posterior generación de tolerancia. Este conocimiento será de gran utilidad para entender los procesos patológicos debidos a dichos microorganismos y plantear aproximaciones terapéuticas adecuadas. Además, los datos obtenidos sobre generación de tolerancia podrían tener aplicabilidad en el control de procesos autoinmunes y de rechazo en trasplantes

Objetivos.

Objetivo principal:

El objetivo general del presente estudio es conocer el papel que distintos factores de transcripción de la familia STAT, concretamente STAT1 y STAT3, juegan en la en el shock séptico y en generación de tolerancia que se desarrollan en la respuesta al superantígeno SEB.

Objetivos específicos:

5. Analizar los cambios en la producción de citocinas y en la activación de STAT1 y STAT3 que ocurren tras la respuesta a SEB en los modelos de shock séptico y tolerancia en ratón y su correlación con la supervivencia observada en dichos modelos.

6. Evaluar los efectos del tratamiento con anticuerpos anti-IL-6 e inhibidores de la vía JAK/STAT, concretamente AG490 y *STAT3 VIII inhibitor 5, 15, DPP*, en la producción de citocinas y en la activación de STAT1 y STAT3 que ocurren tras la respuesta a SEB en los modelos de shock Tóxico y tolerancia y su correlación con la supervivencia observada en dichos modelos.

7. Analizar las características de los linfocitos CD4+ y su capacidad de inducir tolerancia en experimentos de transferencia celular.

8. Evaluar los cambios en expresión de genes implicados en la activación de células T y generación de células reguladoras tras el tratamiento con SEB y su regulación por STAT1 y STAT3.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales de experimentación

Para el estudio fueron adquiridos ratones hembra de la cepa BALB/c (H2^d) de seis semanas de edad a Harlan Fauna Iberica. Los animales fueron alojados en el animalario del Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y mantenidos a temperatura constante de 22°C, con agua y alimento *ad libitum*, con un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas.

Los ratones fueron vinculados al ensayo cuando alcanzaron 8 a 12 semanas de edad y un peso de 23 ± 2 gramos.

Durante todos los procedimientos se siguieron las normas éticas institucionales que velan por el bienestar y cuidado de los animales en la investigación científica.

4.2 Diseño de los tratamientos experimentales.

4.2.1 Experimentación *in vivo*.

En todos los tratamientos, la dosis del fármaco se instilo intraperitonealmente disuelto en 100µl de diluyente, excepto para el anticuerpo anti IL6 en el que se uso un volumen de 200 µl.

La Enterotoxina estafilocócica B (SEB) fue adquirida a Toxin Techonologies. La toxina fue resuspendida en solución salina fisiológica 0,9%, estéril, a concentraciones de 25µg/100µl (Dosis alta) y de 3µg/100µl (Dosis baja).

La D-galactosamina (SIGMA) se reconstituyo en solución salina fisiológica 0,9%, estéril, a una concentración de trabajo de 25 mg/100µl.

El Inhibidor específico de JAK2 (AG490) (Clabichem), se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 2mg/ml. Justo antes de la instilación, el AG490 fue diluido en solución salina fisiológica hasta obtener una concentración de trabajo de 40µg/100µl.

Inhibidor específico de STAT3, *STAT3 Inhibitor VIII 5,15-DPP* (Calbichem), en adelante iSTAT3, se reconstituyó en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 100µg/100µl.

El anticuerpo monoclonal de rata anti-mouse IL6 (clon MP5-20F) y su control de isotipo fueron adquiridos a R&D SYSTEMS™ y diluidos a una concentración de 250µg/100µl.

Todos los reactivos fueron mantenidos a -80°C hasta su utilización.

Para la obtención de muestras, todos los ratones tratados fueron anestesiados vía inalatoria con Forane® (Abbott Laboratories SA, Madrid), sacrificados por sobredosis y exanguinados por punción intracardiaca.

Para el desarrollo del trabajo se diseñaron los siguientes grupos experimentales. (Figura 4.1)

4.2.1.1 Tratamiento de shock tóxico (SK): Vía intraperitoneal (IP), los ratones recibieron una única dosis alta de la Enterotoxina estafilocócica B (SEB), junto a una dosis de 25mg de D-galactosamina

4.2.1.2 Tratamiento de shock tóxico AG490 (ASK): Vía intraperitoneal (IP), los ratones recibieron una dosis del inhibidor JAK2. Una hora más tarde se instauró el tratamiento de shock tóxico.

4.2.1.3 Tratamiento de shock tóxico iSTAT3 (SSK): Vía intraperitoneal (IP), los ratones recibieron una dosis del inhibidor STATTIC. Una hora más tarde se instauró el tratamiento de shock tóxico.

4.2.1.4 Tratamiento de shock tóxico anti IL-6 (AL6SK): Vía intraperitoneal (IP), los ratones recibieron una dosis de 500µg de anti IL-6. Una hora más tarde se instauró el tratamiento de shock tóxico.

4.2.1.5 Tratamiento tolerogénico (Tol): Vía intraperitoneal (IP) los ratones recibieron 3 dosis bajas de SEB, una dosis cada 72 horas. Pasadas 72 horas de la última dosis baja de SEB, los ratones recibieron el tratamiento de shock tóxico.

4.2.1.6 Tratamiento tolerogénico AG490 (ATol): Vía intraperitoneal (IP) los ratones recibían una dosis del inhibidor AG490 una hora antes de recibir las dosis de SEB de

acuerdo con el tratamiento tolerogénico. Pasadas 72 horas de la última dosis baja de SEB, los ratones recibieron el tratamiento de shock tóxico.

4.2.1.7 Tratamiento tolerogénico iSTAT3 (STol): Vía intraperitoneal (IP) los ratones recibían una dosis del inhibidor de STAT3 una hora antes de recibir las dosis de SEB de acuerdo con el tratamiento tolerogénico. Pasadas 72 horas de la última dosis baja de SEB, los ratones recibieron el tratamiento de shock tóxico.

Para evaluar los posibles cambios generados tras la inoculación de cada dosis que lleva a la tolerancia, se generaron subgrupos que se denominaron como T y se les adjudicó un número que corresponde al número de dosis bajas que recibe, así los ratones que reciben una dosis baja serán los **T1**, los que reciben dos dosis serán **T2** y los que reciben tres dosis bajas, serán **T3**. En el caso de los ratones del grupo tolerogénico en el que se usa un inhibidor, la letra T estará antecedida por las iniciales del inhibidor, siendo **AT1** para los ratones que reciben una dosis de AG490 y una dosis baja de SEB, **STT1** para los ratones que reciben una dosis de STAT3 Inhibidor y una dosis baja de SEB, y así sucesivamente.

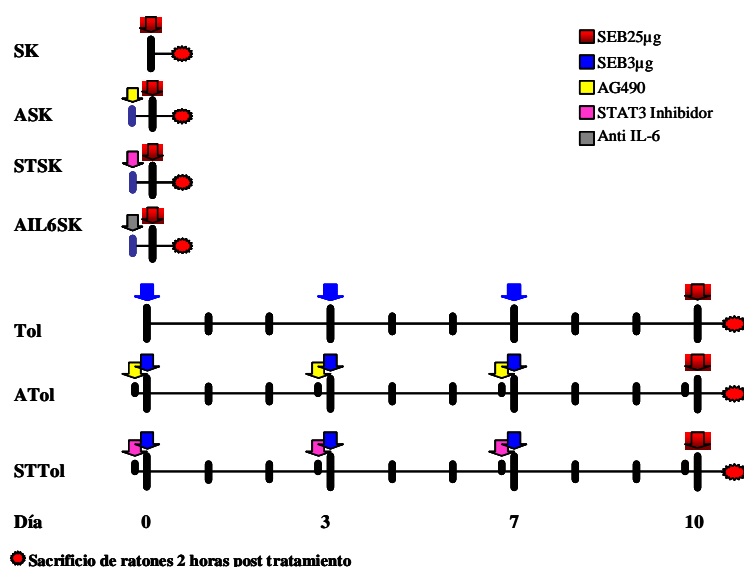


Figura 4.1 Esquema de los tratamientos instaurados en ratones. **SK:** Shock tóxico, **ASK:** Shock tóxico en ratones pretratado con AG490, **STSK:** Shock tóxico en ratones pretratado con *STAT3 inhibitor VIII,5,15, DPP*, **AIL6SK:** Shock tóxico en ratones pretratados con anti IL-6, **Tol:** Ratones tolerizados, **ATol:** Ratones tolerizados pretratados con AG490 durante el proceso de tolerización, **STTol:** Ratones tolerizados pretratados con *STAT3 inhibitor VIII, 5,15, DPP* durante el proceso de tolerización.

4.2.1.8 Tratamiento control: los ratones recibieron suero fisiológico estéril vía intraperitoneal (IP).

4.2.1.9 Tratamiento control de isotipo (IIL6SK): Vía intraperitoneal (IP), los ratones recibieron 500µg del control de isotipo Rat IgG y una hora más tarde se instauró el tratamiento de shock tóxico.

4.2.1.10 Tratamiento D-galactosamina (Gal): Vía intraperitoneal (IP), los ratones recibieron una única dosis de 25mg de D-galactosamina

Para evaluar y determinar los índices de morbilidad/mortalidad, los ratones fueron mantenidos en observación hasta las 96 horas posteriores a la inducción del shock tóxico.

4.3 Extracción de sangre y obtención de suero

Se obtuvieron muestras a las 2, 24 y 72 horas post tratamiento.

A los ratones sacrificados se les extrajo la máxima cantidad de sangre posible mediante punción cardíaca con jeringas icogamma plus® de 1ml (NOVICO S.p.A. Ascoli Piceno, Italia). La sangre fue trasvasada a un tubo eppendorf y dejada 1 hora a temperatura ambiente, pasado este tiempo se centrifugo durante 10 minutos a temperatura ambiente a 2000 rpm. El suero fue retirado y congelado a -40°C hasta su posterior análisis.

4.4 Obtención y purificación de los esplenocitos murinos

El bazo de los ratones sacrificados se extrajo mediante laparotomía y se suspendió en 500µl de PBS frío. Posteriormente se traslado a una placa de petri de 2 pulgadas de radio (NUNCLON™, Roskilde, Dinamarca) y se sumergió en 3ml de PBS frío. A continuación, se hizo un corte en uno de los extremos del bazo y se disgrego mecánicamente con la ayuda de agujas 22G (BD Micro-Fine™, Becton Dickinson, S.A., Madrid). Con una jeringa de 5 ml (BD Discardit™ II, Becton Dickinson, S.A., Huesca), el materias obtenido se aspiró y descargo en la placa de petri de 3 a 5 veces para terminar de disgregar el bazo. Posteriormente la solución de los esplenocitos se traspaso a un tubo falcon de 15ml, se dejó reposar por 5 minutos en hielo para permitir que las fibras y restos de capsula del bazo sedimentaran por gravedad.

Posteriormente el sobrenadante se paso a otro tubo falcon y se centrifugo durante 5 minutos a 1750 rpm a 4°C para sedimentar las células. El pellet se resuspendió en 1 ml de *Red Blood cell Lysing Buffer* (SIGMA®) y se dejó 1 minuto en agitación suave a temperatura ambiente para lisar los eritrocitos, seguido se adicionaron 5 ml de PBS para detener la reacción de lisis y se centrifugo con las mismas condiciones mencionadas. Se

realizaron dos lavados mas con 10 ml PBS, en el intermedio de estos se tomaron 10 μ L de suspensión celular para hacer una dilución 1:10 con PBS, de la cual se realizó un recuento celular en la cámara Neubauer (KOVA® GLASSTIC® SLIDE 10 WITH GRIDS, California, USA) haciendo un dilución 1:2 con azul tripan 0,4% (SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA).

Tras el recuento celular y después del ultimo lavado, los esplenocitos se resuspendieron a una concentración de 1x10⁷ células por ml (En adelante suspensión celular madre).

Partiendo de esta suspensión celular madre, se hicieron las diluciones o se concentraron los esplenocitos para obtener el número de células necesarias para desarrollar cada experimento tal como se indica en su respectivo apartado.

4.5 Diseño de los tratamientos experimentales *in vitro*.

4.5.1 Aislamiento de células T CD4+

Las células T CD4+ fueron obtenidas por selección negativa a partir de esplenocitos totales, mediante el uso del Mouse *CD4+ T Cell Isolation Kit* (STEMCELL Technologies). Este procedimiento se desarrolló en condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar.

Los esplenocitos totales fueron resuspendidos a una concentración de 1x10⁸ células por ml del *buffer* de separación (PBS libre de Ca⁺⁺, Mg⁺ suplementado con suero fetal bovino (FBS) 2% y EDTA 1mM).

La suspensión celular se trasvasó a un tubo de poliestireno 5ml de 12x77mm (FalconTM 5 ml Polystyrene Round –Bottom tubes BD Bioscience) e inmediatamente se le adicionaron 50 μ l/ml de suero normal de rata y 50 μ l/ml de *EasySepTM Mouse CD4+T cell Isolation Cocktail* y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se adicionaron 75 μ l/ml de *EasySepTM Streptavidin RapidSpheresTM 50001* a la muestra, se mezcló y se incubó durante 5 minutos más a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, se adiciono *buffer* de separación a la suspensión hasta completar un volumen total de 2,5ml. Luego el tubo se introdujo dentro del *EasysepTM Magnet* y se mantuvo allí durante 2,5 minutos a temperatura ambiente.

El *EasysepTM Magnet* se invirtió dejando caer en un tubo de 15 ml el líquido que contiene las células deseadas.

Las células se resuspendieron con PBS en un total de 10 ml, se tomaron 10µL de suspensión para hacer recuento celular en la cámara Neubauer haciendo un dilución 1:2 con azul tripan 0,4%.

La pureza y recuperación de células T CD4+ fueron evaluadas por citometría de flujo, para ello, 5×10^4 células fueron marcadas con anti-CD3 PECy7 y anti-CD4 PE, siguiendo el protocolo de marcaje celular que se describirá en el apartado de citometría de flujo.

Para obtener los extractos proteicos de las células CD4+ se siguieron las indicaciones del apartado pertinente.

4.5.2 Transferencia adoptiva de esplenocitos e inducción del shock tóxico.

4.5.2.1 Transferencia adoptiva de esplenocitos

16 ratones no tratados recibieron vía IP 5×10^7 esplenocitos totales ó 2×10^7 células T CD4+ purificadas, provenientes de ratones sacrificados 72 horas después de recibir el tratamiento control y/o de ser tolerizados con tres dosis bajas de SEB, ratones T3.

Para la transferencia de esplenocitos totales, las células previamente obtenidas fueron lavadas 3 veces con solución salina fisiológica 0,9% a 1750 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 500µl de solución salina fisiológica 0,9% y fueron transferidas.

Para la transferencia de células T CD4+, las células fueron obtenidas por selección negativa a partir de esplenocitos totales, mediante el uso del Mouse CD4+ T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies), Tal como se describe en el apartado 4.9.

Una vez aisladas, 2×10^7 células T CD4⁺ fueron lavadas 3 veces con solución salina fisiológica 0,9% a 1750 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 500µl de solución salina fisiológica 0,9% para ser transferidas.

4.5.2.2 Inducción del shock tóxico.

Tras 24 horas de haber recibido la transferencia de esplenocitos totales o células T CD4⁺, los ratones recibieron una única dosis alta de la SEB, junto a una dosis de 25mg de D-galactosamina. 8 ratones fueron sacrificados 2 horas post inducción del shock tóxico. Las muestras de sangre fueron obtenidas y tratadas como se menciona en los apartados 4.3. Para evaluar la morbilidad/mortalidad, los 8 ratones restantes fueron observados durante las siguientes 96 horas.

4.5.3 Cultivo de esplenocitos

En todos los cultivos, los esplenocitos procedían de ratones control, ratones T3 o ratones T3 pretratados con AG490 sacrificados 72 horas después del tratamiento. Los esplenocitos fueron cultivados y estimulados en placas de 96 pozos fondo U (Nunclon surface CAT 163320) a razón de 3×10^5 células por pozo en 250µl de medio de cultivo RPMI suplementado con L-Glutamina, streptomycin y 10% de suero fetal bovino (FBS) e incubados a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO₂.

4.5.3.1 Estimulos *in vitro*

Para determinar la dosis óptima de SEB a utilizar en los cultivos, esplenocitos de ratones control fueron cultivadas y estimuladas con SEB a 1, 2, 5 y 10µg/ml. Los sobrenadantes fueron colectados a las 24, 48 y 72 horas de cultivo y conservados a -20 °C hasta la determinación de la concentración de citocinas.

Las células de los ratones control, de los ratones tolerizados y de los tolerizados pretratados con AG490, fueron cultivadas sin estímulo o estimuladas con SEB (2µg/ml), o con anti-CD3 (Clon 145-2C11 BD bioscience) (2µg/ml) inmovilizado y anti-CD28 (Clon 37.51 eBioscience) (1µg/ml).

En los estímulos con CD3, las placas de 96 pozos fueron cubiertas con 200 μ l de PBS con una concentración de anti-CD3 de 2 μ g/ml e incubadas a 4 °C durante la noche.

Los sobrenadantes fueron colectados a las 24, 48 y 72 horas de cultivo y conservados a -20 °C hasta su análisis.

Para la determinación de las citocinas intracelulares los esplenocitos fueron estimulados con 2 μ g de SEB por ml y se cultivaron durante 72 horas en las condiciones indicadas. 6 horas antes de la finalización de este periodo, se adicionó al cultivo 4 μ l de monensina (GolgiStop™ BD) por cada 6 ml de cultivo.

Las células cultivadas durante 72 horas fueron marcadas y analizadas por citometría de flujo tal como se indica en el apartado 4.7.

4.5.3.2 Ensayo de proliferación.

Para evaluar la capacidad proliferativa de los esplenocitos de los ratones que recibieron el tratamiento de tolerización, las células al igual que las del grupo control, fueron marcadas con Carboxi-fluorescein-succinil-éster (CFSE) a una concentración final de 2 μ M.

En un tubo de 15 ml se resuspendieron 1×10^7 células en 900 μ l de PBS precalentado a 37°C, posteriormente se le agregaron 100 μ l del PBS que contenía el CFSE y se agitó suavemente para homogenizar la suspensión.

Las células fueron incubadas a 37°C por 15 minutos y luego de este tiempo se adicionaron 11 ml de medio RPMI precalentado.

La suspensión fue lavada centrifugándola a 1750 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante fue descartado y las células se resuspendieron en 5 ml de RPMI precalentado e incubadas por 30 minutos más. Pasado este tiempo, la suspensión fue lavada nuevamente.

Las células se resuspendieron en un volumen de RPMI completo (RPMI suplementado L-Glutamina, streptomycin y 10% de suero fetal bovino (FCS)) necesario para cultivar 3×10^5 células 250 μ l por pozo y estimuladas con 2 μ g de SEB por ml.

Los sobrenadantes fueron recogidos a las 24, 48 y 72 horas de cultivo y congelados a -20°C hasta su posterior análisis.

Las células fueron recogidas a las 72 horas para ser marcadas y analizadas como se indica en el apartado siguiente.

4.6 Análisis del perfil proteico.

4.6.1 Determinación de la concentración de citocinas en sueros y sobrenadantes de cultivos celulares.

La determinación de las citocinas se realizó mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) con el método de sandwich.

Se utilizaron los kits comerciales ELISA BD Biosciences OptEIA™ Set Mouse para IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ e IL-6. Para la determinación de TNF α , el kit utilizado fue adquirido a Peprotech. En todos los casos se siguieron las recomendaciones del fabricante.

De manera general, se usaron placas *Multiwell immunoplate, Naxisorp, 96 well* (SIGMA), cada pocillo se recubrió con 100 μ l de anticuerpo de captura e incubados a 4°C durante la noche. IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- γ fueron diluidos 1:250 en tampón carbonato sódico 0,1M pH 9.5. El anticuerpo de captura de IL-10 se diluyó en tampón fosfato sódico 0,2M pH 6.5 y el de TNF α en PBS.

Posteriormente las placas fueron lavadas con PBS Tween20® 0,5% (Solución de lavado) y bloqueadas durante una hora con 200 μ l/pozo de PBS mas 10% de suero fetal bovino (FBS) (Solución de dilución), salvo TNF α que fue bloqueada con PBS mas 1% albúmina sérica bovina (BSA).

Los estándares fueron diluidos en solución de dilución para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ y PBS 0,1% BSA para TNF α , los rangos fueron de 3 a 200 pg/ml para IL-2, de 7 a 500 pg/ml para IL-4, de 15,6 a 100 pg/ml para IL-6, y de 31 a 2000 pg/ml para IL-10, IFN- γ y TNF α .

Las placas fueron nuevamente lavadas y en cada pozo se colocaron 60 μ l de la muestra o el estándar y fueron incubadas por dos horas a temperatura ambiente.

Se realizó un nuevo lavado y para las citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ se colocaron 60 μ l por pozo de la solución de detección (anticuerpo de detección diluido en solución de dilución 1:500 para IL-4, 1:1000 para IL-2 y 1:250 para IL-6, IL-10 e IFN- γ junto con estreptavidina conjugada con peroxidasa diluida 1:250) y se incubaron durante una hora.

Para TNF α se colocaron 60 μ l por pozo del anticuerpo de detección a una concentración de 0,25 μ g/ml y se incubaron durante 2 horas. Posteriormente las placas fueron lavadas y a cada pozo se le adiciono 60 μ l de estreptavidina conjugada con peroxidasa diluida 1:250 y se incubó por una hora más.

Las placas se lavaron nuevamente y a cada pozo se le adiciono 60 μ l de tetrametilbencidina (TMB) BD® y se incubó durante 15 minutos en oscuridad. Posteriormente se le adicionaron 30 μ l de ácido sulfúrico al 25%. La absorbancia fue leída con filtros de 450nm y 620nm en el lector de placas *Labsystem Multiskan Plus Microplate Reader*.

4.6.2 Determinación de las proteínas celulares mediante *western blot*.

4.6.2.1 Obtención de los extractos proteicos de los esplenocitos.

10 ml de la suspensión celular madre se centrifugaron durante 5 minutos a 1750 rpm a 4°C, se descarto el sobrenadante y el pellet de esplenocitos se resuspendió en 1ml de TBS (*Tris Buffered Saline*: Tris 10mM y NaCl 0.15M, pH=7.5) frió y se trasvaso a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

4.6.2.1.1 Extractos citoplasmáticos

Se hizo un pulso de 20 segundos a máxima velocidad en una microfuga (Eppendorf 5415 R) de los tubos con los esplenocitos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con tampón B (Hepes 10mM pH=7.9, KCl 10mM, EGTA 0.1mM, Cl₂Mg 5mM, DTT 1mM, PMSF 0.5mM, más el cóctel de inhibidores de proteasas completa EDTA-free, pepstatina y el cóctel de inhibidores de fosfatasa PhosSTOP de Roche Applied Science, Mannheim, Germany) a una concentración de 150×10^6 células/100µL de tampón B.

La suspensión se dejó en hielo por 10 minutos para que las células se acondicionaran al tampón en el cual se lizarían.

Después se adicionó el mismo volumen de la solución del tampón B más el detergente Nonidet-P40 (NP-40) al 0.2% y se dejó 10 minutos más en el hielo para disgregar las membranas celulares. A continuación se centrifugó durante 1 minuto a la máxima velocidad a 4°C, se recuperó el sobrenadante, el cual contenía los extractos citoplasmáticos de los esplenocitos. De la suspensión se hicieron alícuotas de 40µL y se congelaron a -80°C.

4.6.2.1.2 Extractos nucleares

El pellet procedente de los extractos citoplasmáticos se resuspendió en tampón C (Hepes 20mM pH=7.9, NaCl 400mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, PMSF 0.5mM, más el cóctel de inhibidores de proteasas completa EDTA-free, pepstatina y el cóctel de inhibidores de fosfatasa PhosSTOP de Roche Applied Science, Mannheim, Germany) a una concentración de 100×10^6 células/100µL de tampón C.

Este tampón tiene una gran concentración iónica lo que permite la disociación de las proteínas nucleares no histonas asociadas al DNA. Se dejó 1 hora a 4°C en rotación y se centrifugó 5 minutos a la máxima velocidad a 4°C para obtener el sobrenadante, que correspondía al extracto nuclear de los esplenocitos, de los que también se hicieron alícuotas de 40µL que se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis.

4.6.2.1.3 Cuantificación del contenido proteico: método de Lowry

La concentración de proteínas de los extractos citoplasmáticos y nucleares de los esplenocitos se determinó siguiendo el *Microplate Assay Protocol del kit Detergent Compatible Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA), el cual es un ensayo colorimétrico para la cuantificación de proteínas basado en el método descrito por Lowry et al. 1951, pero modificado para que sea compatible con detergentes.

Como estándares se prepararon 200µL a la siguiente concentración: 8, 4, 2, 1, 0'5, 0'25 y 0 µg/µL de BSA (albúmina de suero bovino, CALBIOCHEM®, Darmstadt, Germany) partiendo de una solución madre de 10 mg/ml preparada en el mismo tampón en el que estaban las muestras dado que la presencia de diferentes sustancias pueden variar la respuesta de la proteína a los reactivos del ensayo.

Se colocaron 5µL de cada uno de los estándares y de las muestras por duplicado en una placa de 96 pozos, se adicionaron 25µl del reactivo A' (se preparó mezclando 20µL de reactivo S a 1ml de reactivo A), seguido se adicionaron 200µl de reactivo B, se agitó la placa y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, después se midió la absorbancia a 750 nm en un lector de placas *Labsystem Multiskan Plus Microplate Reader*. Los resultados se expresaron en µg de proteína/µL y se utilizaron para igualar la concentración de proteína dentro de cada uno de los extractos proteicos.

4.6.2.1.4 Electroforesis en condiciones desnaturalización

Para la separación de las proteínas se utilizaron geles de acrilamida (p/v) (NuPAGE® Novex Bis-Tris 4-12% Gel 1.0mmX15well, Invitrogen™, USA).

Las muestras se diluyeron en tampón de carga (Tris/HCl 50 mM a pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 2-mercaptoetanol 4% (v/v), glicerol 10%, azul de bromofenol 0.1% (p/v)) y se incubaron por 10 minutos a 70°C para desnaturalizar las proteínas. Se prepararon 400ml de tampón de carrera diluyendo en agua destilada el MOPS SDS Running Buffer (20X) NuPAGE® (Invitrogen™) y se montó la cubeta de electroforesis XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen™) con dos geles. Se colocaron 12µL de las muestras en cada pozo del gel y 5µl del marcador de peso molecular (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained

Standard 1X, Invitrogen™) y se adicionaron 500µl de antioxidante NuPAGE® (Invitrogen™) en el tampón de carrera contenido entre los dos geles.

La electroforesis se dejaba correr durante 2 horas con una intensidad fija de 25mA por cada gel hasta que las muestras se concentraban y después se aumentaba a 35mA por cada gel.

4.6.2.1.5 Transferencia

Se usó el sistema de transferencia semi-húmeda. Para eso se prepararon 200ml de tampón de transferencia diluyendo el tampón Transfer Buffer 20X NuPAGE® (Invitrogen™) en agua destilada con 10% de metanol. Con este tampón se hidrató el papel (Chromatography paper, Whatman® Schleicher & Schuell, England) y la membrana de nitrocelulosa (Whatman®. PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membrane, Dassel, Germany).

El gel se puso sobre la membrana de nitrocelulosa hidratada y esta sobre 3 papeles previamente humedecidos y puestos sobre el área de transferencia del equipo, sobre el gel se colocaron 3 papeles húmedos y se cerró el aparato de transferencia. El proceso se hizo limitando el voltaje a 100V, 10W y se fijando la intensidad a 90mA por cada gel durante 1.5 horas.

Finalizada la transferencia, las membranas fueron lavadas con agua destilada y sumergidas en rojo Poceau 0,1% (Ponceau 0,1g, Ácido acético 5%, en H₂O) para verificar la presencia de bandas proteicas en la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente fueron lavadas con TBS durante 10 minutos en agitación.

4.6.2.1.6 Inmunoblot

a) Bloqueo de membranas: Las membranas fueron bloqueadas con la solución de bloqueo 1:1 TBS/Odyssey blocking buffer (ODYSSEY® Infrared Imaging, LI-COR®, Biosciences). Algunas membranas fueron bloqueadas con leche desnatada (Nestlé®, Barcelona, Spain) 3% disuelta en TBS Tween-20® 0.1% (TBST) e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

b) Incubación con anticuerpos primarios: La solución de bloqueo fue descartada y se colocaron los anticuerpos que previamente habían sido suspendidos en solución de bloqueo 1:1 TBS/Odyssey o en solución TBS Tween-20® 0.1% (TBST) leche desnatada 3%. Las diluciones y los anticuerpos que fueron utilizados se describen en la tabla 4.1.

Anticuerpo	Fuente	Dilución	Proveedor
pSTAT 1 Tyr 701	Rabbit	1:1000	Cell signaling®
STAT 1	Rabbit	1:1000	Cell signaling®
pSTAT 3 Tyr 705	Rabbit	1:10000	Abcam®
STAT 3	Rabbit	1:1000	Abcam®

Tabla 4.1: Anticuerpos utilizados para determinar la activación de STAT1 y 3, y para determinar los niveles de STAT1 y 3 totales.

Las membranas se dejaron en incubación con los anticuerpos primarios durante la noche a 4°C en agitación.

Pasado el periodo de incubación, las membranas fueron lavadas durante una hora a temperatura ambiente con TBST, cambiando la solución cada 15 minutos.

c) Incubación con anticuerpos secundarios: Los anticuerpos secundarios utilizados fueron *Goat anti rabbit*, IRDye 800 CW, *Odyssey Infrared System*, LI-COR Biosciences a una dilución 1:7500, y *Goat anti Mouse*, IRDye 680LT, *Odyssey Infrared System*, LI-COR Biosciences a una dilución 1:12000.

En las membranas en las que se utilizó la solución TBS Tween-20® 0.1% (TBST) leche desnatada 3%, se usaron un anticuerpo policlonal *Goat anti Rabbit* conjugado con *Horseradish peroxidase* (HRP) (Cell Signaling Technology®) y un anticuerpo policlonal *Horse anti mouse* conjugado con *Horseradish peroxidase* (Cell Signaling Technology®) a diluciones 1/7.500 y 1/20.000 respectivamente.

Las membranas fueron incubadas protegidas de la luz con los anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas durante una hora más a temperatura ambiente con TBS+Tween20® 0.1% (TBST) cambiando la solución cada 15 minutos, siempre protegidas de la luz.

d) Detección de las bandas de proteínas: En las membranas en las que se utilizó el Buffer Odyssey, las bandas de proteínas fueron visualizadas por infrarrojo cercano, a través del revelado en el escáner Odyssey LI-COR Modelo 9120, Lincoln NE, USE, eliminando antes los restos de Tween20 con un lavado de 5 minutos en TBS. Las imágenes de escáner obtenidas se procesaron con el programa de análisis Odyssey 2.1.

Las otras membranas tratadas con la solución de leche descremada se incubaron durante 5 minutos con una solución reveladora (SuperSignal® *West Dura Extended Duration Substrate*, Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA), pasado este tiempo, se descartó el exceso de la solución y la emisión fue detectada en el equipo ChemiDoc 2000 BioRad.

4.6.2.1.7 Stripping

Para volver a analizar las membranas en las que previamente se habían detectado las proteínas reconocidas específicamente por distintos anticuerpos, se les realizó un *stripping*.

Las membranas se incubaron durante 15 minutos a TA en agitación en tampón de stripping NewBlot Nitro stripping Odyssey (ODYSSEY® Infrared Imaging, LI-COR®, Biosciences) diluido 5 veces en agua. Posteriormente se lavaron 3 veces en TBS y se escanearon nuevamente para comprobar que no quedaba señal de bandas en la membrana. Una vez verificada la ausencia de fluorescencia de bandas, finalizando este paso las membranas se incubaron nuevamente con los anticuerpos primarios de interés.

Las membranas en las que se usó la solución de leche desnatada se lavaron una vez con TBST para eliminar los restos de solución reveladora, posteriormente se incubaron durante 45 minutos a 45°C en agitación con *Restore™ Western Blot Stripping Buffer*, (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Posteriormente fueron lavadas dos veces con TBST y bloqueadas nuevamente antes de su uso.

4.7 Análisis poblacional por citometría de flujo.

Para el análisis de las subpoblaciones de células T presentes en el bazo de los ratones tratados *in vivo*, los esplenocitos fueron marcados con una combinación de anticuerpos de membrana. Tabla 4.2

Por otra parte, para la determinación de las citocinas intracelulares 3×10^5 de células cultivadas fueron marcadas con la combinación de anticuerpos de membrana y anticuerpos anti citocinas como se indica en la tabla 4.2.

Las células fueron trasvasadas a tantos tubos de 5ml como fuera necesario para el análisis (Tabla 4.3) y lavadas (En adelante este termino indicara que las células son resuspendidas en 1 ml de *Staining Buffer* (PBS+1% FBS) o 1X *Perm/Wash Buffer* (BD), centrifugadas a 1750 rpm durante 5 minutos y su sobrenadante aspirado hasta dejar 100 μ l).

Cada tubo se agitó suavemente para resuspender la células y se le adicione 1 μ l de anti CD16/CD32 (BD Fc Block) a las células de los tratamientos *in vivo* o 5 μ l de una dilución 1:10 de anti CD16/CD32 de las células procedente de cultivo y se incubaron a 4°C durante 15 minutos en la oscuridad.

Anticuerpo	Clon	Proveedor
PECy5 - Hamster anti mouse CD3e	145-2C11	BD Bioscience
PECy7 Rat anti mouse CD4	RM4-5	BD Bioscience
PE Rat anti mouse CD4	GK1.5	BD Bioscience
PE Rat anti mouse CD25 (IL-2R α)	3C7	BD Bioscience
Purified Rat anti mouse CD16/CD32	2.4G2	BD Bioscience
FITC anti mouse CD45RB	16A	Immunotools
V450 Rat anti mouse CD49b	DX5	BD Bioscience
PE Hamster anti mouse CD152	UC10-4F10-11	BD Bioscience
PE labeled anti mouse CD210 (IL-10R)	1B1.3A	BD Bioscience
PE Rat anti mouse CD223	C9B7W	BD Bioscience
FITC anti mouse V β 8.1 8.2 TCR	MR5-2	BD Bioscience
FITC anti mouse V β 8.3 TCR	1B3.3	BD Bioscience
FITC mouse anti mouse V β 8 TCR	F23.1	BD Bioscience
APC Rat anti mouse IL10	JES5-16E3	BD Bioscience
APC Rat IgG2b k isotype control	A95-1	BD Bioscience
PE Rat IgG21k Isotype control	R3 34	BD Bioscience
APC-Cy7 Rat anti mouse INF γ	XMG1.2	BD Bioscience
PE INF γ R β	MOB-47	Santa Cruz

Tabla 4.2: Anticuerpos utilizados para la identificación de las poblaciones celulares en bazo de ratones tratados con SEB o células estimuladas *in vitro*

Las células fueron lavadas dos veces más y en cada tubo se adicionaron 10µl o 5µl (Tratamientos *in vivo* y cultivo respectivamente) de cada uno de los anticuerpos de superficie y 5µl de *violet fluorescent reactive dye* (life technologies®) para evaluar la viabilidad celular. Posteriormente se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Las células fueron lavadas dos veces más y resuspendidas en 200µl de *Staining Buffer* e inmediatamente analizadas en el citómetro.

Para hacer el marcaje intracelular, Las células se fijaron y permeabilizaron con 250µl por tubo de *Fixation/Permeabilization solution* (BD) e incubaron durante 20 minutos a 4°C en oscuridad.

Láser	Violeta	Azul				Rojo	
Fluorocromo	V450	FITC	PE	PECy5	PECy7	APC	APC-Cy7
Tubo 1	ViVid	TCR Vβ8.1-2		CD3	CD4		
Tubo 2		TCR Vβ8.3		CD3	CD4		
Tubo 3			CD25	CD3	CD4		
Tubo 4			CD210	CD3	CD4		
Tubo 5			IFN _γ	CD3	CD4		
Tubo 6			CD152	CD3	CD4		
Tubo 7	CD49b	CD45RB	CD223	CD3	CD4	IL-10	
Tubo 8		CD45RB	CD223	CD3	CD4	IL-10	IFN _γ

Tabla 4.3: Pánel de la combinación de anticuerpos para la identificación de las poblaciones celulares

Posteriormente las células fueron lavadas 2 veces con 1X *Perm/Wash Buffer* (BD) 1ml por tubo y centrifugadas a 1750 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue aspirado hasta dejar 50µl. En este volumen se diluyeron 10µl los anticuerpos anti-citocina o el control de isotipo y se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.

Las células fueron lavadas 2 veces con 1X *Perm/Wash Buffer* 1ml por tubo y el aspirado hasta dejar 100µl, posteriormente se resuspendieron en 200µl más *Staining Buffer* e inmediatamente analizadas por citometría.

Las muestras fueron procesadas en un citómetro FC500 de Becman Coulter o en un citómetro MacsQuant de MiltenyiBiotec, y el análisis de las muestras se hizo en el MacsQuant

4.8 Análisis de la expresión génica.

4.8.1 Extracción y purificación de RNA

2×10^6 células T CD4+ purificadas fueron resuspendidas en 400 μ l de RNAlater® (Ambion) diluido 1/4 con solución salina fisiológica 0,9% y congeladas a -80°C.

En el momento de la extracción del RNA, la suspensión celular se descongeló y se le adicionó 600 μ l de solución salina fisiológica 0,9%, luego se centrifugó a máxima velocidad a 4° C durante 30 minutos.

La extracción del RNA se realizó por el método *Nucleo Spin RNA II* (Macherey-Nagel). El pellet celular se liso con 350 μ l de *buffer* RA1 y 3,5 μ l β -mercaptoetanol. Se realizó un preaclerado del lisado filtrando a través de las columnas *NucleoSpin filter* y centrifugando 1 minuto a 11000g. A la suspensión filtrada se le agregaron 350 μ l de etanol al 70%, se agitó con vortex y el contenido se trasvasó a una columna *NucleoSpin RNA II*. Se centrifugó durante 30 segundos a 11000g y se agregaron 350 μ l de MDB (*membrana desalting buffer*). Se centrifugó nuevamente durante 1 minuto a 11000g.

Para eliminar el DNA contaminante se preparó la mezcla de reacción con DNasa, en un tubo estéril se mezclaron 10 μ l de DNasa en 90 μ l de *DNasa reaction buffer*, de esta mezcla se agregaron 95 μ l en la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La DNasa se inactivó agregando 200 μ l del *buffer* RA2 a la columna. Se centrifugó durante 30 segundos a 11000g y se agregaron 600 μ l de *buffer* RA3 a la columna. Se repitió la centrifugación y se hizo otro lavado con 250 μ l de *buffer* RA3. Se centrifugó durante 2 minutos a 11000g.

La elución del RNA se realizó con 50 μ l de H₂O en un tubo eppendorf libre de RNasas, mediante centrifugación a 11000g durante un minuto.

4.8.1.1 Cuantificación del RNA

La cuantificación del RNA se realizó por espectrofotometría mediante el uso del equipo NanoDrop® ND1000. Todas las muestras fueron normalizadas a una concentración de 10ng/ μ l.

4.8.1.2 Retro transcripción (RT)

Para hacer la retro transcripción, se utilizó el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* de Applied Biosystems™.

Tanto las muestras como los componentes del kit fueron descongelados en cama de hielo, homogenizados por agitación en vortex y centrifugados justo antes de su utilización. En cada reacción se utilizó un total de 20µl de la mezcla de los componentes del kit y muestra como se indica en la tabla 4.4

Componentes	Volumen 20µl/reacción
10X RT Buffer	2
25X dNTP Mix 100mM	0,8
10X Random Primers	2
MS Reverse Transcriptasa	1
Agua libre de nucleasas	4,2
Muestra	10

Tabla 4.4: Componentes y volúmenes utilizados para la realización de la retrotranscripción

La retrotranscripción se realizó en un termociclador BIO RAD T100™ y las condiciones para las reacciones fueron las que se describen en la tabla 4.5

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura °C	25	37	85	4
Tiempo en minutos	10	120	5	∞

Tabla 4.5: Parametros utilizados para realizar la retrotranscripción

Posteriormente, las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su análisis.

4.8.1.3 Real Time PCR para cDNAs

Para la realización de la *Real Time PCR* se utilizaron las sondas *TaqMan® Gene Expression Assay* (Life Technologies), tabla 4.6 y la *TaqMan® Universal Master Mix* (Life Technologies).

Sonda TaqMan®	Gen	
Mm00478932_m1	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>	Ahr
Mm00433373_m1	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>	Fyn
Mm00444048_m1	<i>Diacylglycerol kinase alpha</i>	DGKa
Mn00661896_m1	<i>Diacylglycerol kinase ζ</i>	DGKζ
Mm00802897_m1	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>	LcK
Mm00484668_m1	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	Gadph

Figura 4.6: Lista de sondas TagMan utilizadas para evaluar la expresión génica en esplenocitos de ratones estimulados con SEB

Justo antes de su utilización, los componentes de la mezcla fueron descongelados en cama de hielo, homogenizados por agitación en vortex y centrifugados. En cada reacción se utilizó un volumen total de 20µl de la mezcla como se indica en la tabla 4.7

Componentes para la reació qPCR	Volumen por 20-µL reacción (µL)
20X TaqMan® Gene Expression Assay	1
2XTaqMan® Gene Expression Master Mix	10
cDNA	4
Agua libre de RNasas	5

Tabla4.7: Componentes y volúmenes utilizados para realizar la qPCR

La reacción se llevo a cabo en un equipo Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Las condiciones para el desarrollo de la qPCR fueron los indicados por el proveedor y se describen en la tabla 4.8

	HOLD	40 Ciclos	
		Denature	Annel/Extend
Temperatura °C	25	37	85
Tiempo	10	120	5
Volumen	12µl		

Tabla 4.8: Parametros utilizados para desarrollar la qPCR

Los datos obtenidos fueron analizados por el programa SDS 2.4 Applied Biosystems

4.8.2 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP).

4.8.2.1 Cross-linking y lisis celular.

1×10^7 células T CD4+ purificas fueron resuspendidas en 2 ml de PBS con paraformaldehido 1% e incubadas en agitación suave durante 15 minutos a temperatura

ambiente. Posteriormente se adicionaron 13 ml de PBS frío y se centrifugo durante 5 minutos a 4000g a 4° C.

El pellet celular fue resuspendido con Tris-HCl 0.1m pH 9.4 e incubado durante 15 minutos a 30° C en baño de Maria. La suspensión fue centrifugada durante 5 minutos a 4000g a 4° C. Posterior a esto, el pellet celular se resuspendió y lavo 3 veces. En el primer lavado se utilizó un 1 ml de PBS frío y la suspensión fue trasvasada a un eppendor de 1,5 ml. El segundo lavado se realizó con 1 ml de *buffer I* (0,25% Triton X-100, EDTA 10mM, EGTA 0,5mM, Hepes 10mM pH 6,5), y el tercero fue con el *buffer II* (NaCl 200mM, EDTA 1mM, EGTA 0,5mM, Hepes 10mM pH 6,5). La suspensión fue centrifugada durante 5 minutos a 4000g a 4° C en cada paso.

Posterior al último lavado, el pellet fue resuspendido en 200 µl del *buffer* de lisis (SDS 1%, EDTA 10mM, Tris-HCl 50mM pH8,1, mas el cóctel de inhibidores de proteasas Complet EDTA-free, y el cóctel de inhibidores de fosfatasas PhosSTOP (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)).

4.8.2.2 Fragmentación del DNA

Para obtener fragmentos de DNA de entre 600 y 1200 pares de bases, las células lisadas fueron sonicadas sobre una cama de hielo con 5 Hertz y 8 Watts de potencia durante 7,5 minutos con pulsos de sonicación cada 15 segundos seguido de 15 segundos de reposo. La sonicación se realizó en el equipo Misonix Sonicator S-4000.

Finalizada la sonicación, la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a máxima velocidad a 4° C.

El tamaño de los fragmentos de DNA se determino mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% TBE 0,5X. De cada muestra se tomaron 5µl del sobrenadante que contiene la cromatina soluble y se mezclaron con Blue J 2X. La electroforesis se realizó durante 45 minutos a 100 voltios y 400 miliamperios.

El sobrenadante restante se diluyo en un tubo eppendorf de 5ml con el *buffer* de dilución (Triton X-100 1%, EDTA 2mM, NaCl 150mM, Tris-HCl pH 8,1 mas el cóctel de inhibidores de proteasas Complet EDTA-free, y el cóctel de inhibidores de fosfatasas

PhosSTOP (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)) hasta un volumen de 2200 μ l. La muestra se distribuyó en tres volúmenes iguales en tubos eppendorf de 1,5 ml; dos para las proteínas específicas (pSTAT 1 y pSTAT 3) y uno para las IgGs, y 100 μ l como *input*. El *input* fue congelado a -80° C hasta el omento de la q-PCR.

4.8.2.3 Eliminación de inespecificidades

Para eliminar la mayor cantidad de inespecificidades, cada ml de muestra fue bloqueada con 2 μ g de esperma de salmón (Invitrogen®), se le agregaron 2,5 μ g de IgGs de conejo (Vector Laboratories), y 20 μ l de *Magna ChipTM protein A* (Millipore) y se incubaron durante la noche a 4° C en agitación orbital.

Posterior a la incubación, las muestras se colocaron en el *PureProteomeTM Magnetic Stand Rack* durante 1 minuto y el sobrenadante con la cromatina fue recolectado en un nuevo eppendorf.

4.8.2.4 Inmunoprecipitación

En la precipitación de los fragmentos de DNA- STAT, se utilizaron los anticuerpos monoclonales *Rabbit anti-mouse pSTAT 1 Tyr 701*, y *Rabbit anti-mouse pSTAT 3 Tyr 705* (Cell signalling) a una dilución de 1:100, y para las IgGs inespecíficas se usaron 5 μ g de Rabbit IgGs (vector Laboratorios).

Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos durante 6 horas a 4° C en el agitador orbital, pasado este tiempo se adicionaron 20 μ l de *Magna ChipTM protein A* (Millipore) y se incubaron durante la noche a 4° C en agitación orbital.

Después de la incubación, las muestras se colocaron nuevamente en el *PureProteomeTM Magnetic Stand Rack* durante 1 minuto y el sobrenadante fue descartado.

El precipitado de cromatina fue resuspendido y precipitado tres veces. La primera con 1 ml de TSE I (NaCl 150mM, SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2mM, Tris-HCL 20mM pH 8.1), la segunda con 1 ml de TSE II (NaCl 500mM, SDS 0.1%, Triton X-

100 1%, EDTA 2mM, Tris-HCL 20mM pH 8.1) y la tercera con 1 ml de Buffer III (LiCl 0.25M, NP-40 1%, EDTA 1mM, Deoxicolato 1% Tris-HCl 10mM pH 8.1)

Posteriormente el precipitado se resuspendió en 100µl del *buffer* de dilución (NaHCO₃ 0.1M, 1% SDS) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación orbital seguido de la precipitación en el *PureProteome™ Magnetic Stand Rack*. Cada muestra fue diluida, incubada, precipitada dos veces más en el *Buffer* de dilución y finalmente resuspendida en 100µl del mismo *Buffer*.

4.8.2.5 Cross-linking reversion.

Las muestras al igual que el *input* fueron incubadas a 65°C a 350 rpm durante la noche. Pasada la incubación, el *Magna Chip™ protein A* fue precipitado en el *PureProteome™ Magnetic Stand Rack* y el sobrenadante fue trasvasado a otro eppendorf.

4.8.2.6 Extracción y purificación de DNA

El ADN precipitado, fue purificado usando *QIAamp® DNA Blood Mini kit* (QIAGEN). A cada una de las muestras se le adiciono 100µl de PBS, 20µl de QIAGEN proteasa y 200µl del *buffer*, se homogenizo la muestra por agitación en vortex y se incubó a 56°C durante 10 minutos.

Post incubación se adicionaron 200µl de de etanol al 96%. La muestra se homogenizó en vortex, se trasvaso en una columna *QIAamp Mini spin* y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. El tubo que contenía la solución filtrada se descartó y la columna *QIAamp Mini spin* se pasó a otro tubo, sobre la columna se colocaron 500µl del buffer AW1 y se centrifugó nuevamente a 8000 rpm durante 1 minuto.

A la columna se le adicionaron 500µl del buffer AW2 y se centrifugo a 13200 rpm durante 3 minutos. El tubo que contenía la solución filtrada se descarto y la columna *QIAamp Mini spin* se pasó a un tubo eppendorf de 1,5 ml. En la columna se adicionaron 60µl de agua destilada y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente,

posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto, la columna se descarto y el eluido que contiene el DNA fue conservado a -80°C hasta la realización de la q-PCR

4.8.2.7 *Primers y Real Time PCR para DNA*

4.8.2.8.1 *Diseño de primers*

Para identificar las secuencias GAS, el total de la secuencia nucleotídica de los genes de interés fueron procesadas por el programa PROMO (Universidad politécnica de Cataluña) y/o por el programa FASTAC®. En los dos programas se excluyeron elementos GAS que tuvieran probabilidad de unión inferior al 85%.

Los *primers* fueron diseñados mediante el uso del programa informático Primer3Plus a partir de la secuencia nucleotídica que circunda las cajas GAS identificadas en el promotor del gen.

Basados en esa especificidad, se diseñaron entre uno y tres *primer* por cada gen. Tabla 4.9

Gen	Posición	Primer		
<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>	AhR	1	Forward Reverse	tcaatttcccagcgattctc gctgatggaggaaaaagaa
	AhR	2	Forward Reverse	ccctccaatttctcatgctc caaaaatgccctgcaaagt
	DAGK	1	Forward Reverse	aaggacaggaaggactcgt tgctccaacagagctagt
		2	Forward Reverse	cctgtcgggagagtaga ccttctttggccatcct
<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>	LCK	1	Forward Reverse	caagagatgccttgctgt atggagcactcctcctacc
	LCK	2	Forward Reverse	acagggttgcctgtcttg aggctctgcctctgtggtc
		3	Forward Reverse	agccttggaaccggaatg ctgggtgggtgcttcatct
	pIVCIITA	Forward Reverse	ggctcaaatctgctgctc agtatctgtggcgctttcc	

Tabla 4.9: Lista de sondas diseñadas para evaluar la unión de los STATs fosforilados al promotor de los genes que se indican

Los *primer* adquiridos a Fisher Scientific fueron hidratados con un volumen necesario de agua para lograr una concentración 100µM.

4.8.2.8.2 Real Time PCR para DNA

Para la realización de la *Real Time* PCR se utilizó la Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) y para cada reacción se utilizó un volumen total de 12µl de la mezcla como se indica en la tabla 4.10

Componentes para la reacción qPCR	Volumen por 12-µL reacción (µL)
Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X)	6
Primer Forward	1,5
Primer Reverse	1,5
Muestra	1,5
Agua	1,5

Tabla 4.10: componentes y volúmenes utilizados para la reacción de qPCR

La reacción se llevó a cabo en un equipo Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Las condiciones para el desarrollo de la qPCR se describen en la tabla 4.11

	HOLD	40 Ciclos	
		Denature	Annel/Extend
Temperatura °C	25	37	85
Tiempo	10	120	5
Volumen	12µl		

Tabla 4.11: Parametros utilizados para desarrollar la qPCR

Los datos obtenidos fueron analizados por el programa SDS 2.4 Applied Biosystems. En el análisis de la expresión génica se excluyeron todas las muestras cuya desviación estandar superara los 0.5 puntos y que presentaran una Cycle threshold superior a 34.

4.9 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados por el programa Graphpad 5.0 y evaluados usando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney

5. Resultados

5.1 Evaluación de la respuesta a SEB *in vivo*.

5.1.1 Análisis de supervivencia de los ratones tratados con SEB.

Para evaluar la capacidad que el SAg SEB tiene de provocar shock tóxico y muerte o tolerancias, se instauró el tratamiento de shock tóxico (SK) en seis ratones administrándoles vía IP una única dosis de SEB (25µg/100µl) en combinación con D-galactosamina (25mg/100µl). Otros seis ratones fueron tolerizados (Tol) recibiendo vía IP 3 dosis de SEB (3µg/100µl), una cada 72 horas y pasadas 72 horas de la última de estas dosis, recibieron SEB (25µg/100µl) en combinación con D-galactosamina (25mg/100µl).

Para descartar el efecto que pudiera tener el diluyente, en cada tratamiento se utilizaron ratones control que recibieron suero fisiológico. Una vez finalizados los tratamientos los ratones fueron supervisados durante las siguientes 96 horas.

Como se puede observar en la figura 5.1, la administración de 25µg de SEB en combinación con 25mg D-galactosamina indujo el shock tóxico y causó la muerte al cincuenta por ciento de los ratones dentro de las primeras 18 horas, llegando al cien por cien de mortalidad a las 24 horas.

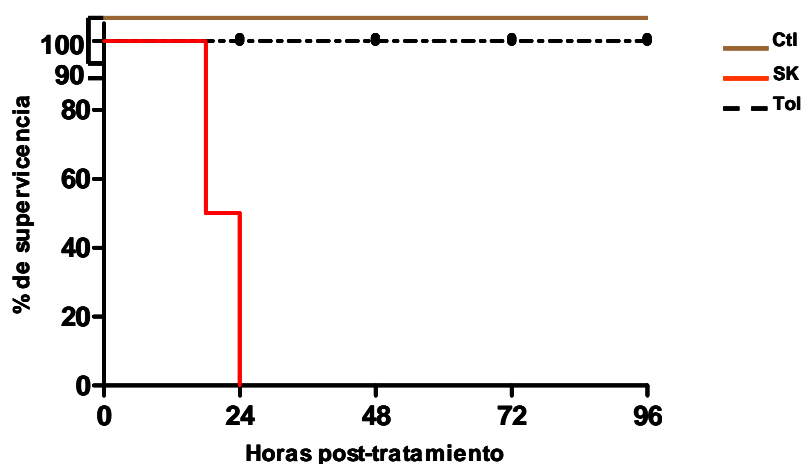


Figura 5.1: Análisis de supervivencias. Ratones a los que se les induce shock tóxico mueren en su totalidad entre las 18 y 24 post inducción. Sin embargo, los ratones tolerizados sobreviven a la muerte. Los resultados mostrados son el resultado de por lo menos dos experimentos independientes en el que se usaron como mínimo 3 ratones por grupo. Ctl: Control, SK: Shock tóxico, Tol: Tolerogénico.

Por el contrario, los ratones que recibieron las tres dosis de 3µg de SEB, no murieron al inducir en ellos el shock tóxico con 25µg de SEB en combinación con 25mg D-galactosamina, aunque el cien por cien de estos ratones presentaron diarreas, piloerección y disminuyeron su actividad durante las primeras 12 post tratamiento. Hacia las 24 horas estos signos desaparecieron.

5.1.2 Producción de citocinas en respuesta a SEB

Los ratones en los que se indujo el shock tóxico (SK) con SEB (25µg/100µl) en combinación con D-Galactosamina (25mg/100µl), ratones T1 que recibieron una única dosis de SEB (3µg/100µl), ratones T2 que recibieron 2 dosis de SEB (3µg/100µl), los ratones T3 que recibieron 3 dosis de SEB (3µg/100µl), ratones tolerizados (Tol) que recibieron 3 dosis de SEB (3µg/100µl) y un última de SEB (25µg/100µl) en combinación con D-galactosamina (25mg/100µl), ratones control (Ctl) y ratones inyectados con D-galactosamina (Gal), fueron sacrificados dos horas post-tratamiento y los niveles de IL-6, TNFα, IFNγ, IL-2, IL-4 e IL-10 fueron determinados en el suero mediante la técnica de ELISA.

Como se puede observar en la figura 5.2 (a-d), los niveles de las citocinas inflamatorias fueron muy elevadas en los ratones SK en comparación con los ratones Tol (IL-6 927,6±111,8 vs 128,02±5,018 p=0,0003; TNFα 2122±131,7 vs 822,5±61,64 p=0,0001; IFNγ 3601±302,4 vs 938,4±80,16 p=0,0001, e IL-2 1208±117,9 vs 56,33±9,016 p=0,0003).

Contrario a lo observado en los ratones SK, los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10 fueron fuertemente elevados en los ratones Tol en comparación con los ratones SK (5282±726,9 vs 484,3±43,67 P=0,0002). (Figura 5.2 f)

La IL-4 presento niveles levemente más bajos en el suero de los ratones Tol con respecto a los ratones SK, sin diferencia estadística significativa (271,6±51,95 vs 314,7±39,55), Figura 5.2 e

De otro lado, en comparación con los ratones SK, los niveles de IL-6, TNF α , IFN γ , IL-2 e IL-10 fueron significativamente menores en los T1 (IL-6 927,6 \pm 111,8 vs 303,5 \pm 21,37 p=0,0003; TNF α 2122 \pm 131,7 vs 200,4 \pm 20,39 p=0,0001; IFN γ 3601 \pm 302,4 vs 938,4 \pm 80,16 p=0,0001), e IL-2 1208 \pm 117,9 vs 416,4 \pm 58,32 P=0,0003, IL-10 484,3 \pm 43,67 vs 267,9 \pm 26,8). (Figura 5.2a-d y f)

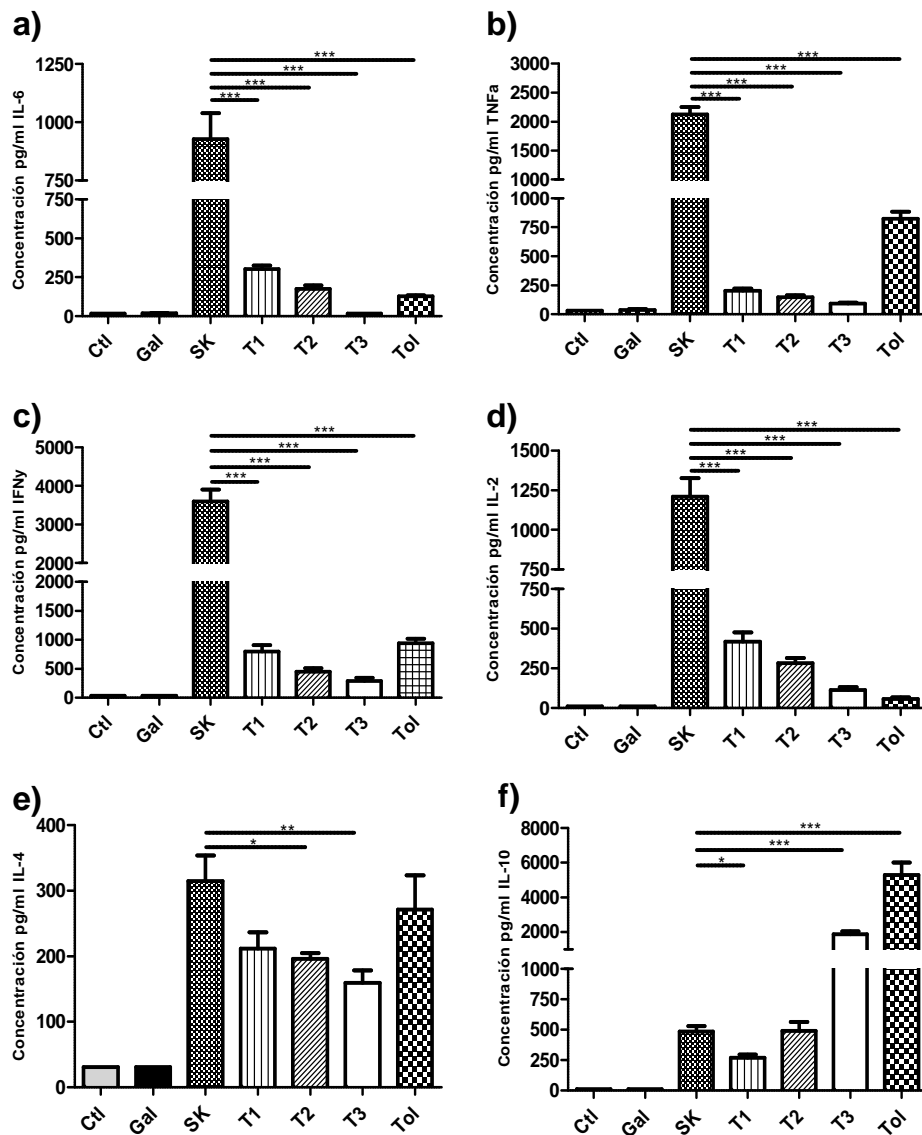


Figura 5.2. Expresión de los niveles de citocinas en sueros de ratones tratados con SEB. Expresión de los niveles séricos de citocinas a) IL-6. b) TNF α . c) IFN γ . d) IL-2. e) IL-4. f) IL-10.

Por su parte, los niveles de IL-6, TNF α , IFN γ , IL-2 e IL-4 disminuyeron progresivamente durante el proceso de tolerización (T1, T2 y T3) figura 5.2a-e, sin

embargo, los niveles de IL-10 tuvieron un comportamiento totalmente opuesto, aumentaron progresivamente. (Figura 5.2f)

Los niveles de IL-6, TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4, e IL-10, en los ratones Ctl y los ratones Gal, no fueron detectados o estuvieron por debajo del límite de detección del kit.

5.1.3 Análisis de la activación de los factores de transcripción STAT1 y STAT3

Una vez fue evaluado el perfil de citocinas en cada tratamiento, tras la estimulación con SEB se analizó la integración de la respuesta a nivel intracelular, determinado por el nivel de fosforilación que ocurre en los factores de transcripción STAT1 y STAT3 como respuesta a la unión de las citocinas, tales como IFN γ , IL-6 e IL-10 a su receptor.

5.1.3.1 STAT1 y STAT3 en citoplasma

Los niveles basales de expresión de las isoformas α y β de STAT1 y STAT3 fosforilado (pSTAT1 y pSTAT3), fueron casi indetectables en los esplenocitos de ratones Ctl, sin embargo, tras la estimulación con SEB se pudo observar un aumento marcado en la expresión de las isoforma α y β de pSTAT1 y pSTAT3 en los esplenocitos de los ratones SK y T1, aunque el aumento en la expresión de las isoformas α y β de pSTAT3 fue más elevado en los ratones SK en comparación con los observados en T1 (Figura 5.3a y b)

También se pudo observar que la expresión de las isoformas α y β de pSTAT1 y pSTAT3 se fue reduciendo tras cada exposición a SEB durante la tolerización, llegando a ser indetectables las isoformas de pSTAT1 y muy bajas las de pSTAT3 en los ratones T3. Sin embargo, tras la inducción del shock tóxico, en los ratones Tol la expresión de las isoforma α y β tanto de pSTAT1 como de pSTAT3 aumentaron marcadamente en comparación con la observada en T3, pero sin ser tan elevados como en SK o T1. (Figura 5.3a)

Tras la inducción del shock tóxico, la expresión de la isoforma α de STAT1 aumento levemente en los esplenocitos de ratones SK y Tol, mientras que la expresión de la isoforma β aumento moderadamente solo en los ratones Tol. (Figura 5.3c)

Por su parte, los niveles de expresión de la isoforma α y β de STAT3 totales no presentaron mayores modificaciones entre los diferentes tratamientos, salvo en los ratones Tol cuyos niveles de expresión aumentaron casi dos veces en comparación con los otros tratamientos. (Figura 5.3d)

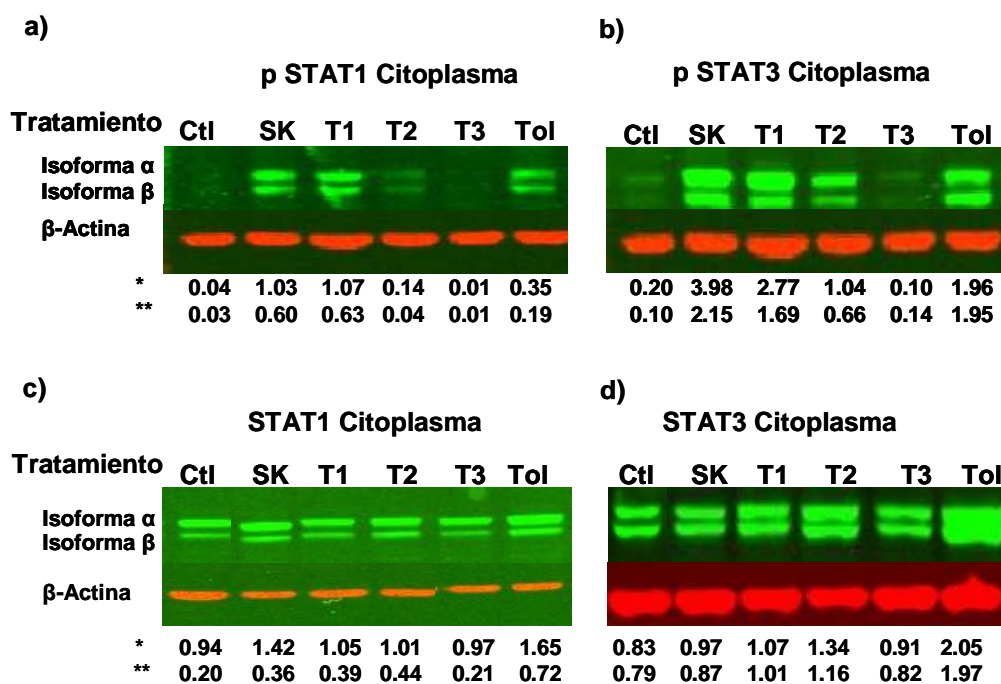


Figura 5.3 Determinación de los niveles de los factores de transcripción STAT1 y STAT3, así como su nivel de fosforilación en el citoplasma, como respuesta a la unión de las citocinas a su receptor tras la estimulación con SEB. a) niveles de fosforilación STAT1, b) niveles de fosforilación de STAT3, c) STAT1 totales y d) STAT3 totales. *Ratio isoforma α vs β -actina. ** Ratio isoforma β vs β -actina

5.1.3.2 STAT1 y STAT3 en núcleo

Al igual que en el citoplasma, en el núcleo la expresión de las isoformas α y β de pSTAT1 y pSTAT3 fueron casi indetectables en los esplenocitos de ratones Ctl, y tras la estimulación con SEB se observó un aumento marcado en la expresión de las isoforma α y β de pSTAT1 y pSTAT3 en los esplenocitos de los ratones SK y T1. El aumento en la expresión de las isoformas α y β de pSTAT3 fue más elevado en los ratones SK en comparación con los observados en T1. (Figura 5.4a y b)

Al igual que en citoplasma, el nivel de expresión de las isoformas α y β de pSTAT1 y pSTAT3 se fue reduciendo tras cada exposición a SEB durante la tolerización, llegando

a ser indetectables las isoformas de pSTAT1 y muy bajas las de pSTAT3 en los ratones T3. (Figura 5.4a y b)

Tras la inducción del shock tóxico, en los ratones Tol la expresión de las isoforma α y β de pSTAT1 aumentaron marcadamente en comparación con los observados en T3 sin llegar a ser tan elevados como en SK o T1. Mientras que la expresión de la isoforma β de pSTAT3 fue casi 3 veces mayor que su isoforma α y 2 veces mayor que la isoforma β observada en los ratones SK. (Figura 5.4a)

En cuanto a los STAT totales, la expresión de las isoformas α y β de STAT1 y STA3 fueron decreciendo en forma paralela a los pSTAT tras cada exposición a SEB, y a diferencia de lo ocurrido en el citoplasma, se observo un ligero aumento en la expresión de las isoformas α y β de STAT1 totales en los ratones T3. (Figura 5.4c)

En los ratones Tol, tras la inducción del shock tóxico, los niveles de expresión de la isoforma α y β de STAT1 aumentaron considerablemente llegando a ser similares a los observados en SK. Al igual que en el citoplasma, los niveles de expresión de la isoforma β de STAT3 total fue sensiblemente mayor que su isoforma α y 5 veces mayor que la isoforma β observadas en SK. (Figura 5.4c)

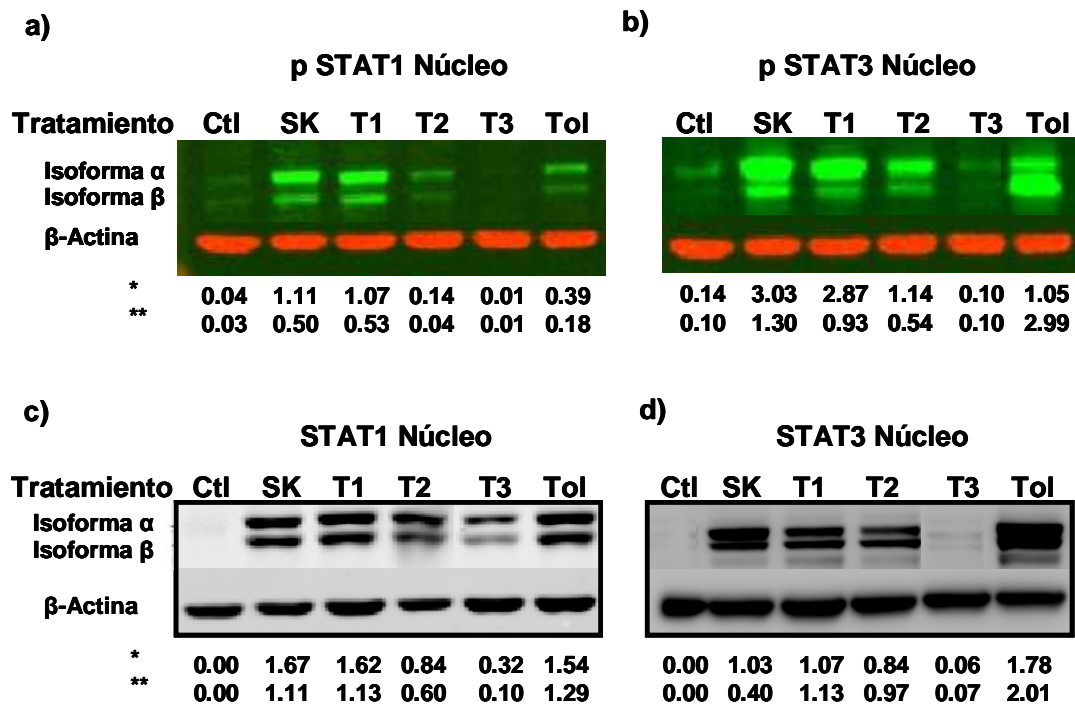


Figura 5,4 Determinación de los niveles de los factores de transcripción STAT1 y STAT3, así como su nivel de fosforilación en el núcleo como respuesta a la unión de las citocinas a su receptor tras la estimulación con SEB. a) Niveles de fosforilación STAT1, b) niveles de fosforilación de STAT3, c) STAT1 totales y d) STAT3 totales.

*Ratio isoforma α vs β -actina. ** Ratio isoforma β vs β -actina

5.1.4 Evaluación de los efectos de la utilización de los inhibidores AG490, de *iSTAT3* y anti IL-6 en ratones tratados con SEB

5.1.4.1 Evaluación de la supervivencia

Tal como se observó, IL-6 e IFN γ fueron dos de las citocinas que aumentaron drásticamente en los ratones SK. Mientras que IL-10 fue la citocina que más aumentó en los ratones Tol.

Esto nos llevó a evaluar la implicación de estas citocinas en el desarrollo del shock tóxico o en la tolerancia que ocurre en los ratones tratados con SEB. Para ello los ratones fueron tratados con AG490 o STAT3 inhibitor VIII,5,15,DPP (*iSTAT3*) o anti IL-6, previo a la inducción del shock tóxico o durante el proceso de tolerización.

Una vez finalizados los tratamientos los ratones fueron supervisados durante las siguientes 96 horas.

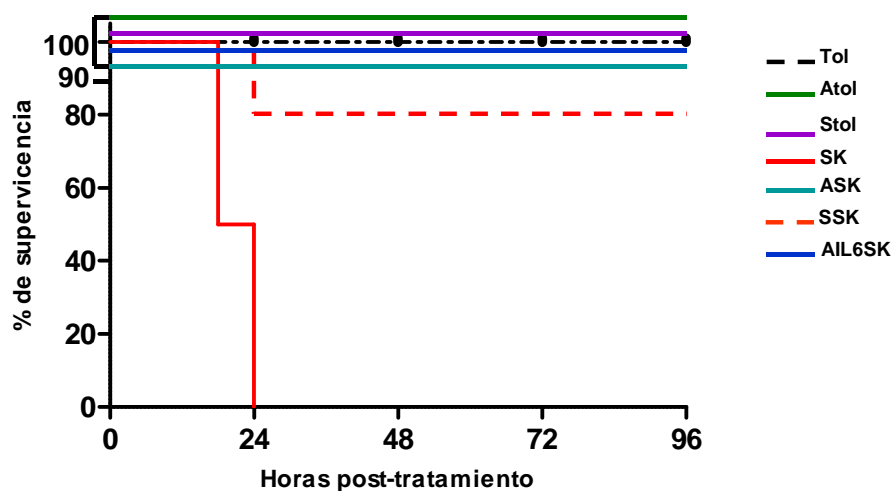


Figura 5.5: Análisis de supervivencias de los ratones en los que se utilizaron los inhibidores AG490, STAT3 inhibidor VIII 5,15,DPP y el anticuerpo anti IL-6. La utilización del AG490 y el anticuerpo anti IL-6, revierte en su totalidad la mortalidad en los ratones a los que se les indujo el shock tóxico en comparación con aquellos en los que no se utilizó. Cuando se les suministra el STAT3 inhibidor VIII 5,15,DPP a los ratones durante el proceso de tolerización, el 20% de estos mueren en las primeras 24 horas tras la inducción del shock tóxico. Los resultados mostrados son el resultado de por lo menos dos experimentos independientes en el que se usaron como mínimo 3 ratones por grupo, excluyendo el grupo de Anti IL-6 en el que solo se realizó un experimento con 3 animales..

Como se puede observar en la figura 5.5, todos los ratones SK murieron en las primeras 24 horas posteriores a la inducción del shock tóxico. Sin embargo, la administración de AG490 (ratones ASK) o anti IL-6 (ratones AIL6SK), evitó en su totalidad la muerte de los ratones en los que se indujo shock tóxico, mientras que la administración de *iSTAT3*, ratones SSK redujo la mortalidad en un ochenta por ciento de los ratones en los que se indujo el shock tóxico.

Contrario a lo que se esperaba, ni la administración de AG490 ni la administración de *iSTAT3* durante el proceso de tolerización modificó la supervivencia de los ratones.

5.1.4.2 Producción de citocinas en respuesta a la utilización de los inhibidores AG490, *iSTAT3* y anti IL-6 en ratones tratados con SEB

Para determinar el efecto que tienen los inhibidores AG490, *iSTAT3* y el uso de anti IL-6 sobre la producción de citocinas, los ratones fueron tratados con AG490 o *iSTAT3* o anti IL-6 previo a la inducción del shock tóxico o durante el proceso de tolerización. Dos horas tras la inducción del shock tóxico con SEB (25µg/100µl) en combinación con D-Galactosamina (25mg/100µl), los ratones fueron sacrificados y los niveles de IL-6, TNFα, IFNγ, IL-2, IL-4, e IL-10 fueron determinados.

En comparación con los ratones Tol no tratados, el uso de AG490 en los ratones Tol provocó un aumento significativo tanto en los niveles de IL-6 (128,2±5,019 vs 192±9,308 p=0,0001) como de IL-2 ((56,33±9,016 vs 97,82±17,01 p=0,046), mientras que provocó una disminución no significativa en los niveles de IL-10. (Figura 5.6a, d y f)

El uso de *iSTAT3* en ratones Tol, provocó una disminución en los niveles séricos de TNFα (822,5±61,64 vs 634,5±30,61 p=0,0049) y de IL-10 (5282±726,9 vs 3602±342,2 p= 0,069), figura 5.6b y f. Mientras que provocó un aumento en los niveles de IL-2 (56,33±9,016 vs 97,82±17,01 p=0,049), en comparación con los ratones Tol. (Figura 5.6d).

Cuando los ratones SK fueron pretratados con AG490, los niveles séricos de TNFα, IFNγ e IL-2 descendieron significativamente (2172±95,59 vs 1807±126,7 p=0,0436),

(3601±302,4 vs 1570±177,2 p=0,0002), y (1208±117,9 vs 231,3±30,36 p=0,0001) respectivamente, en comparación con los ratones SK no tratados. (Figura 5.6b, c y d)

De otro lado, el uso de *iSTAT3* en ratones SK, provocó una caída en los niveles séricos de IL-6 (927,6±111,8 vs 452,1±51,60 p=0,005), TNF α , (2172±95,59 vs 1594±116,7 p=0,005), IFN γ (3601±302,4 vs 2299±135,1. p=0,0028) e IL-2 (1208±117,9 vs 759,6±41,51 p=0,0049) en comparación con los ratones SK no tratados. (Figura 5.6a-d)

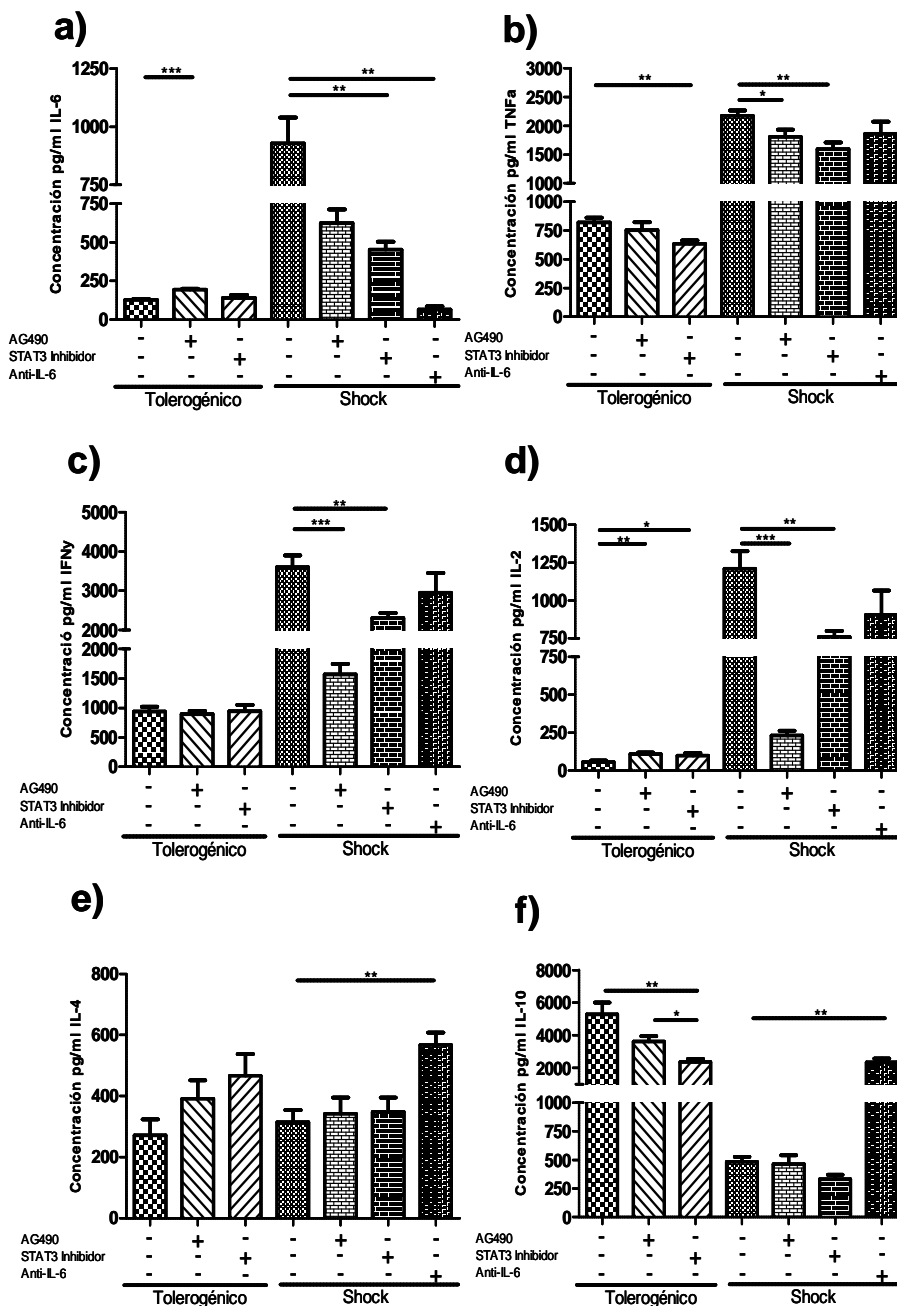


Figura 5.6. Expresión de los niveles de citocinas en sueros de ratones tratados con SEB en los que se utilizaron de los inhibidores AG490, anti IL-6 y STAT3 inhibitor VIII 5, 15, DPP . a) IL-6. b) TNF α . c) IFN γ . d) IL-2. e) IL-4. f) IL-10.

El uso de anti-IL-6 en los ratones SK resultó en una pérdida drástica en los niveles séricos de IL-6 ($927,6 \pm 111,8$ vs $66,12 \pm 19,45$ $p=0,0012$) en comparación con los observados en el SK, (Figura 5.6a) y provocó el aumento significativo de IL-4 ($348,1 \pm 46,92$ vs $567,3 \pm 40,42$. $p=0,019$) e IL-10 ($414,6 \pm 37,95$ vs $2330 \pm 252,9$. $p=0,0003$). (Figura 5.6e y f)

5.1.5 Análisis de la activación de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 en esplenocitos de ratones tratados con SEB que fueron pretratados con AG490, *iSTAT3* o anti IL-6.

5.1.5.1 STAT1 y STAT3 en citoplasma

El introducir AG490 en los ratones previamente a la inducción del shock tóxico, provocó una disminución en la intensidad de fosforilación de las isoformas α y β de STAT1. De manera similar ocurrió cuando se introdujo el *iSTAT3*, la fosforilación de las isoformas α y β disminuyó aunque con menor intensidad. (Figura 5.7a)

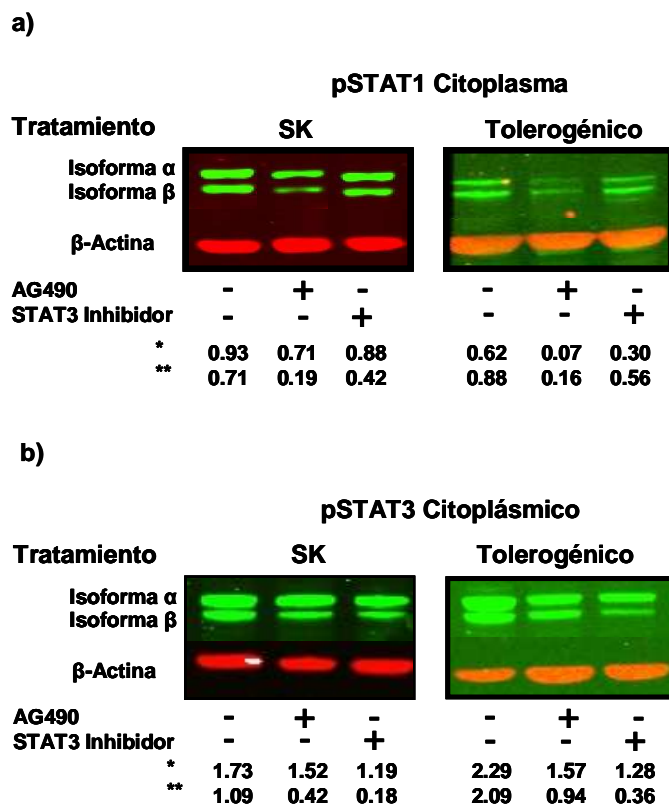


Figura 5,7 Determinación de los niveles de los factores de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 en citoplasma de esplenocitos de ratón en los que se ha utilizado AG490, *STAT3 inhibitor* VIII 5, 15, DPP . a) Niveles de fosforilación STAT1 en ratones en los que se indujo shock tóxico, o que fueron tolerizados. b) Niveles de fosforilación de STAT3 en ratones en los que se indujo shock tóxico, o que fueron tolerizados. *Ratio isoforma α vs β -actina. ** Ratio isoforma β vs β -actina

La introducción de AG490 o *iSTAT3* en los ratones Tol, también causó una disminución en la expresión de las isoformas α y β de pSTAT1.

Por un lado AG490 disminuyó a niveles casi indetectables la expresión de las isoformas α y β de pSTAT1, mientras que *iSTAT3* disminuyó casi en la mitad la expresión de las isoformas α y β de pSTAT1. (Figura 5.7a)

De otro lado, la expresión de las isoformas α y β de STAT3 disminuyó mucho más cuando se introdujo AG490 que cuando se introdujo *iSTAT3* en los ratones SK. (Figura 5.7b)

En el caso de los ratones Tol, la expresión de las isoformas α y β de pSTAT3 disminuyó mucho más cuando se introdujo AG490 que cuando se introdujo *iSTAT3*. (Figura 5.7b)

5.1.5.2 STAT1 y STAT3 en núcleo

En comparación con *iSTAT3*, el introducir AG490 provocó una mayor disminución en la expresión de las isoformas α y β de pSTAT1 tanto en los ratones Tol como en los ratones SK. (Figura 5.8a)

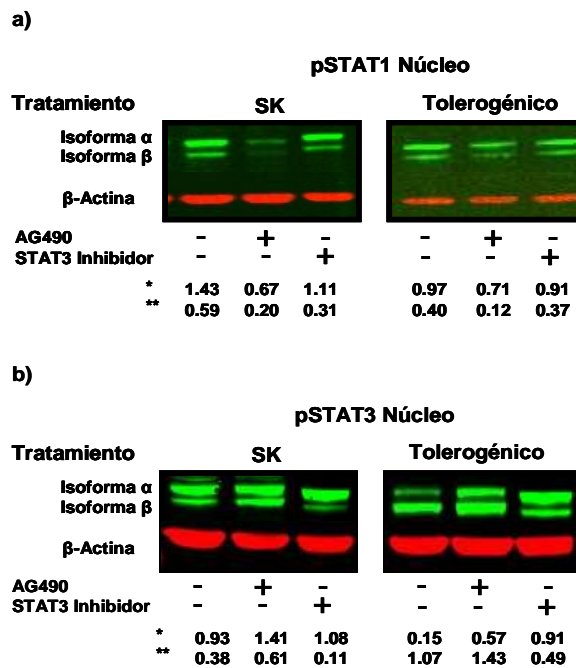


Figura 5.8 Determinación de los niveles de los factores de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 en el núcleo de esplenocitos de ratón en los que se ha utilizado AG490, *STAT3 inhibitor* VIII 5, 15, DPP . a) Niveles de fosforilación STAT1 en ratones en los que se indujo shock tóxico, o que fueron tolerizados. b) Niveles de fosforilación de STAT3 en ratones en los que se indujo shock tóxico, o que fueron tolerizados. *Ratio isoforma α vs β -actina. ** Ratio isoforma β vs β -actina

Contrario a lo ocurrido en el citoplasma, en los ratones SK la expresión de las isoformas α y β de pSTAT3 aumentó cuando se introdujo tanto AG490, sin embargo cuando se introdujo iSTAT3 la expresión de la isoforma α aumentó, mientras que la isoforma β disminuyó. (Figura 5.8b)

Para el caso de los ratones Tol, el uso de AG490 provoco aumento en la expresión de las isoformas α y β de pSTAT3. Sin embargo, el uso de iSTAT3, provoco un aumento en la expresión de la isoformas α , mientras que provoco una disminución marcada en la expresión de la isoformas β . (Figura 5.8b)

5.1.5.3 Anti-IL-6 modifica la activación de STAT3 en el shock tóxico.

Tanto IL-6 como IL-10 tienen la capacidad de activar STAT3, y tras observar un aumento en los niveles séricos de IL-10 en los ratones SK que previamente fueron tratados con anti IL-6, quisimos evaluar el comportamiento de STAT3 en los esplenocitos de estos ratones.

Tal como se observa en la figura 5.9, la utilización de anti-IL-6 en los ratones SK disminuyó la expresión de las isoformas α y β de pSTAT3, así IL-6 podría ser la principal responsable de la activación de STAT3 en los ratones SK

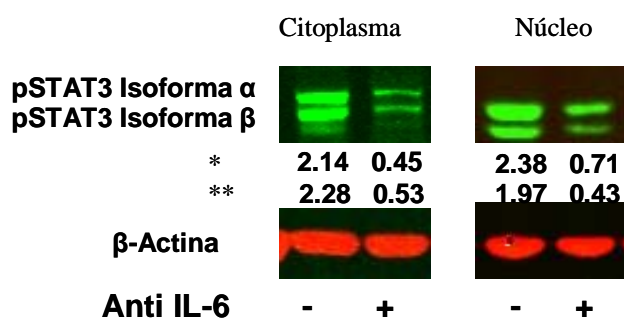


Figura 5.9. Análisis de la fosforilación de STAT3 En esplenocitos de ratones en los que se indujo shock tóxico y que fueron previamente tratados con anti IL-6. * Ratio isoforma α vs β -actina. ** Ratio isoforma β vs β -actina.

5.1.6 Análisis de la supervivencia de los ratones en los que se realizó transferencia adoptiva.

Para determinar si la población de linfocitos T CD4 presente en el bazo de los ratones Tol era la responsable de evitar su muerte, ratones no tratados recibieron vía intraperitoneal esplenocitos totales o linfocitos T CD4 purificados de ratones control o de ratones tolerizados. Pasadas 24 horas de la transferencia, se indujo shock tóxico en los ratones. Durante las 96 horas post inducción del shock tóxico, los ratones fueron supervisados.

Como se puede observar en la figura 5.10, el cien por cien de los ratones que recibieron esplenocitos totales o linfocitos T CD4 de ratones control, murieron en las 24 primeras horas tras la inducción del shock tóxico.

Por el contrario, el cien por cien de los ratones que recibieron tanto esplenocitos totales, o linfocitos T CD4 purificados de ratones tolerizados, sobrevivieron al shock tóxico.

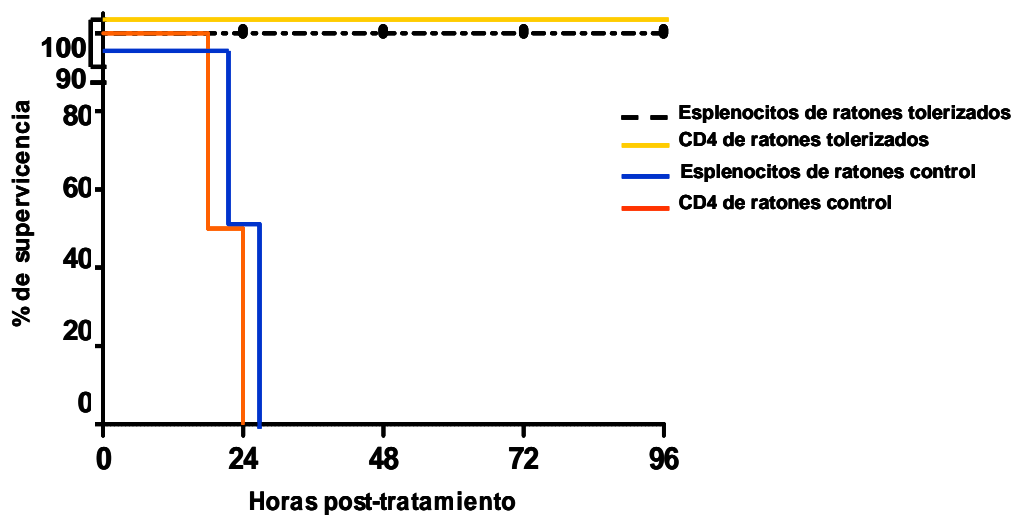


Figura 5.10: Análisis de supervivencias de los ratones que recibieron esplenocitos totales o células T CD4 purificadas de ratones control o de ratones que fueron tolerizados. Los resultados mostrados son el resultado de experimentos en el que se usaron como mínimo 3 ratones por grupo.

5.1.6.1 Citocinas en respuesta a la transferencia adoptiva de células T CD4 purificadas o esplenocitos totales.

Como se observa en la figura 5.11, los ratones que recibieron la transferencias de 5×10^7 esplenocitos, como los que recibieron 2×10^7 de células T CD4 purificadas de ratones Tol, presentaron niveles bajos de citocinas tipo Th1 e IL-6, y muy elevados de IL-10.

Por el contrario, en los ratones que recibieron la transferencia de 5×10^7 esplenocitos o como los que recibieron 2×10^7 de células T CD4 purificadas de ratones control, los niveles de IL-6, IFN γ e IL-2 fueron elevados, mientras que los niveles de IL-10 fueron bajos. (Figura 5.11) (Datos consignados en la tabla 5.1)

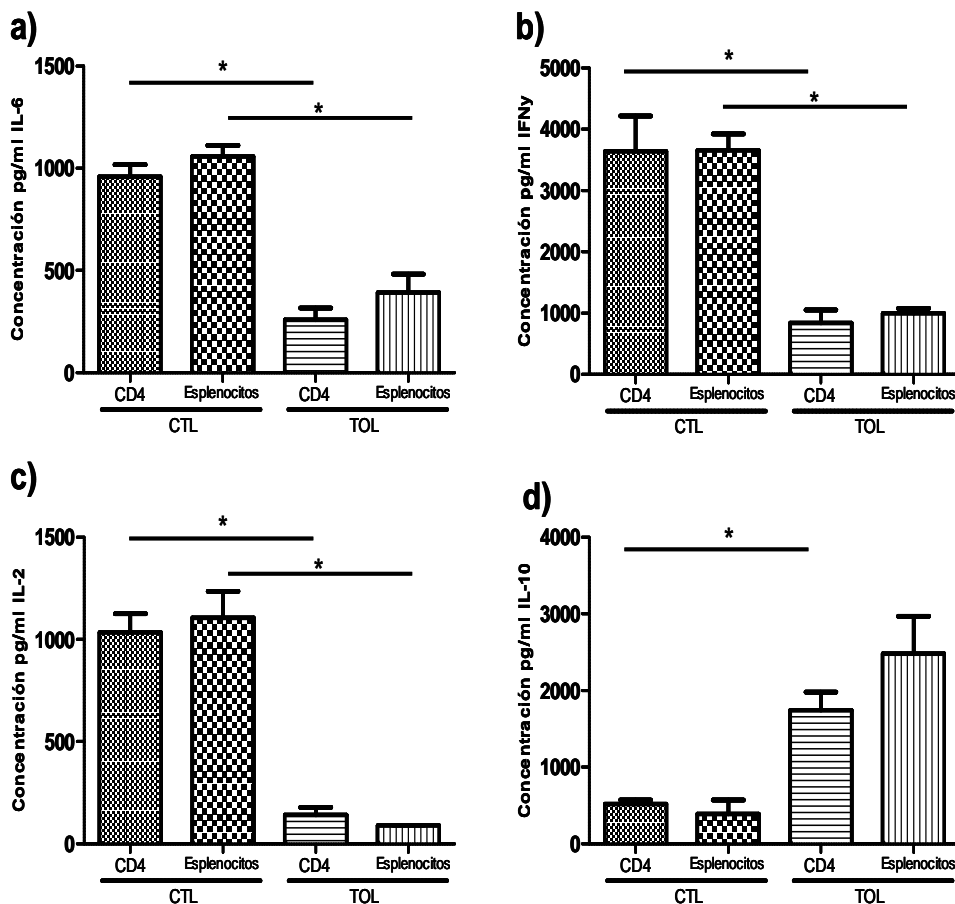


Figura 5.11. Niveles de citocinas en suero de ratones a los que se les transfirieron esplenocitos totales o linfocitos T CD4 purificados de ratones control o de ratones tolerizados. En la figura se representa los niveles determinados a las 2 horas tras la inducción del shock tóxico. a) IL-6, b) IFN γ , c) IL-2 y d) IL-10. En cada uno de los experimentos hubo una n de 2.

	Linfocitos TCD4		P valor	Esplenocitos		Pvalor
	Ctl	Tol		Ctl	Tol	
IL-6	959,5±58,5	259±58	0,013	1057±55	391,5±90	0,02
INF γ	3632±584	833,5±216,5	0,046	3647±274,5	994±77	0,01
IL-2	1033±94	141±37	0,012	1106±129	89±1	0,015
IL-10	517,5±54,5	1741±237	0,037	387,5±184	2483±489	ns

Tabla 5.1: Concentración sérica de IL-6, INF γ , IL-2 e IL-10 en ratones control que recibieron esplenocitos totales o linfocitos T CD4 purificados de ratones tolerizados o de ratones control. Concentración dada en pg/ml

5.1.7 Análisis de la expresión y modulación de TCRV β 8, de los receptores de citocinas y de CTLA4 por citometría de flujo.

Para el análisis por citometría de flujo, los ratones fueron tratados o no con AG490 o *iSTAT3* previo a la inducción del shock tóxico y durante el proceso de tolerización y 6 horas post inducción del shock tóxico, los ratones fueron sacrificados.

Para el análisis de la expresión de TCRs los animales no fueron pretratados con los inhibidores.

5.1.7.1 Análisis de la expresión de TCRV β 8

Aunque los superantígenos presentan afinidad por la isoforma β del receptor del linfocito T, existe una especificidad en la interacción de los SAg con los TCRs que puede modular la expresión de este receptor.

En nuestro caso concretamente, SEB que presenta altísima afinidad por los TCRV β 8, puede provocar una reducción en la expresión de este TCR y por tanto quisimos evaluar el comportamiento de los TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3 de manera independiente.

Tal como se puede observar en la figura 5.12a y b, tanto en ratones en los que se indujo el shock tóxico SK, como los que fueron tolerizados, la inoculación de SEB provocó una pérdida en el porcentaje de expresión tanto de TCRV β 8.1-2 como de TCRV β 8.3 en comparación con los ratones control.

En los linfocitos de ratones SK, la expresión TCRV β 8.1-2 decreció 8,48% mientras que la expresión de TCRV β 8.3 fue de 32,3%. (Figura 5.13a y b)

En el caso de los ratones en los que se estableció el proceso de tolerización, se observó una pérdida progresiva en la expresión de TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3 (Figuras 5.12b)

la primera inoculación de 3 μ g de SEB (T1), causó una leve pérdida en la expresión de los TCRV β 8.1-2, a la vez que una moderada disminución en la expresión de los TCRV β 8.3 (2,54% y 12,21% respectivamente) (Figura 5.13a y b).

A diferencia de lo ocurrido en T1, tras la segunda inoculación de 3 μ g de SEB (T2), la pérdida de la expresión de los TCR es más drástica en los TCRV β 8.1-2 que en los TCRV β 8.3. (Figura 5.13a y b)

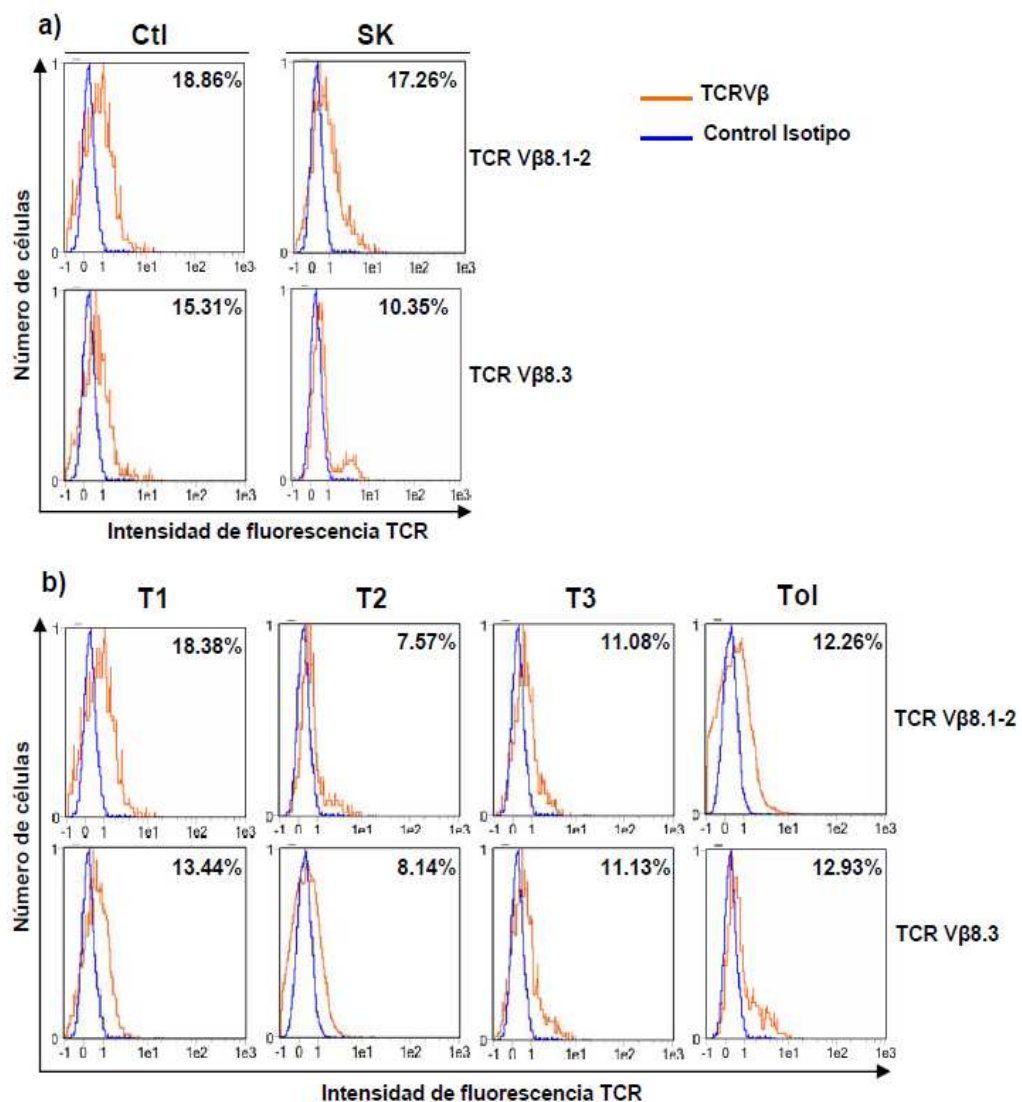


Figura 5.12. Análisis de expresión de TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3. a) Niveles de expresión de TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3. en linfocitos T CD4+ de ratones control (Ctl) y ratones en los que se indujo shock tóxico (SK). b) Niveles de expresión de TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3. en ratones durante la tolerización (T1, T2 y T3) y ratones tolerizados (Tol).

En los ratones T2 la expresión de TCRV β 8.1-2 decreció un 59,86% y la de TCRV β 8.3 un 46,83%. En los ratones T3 la expresión de TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3 decreció 40,1% y 27,01% respectivamente. (Figura 5.13a y b)

Cuando se indujo el shock tóxico en los ratones tolerizados, la expresión de TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3 fue mayor en comparación con T1, T2 y T3. (Figura 5.12b) Sin embargo la expresión de TCRV β 8.1-2 decreció un 32,25% y la expresión de TCRV β 8.3 un 14,44% en relación al control. (Figura 5.13a y b)

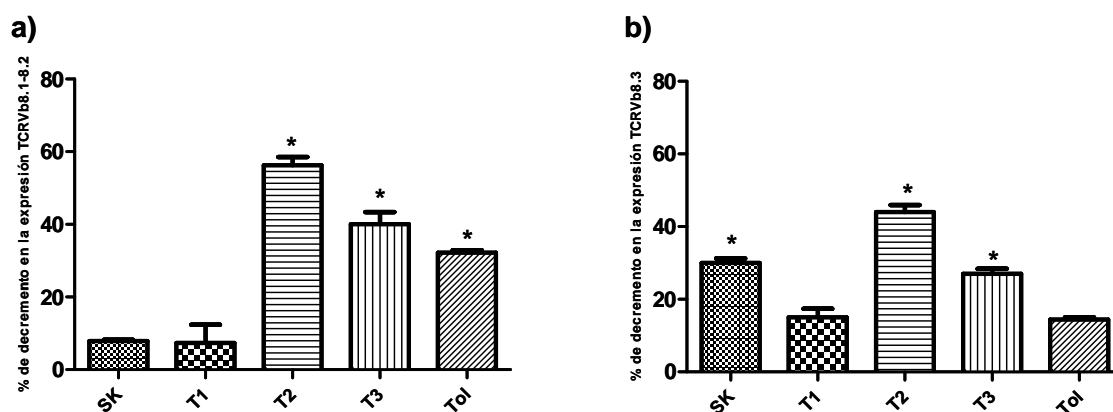


Figura 5.13. Análisis del decremento en la expresión de los TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3 en ratones tratados con SEB, a) Decremento de TCRV β 8.1-2 en ratones en los que se indujo el shock (SK), en ratones durante la tolerización (T1, T2 y T3) y ratones tolerizados (Tol). b) Decremento de TCRV β 8.3 en ratones en los que se indujo el shock tóxico, en ratones durante la tolerización y tolerizados.* Diferencia significativa respecto al control.

5.1.7.2 Análisis de la expresión del receptor α de IL-2 (IL-2R α).

La inducción del shock tóxico provocó un aumento en la expresión de IL-2R α en los linfocitos CD4+TCRV β 8+ de los ratones SK en comparación con los ratones Tol (34,6 \pm 2,194% p=0,0001). (Figura 5.13a) Sin embargo, aunque no eran el objeto principal de nuestro estudio, también se observó un aumento en la expresión de IL-2R α en los linfocitos TCD4+ TCRV β 8- de los ratones SK y TOL. (Figuras 5.13b)

Adicionalmente, el pretratamiento con AG490 o iSTAT3, causó una fuerte disminución en la expresión de IL-2R α en los linfocitos CD4+TCRV β 8+ tanto de los ratones SK como en los Tol. (Figura 5.13b)

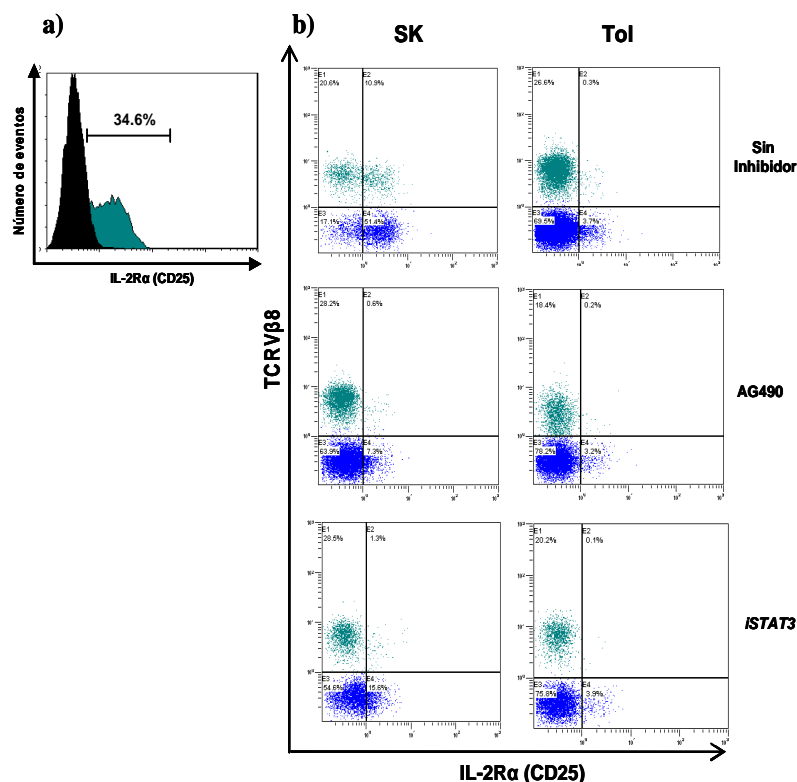


Figura 5.14. Análisis de la expresión del receptor de interleucina 2 (**IL-2R α**) en esplenocitos de ratones en los que se indujo shock tóxico (**SK**) o que fueron tolerizados (**Tol**), y en esplenocitos de ratones que fueron tratados con AG490 o iSTAT3 previamente a la inducción del shock tóxico o a la tolerización. Las imágenes presentadas son a partir de células T CD4+. a) Expresión de IL-2R α en ratones control (CTL). b) *Dot plots* de la expresión de IL-10R

1.7.3 Análisis de la expresión del receptor de IL-10 (IL-10R).

Tras la inducción de shock tóxico, se observó un aumento en la expresión de IL10R en los linfocitos T CD4+ tanto de ratones Tol como en los SK en comparación con el control. (Figura 5.15a y c)

Este aumento en la expresión de IL-10R fue significativamente mayor en los linfocitos T CD4+ de los ratones Tol en comparación con los SK. ($23,9 \pm 5,6\%$ Vs $7,4 \pm 2,6\%$ $p=0,0096$). (Figura 5.14b y a).

De otro lado, el pretratamiento con AG490 o con iSTAT3, causó una disminución en la expresión de IL-10R en los linfocitos T CD4+ de los ratones SK, no obstante uno hubo diferencia significativa entre los (Figura 5.14b y c).

La utilización de AG490 o iSTAT3 durante el proceso de tolerización provocó una caída en la expresión de IL-10R en los linfocitos TCD4⁺ de los ratones Tol. AG490 disminuyó en un 41,2± 3.12% (p=0.0043) la expresión de IL-10R, mientras que iSTAT3 la disminuyó en un 48,03±,67. (Figura 5.15b)

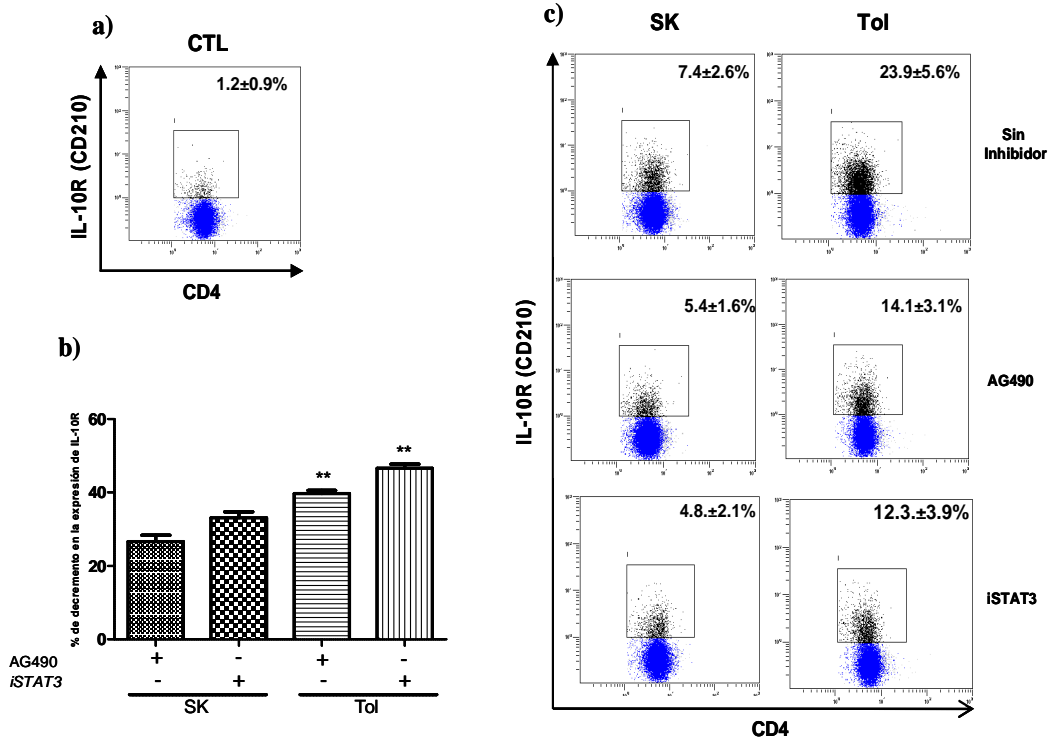


Figura 5.15. Análisis de la expresión del receptor de interleucina 10 (IL-10R) en esplenocitos de ratones en los que se indujo shock tóxico (SK) o que fueron tolerizados (Tol), y en esplenocitos de ratones que fueron tratados con AG490 o iSTAT3 previamente a la inducción del shock tóxico o a la tolerización. Las imágenes presentadas son a partir de células T CD4⁺. a) Expresión de IL-10R en ratones control (CTL). b) Porcentaje de decrecimiento en la expresión de IL-10R en linfocitos TCD4⁺ de ratones SK y Tol pretratados con AG490 o iSTAT3. c) Dot plots de la expresión de IL-10R ** Diferencia estadística respecto a los Tol

5.1.7.4 Análisis de la expresión del receptor β de IFN gama (IFNγRβ)

Aunque SEB provocó un aumento en la expresión de IFNγRβ tanto en los ratones SK como en los ratones Tol en comparación con los Ctl, (Figura 5.16a y c) sin embargo, fueron los ratones SK los que presentaron un mayor porcentaje en la expresión de IFNγRβ en comparación con los ratones Tol (35,83±2,94 vs 17,37±2,38 P=0,003). (Figura 5.16a)

Como se observa en la figura 5.16b, el pretratar con AG490 los ratones SK, provocó una disminución del 66,67±7,28% (p=0,007) en la expresión de IFNγRβ, mientras que

pretratarlos con *iSTAT3*, provocó una disminución del $37,28 \pm 4,62\%$ ($p=0,02$) en la expresión de $IFN\gamma R\beta$ en sus linfocitos en comparación con los no tratados.

La misma tendencia fue observada cuando los ratones Tol fueron pretratados con AG490 o con *iSTAT3*, AG490 llevó a una disminución en la expresión de $IFN\gamma R\beta$ $69,08 \pm 8,78\%$ ($p=0,0013$), mientras que el pretratamiento con *iSTAT3* redujo la expresión de $IFN\gamma R\beta$ en $19,17 \pm 5,27\%$ ($p=0,005$) en comparación con los ratones Tol no pretratados. (Figura 5.16b)

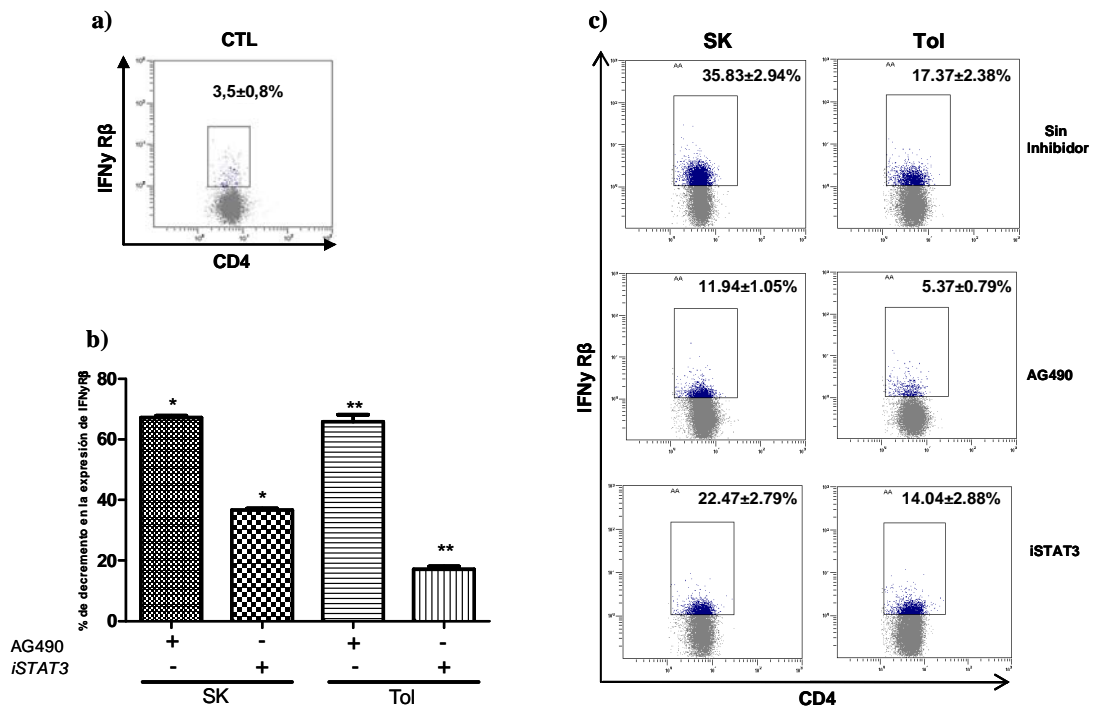


Figura 5.16. Análisis de la expresión del receptor β de interferon gamma ($IFN\gamma R\beta$) en esplenocitos de ratones en los que se indujo Shock tóxico (SK) o que fueron tolerizados (Tol), y en esplenocitos de ratones que fueron tratados con AG490 o *iSTAT3* previamente a la inducción del shock tóxico o a la tolerización. Las imágenes presentadas son a partir de células T CD4+. a) Expresión de $IFN\gamma R\beta$ en linfocitos T CD4+ ratones control (CTL). b) Porcentaje de decremento en la expresión de $IFN\gamma R\beta$ en linfocitos TCD4+ de ratones SK y Tol pretratados con AG490 o *iSTAT3*. c) *Dot plots* de la expresión de $IFN\gamma R\beta$.

* Diferencia estadística respecto a los SK. ** Diferencia estadística respecto a los Tol

5.1.7.5 Análisis de la expresión de CTLA4

Aunque en todos los tratamientos se observaron dos poblaciones positivas para CTLA4, para el análisis de nuestros resultados, se tuvo en cuenta la sumatoria de estas dos poblaciones.

Mientras que los niveles de expresión de CTLA4 en esplenocitos de ratones SK no se modificaron respecto al control, (Figura 5.17a y b) los niveles de expresión de CTLA4 en linfocitos de ratones Tol aumento $20,09 \pm 2.17\%$ ($p=0,0001$) respecto al control. (Figura 5.17a y b)

Por su parte el pretratamiento de los ratones SK con AG490 provocó un aumento no significativo de $4,19 \pm 0,59\%$ ($p=0,05$) en la expresión de CTLA4, mientras que tratarlos con *iSTAT3* provocó una disminución en el porcentaje de expresión de CTLA4 en comparación con los ratones SK tratados con AG490 ($4,19 \pm 0,59$ vs $2,43 \pm 0,24$). (Figura 5.17b)

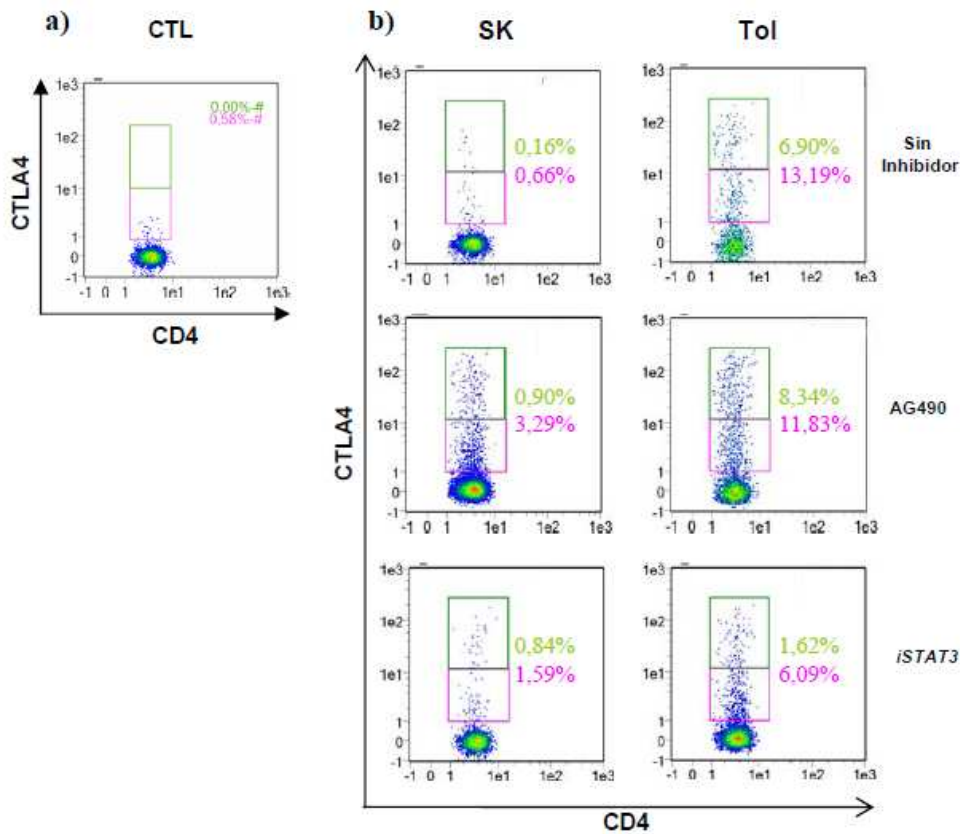


Figura 5.17. Análisis de la expresión de Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4) en esplenocitos de ratones en los que se indujo shock tóxico (SK) o que fueron tolerizados (Tol), y en esplenocitos de ratones que fueron tratados con AG490 o *iSTAT3* previamente a la inducción del shock tóxico o a la tolerización. a) Expresión de CTLA4 en ratones control (CTL). b) Dot plots de la expresión de CTLA4

De otro lado, el pretratamiento de los ratones Tol con AG490 no afectó la expresión de CTLA4. (Figura 5.17b) Por el contrario, el pretratamiento de los ratones Tol con iSTAT3, provocó la disminución en el porcentaje de expresión de CTLA4 en comparación con los no tratados ($7,7 \pm 0,748$ vs $20,09 \pm 2,29$ $P = 0,0055$) (Figura 5.17b)

5.2 Evaluación de la respuesta a SEB *in vitro*.

5.2.1 Determinación de la dosis óptima de SEB para estimulación *in vitro*

Para determinar la dosis óptima que estimule la producción de citocinas y que a la vez cause menor mortalidad en las células estimuladas, se cultivaron esplenocitos totales de ratones control con 1, 2, 5 y $10 \mu\text{g}$ de SEB durante 72 horas. Los sobrenadantes fueron colectados a las 24, 48 y 72 post-cultivo. Los niveles de IL-10, $\text{IFN}\gamma$ e IL-2 fueron determinados a las 48 y 72. La viabilidad celular fue evaluada a las 72 horas de cultivo.

Como se observa en la tabla 5.2 y la figura 5.17c, la estimulación de esplenocitos totales con $1 \mu\text{g}$ de SEB, presentó los niveles más bajos de citocinas y una mortalidad de 69%.

En el sobrenadante de esplenocitos estimulados con $2 \mu\text{g}$ de SEB se pudieron determinar niveles de IL-2, $\text{IFN}\gamma$ e IL-10 en las 48 horas, con un aumento progresivo en las 72 horas, especialmente de la IL-10. La viabilidad que presentaron los esplenocitos con esta dosis fue la más elevada (92%). (Tabla 5.2 y la figura 5.17c)

Cuando se estimuló con $5 \mu\text{g}$ de SEB, los niveles de IL-2 e $\text{INF}\gamma$ aumentaron en las primeras 48 horas, sin embargo fue a las 72 horas cuando los niveles de IL-10 fueron considerablemente elevados, por el contrario, el nivel de $\text{INF}\gamma$ bajo. La viabilidad celular fue de 87%.

Los esplenocitos que fueron estimulados con $10 \mu\text{g}$ de SEB, presentaron niveles de IL-2 e $\text{INF}\gamma$ altos en las primeras 48 horas, sin embargo el nivel de IL-2 disminuyó a las 72 horas. Adicionalmente, la viabilidad celular de los esplenocitos resultó la más baja (52%) en comparación con las otras dosis.

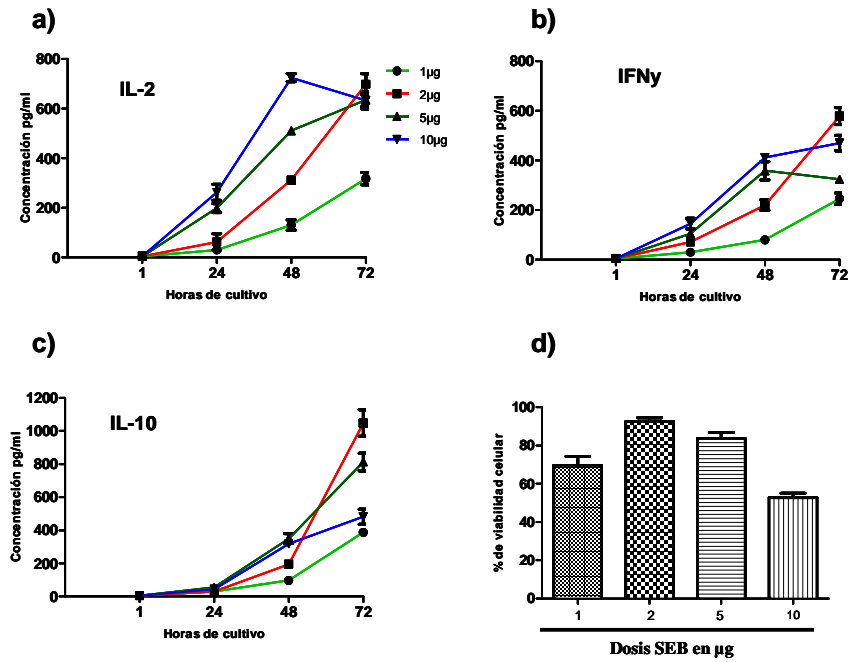


Figura 5.18. Niveles de citocinas en sobrenadoantes de cultivo de esplenocitos de ratones control y porcentaje de viabilidad celular para determinar la dosis óptima de SEB para la estimulación *in vitro* a) Niveles de IL-2, b) Niveles de IFN γ , c) Niveles de IL-10 y d) porcentaje de viabilidad celular.

Por el comportamiento en la producción de citocinas y la viabilidad celular que se observó en los esplenocitos estimulados con 2 µg de SEB, se tomó la determinación de usar esta dosis para estimular los esplenocitos.

5.2.2 Evaluación de la capacidad proliferativa.

Esplenocitos de ratones control (CTL), de ratones tolerizados (Tol) y de ratones tolerizados pretratados con AG490 (ATol), fueron estimulados con 2 µg de SEB o con anti CD3/CD28 (2 µg/ml/1 µg/ml), marcados con CFSE y cultivados durante 72 horas.

La estimulación de esplenocitos Ctl con SEB o con anti CD3/CD28 provocó un gran aumento en su proliferación, especialmente al ser estimulados con anti CD3/CD28, 45,1±2,48% y 94,63±1,09% respectivamente. (Figura 5.17a, d y g)

Como se observa en la figura 5.17e y d, los esplenocitos de Tol, presentaron una proliferación más baja que los esplenocitos Ctl estimulados con 2µg de SEB (4,9±0,40% vs 45,1±2,48% P=0,0001), sin embargo, cuando los Tol fueron estimulados con anti CD3/CD28, presentaron mayor proliferación que los estimulados con SEB (61,1±1,9% vs 4,9±0,40 % P=0,0001). (Figura 5,17h y e).

Sin embargo, esa proliferación fue menor en comparación a la proliferación que ocurrió en los esplenocitos de ratones control cuando fueron estimulados con anti CD3/CD28 (61,1±1,9% vs 94,63±1,09% P=0,0001). (Figura 5.17c e i)

Cuando ratones ATol fueron tratados con SEB o con anti CD3/CD28, la proliferaron aumento en comparación con su respectivos Tol. (88,2±3,88% vs 4,9±0,40 % P=0,0001) (Figura 5.17e y f), y (72,8±3% vs 61,1±1,9% P=0,03) (Figura 5.17 i y h).

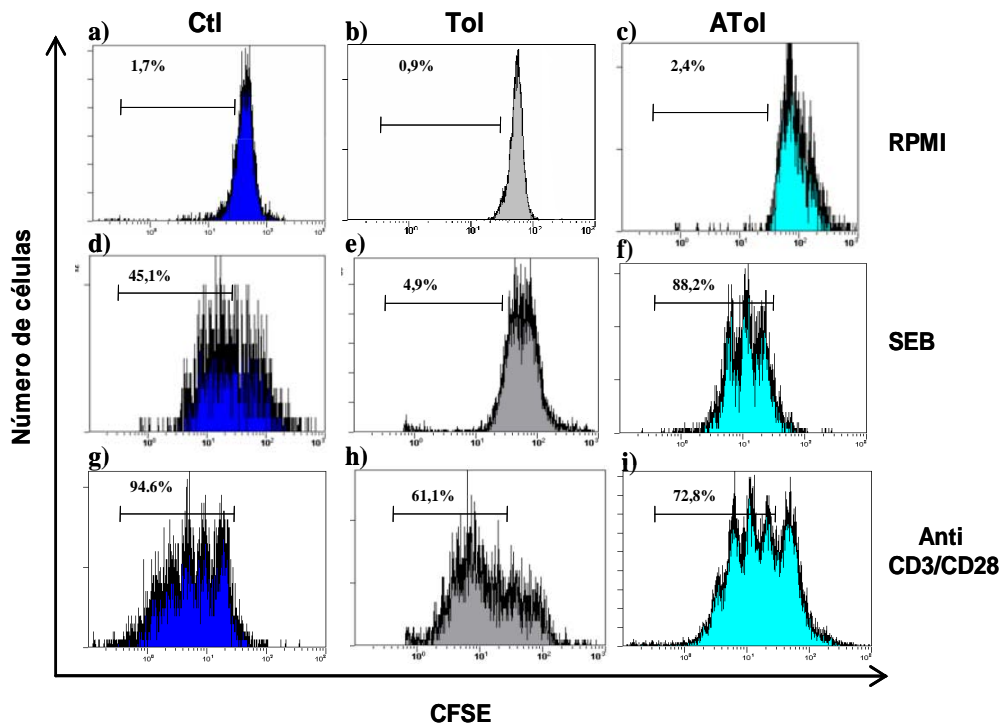


Figura 5.17. Evaluación de la capacidad proliferativa. Esplenocitos de ratones control (Ctl), o de los ratones tolerizados (Tol) y de ratones tolerizados pretratados con AG490 (ATol) fueron estimulados con 2µg/ml de SEB o anti CD3 2µg/ml/anti CD28 1µg/ml, marcadas con CFSE y cultivadas durante 72 horas.

5.2.3 Determinación de los niveles de citocinas en sobrenadante de cultivo.

Los niveles de IL-6, IFN γ , IL-2 e IL-10, fueron determinados en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones control (Ctl), de ratones tolerizados (Tol) y de ratones tolerizados pretratados con AG490 (ATol). Los sobrenadantes fueron colectados a las 48 y 72 horas.

5.2.3.1 Sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con SEB

A la 48 horas, los niveles de IL-2 e IL-10, fueron significativamente menores en los sobrenadantes de esplenocitos de ratones tolerogénicos pretratados con AG490 cultivados y estimulados con 2 μ g de SEB en comparación con los sobrenadante del control (191,9 \pm 15,83 vs 252,6 \pm 18,73 p=0,048 para IL-2 y 135,2 \pm 19,78 vs 205,3 \pm 10,01 p=0,01 para IL-10) figura 5,18c y d. Adicionalmente, los niveles de IL-2 fueron significativamente menores en los sobrenadantes de esplenocitos de ratones tolerogénicos en comparación con los niveles del control. (178,7 \pm 19,04 vs 252,6 \pm 18,73 p=0,0054).

A las 72 horas, los niveles de IFN γ , fueron más bajos en los sobrenadantes de esplenocitos de ratones Tol y ATol cultivados y estimulados con 2 μ g de SEB en comparación con los sobrenadante del control. La diferencia fue significativa para los sobrenadantes de Tol (448,3 \pm 25,81 vs 808,1 \pm 69,16 p=0,0028).Figura 5.18b

En cuanto a la IL-10, los niveles fueron más altos bajos en los sobrenadantes de ratones Tol cultivados en comparación con los sobrenadante del Ctl (2323 \pm 170,3 vs IL-2 fue significativamente baja en los sobrenadantes de esplenocitos de ratones Tol que en los Ctl (538,4 \pm 13,07 vs 676,5 \pm 22,46 p=0,0028). Figura 5.18c.

1506 \pm 88,67 p=0,0054), (Figura 5.17d) pero significativamente más bajos en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos de los ratones ATol (815,4 \pm 31,61 vs 1506 \pm 88,67 p=0,0003). Figura 5.18d.

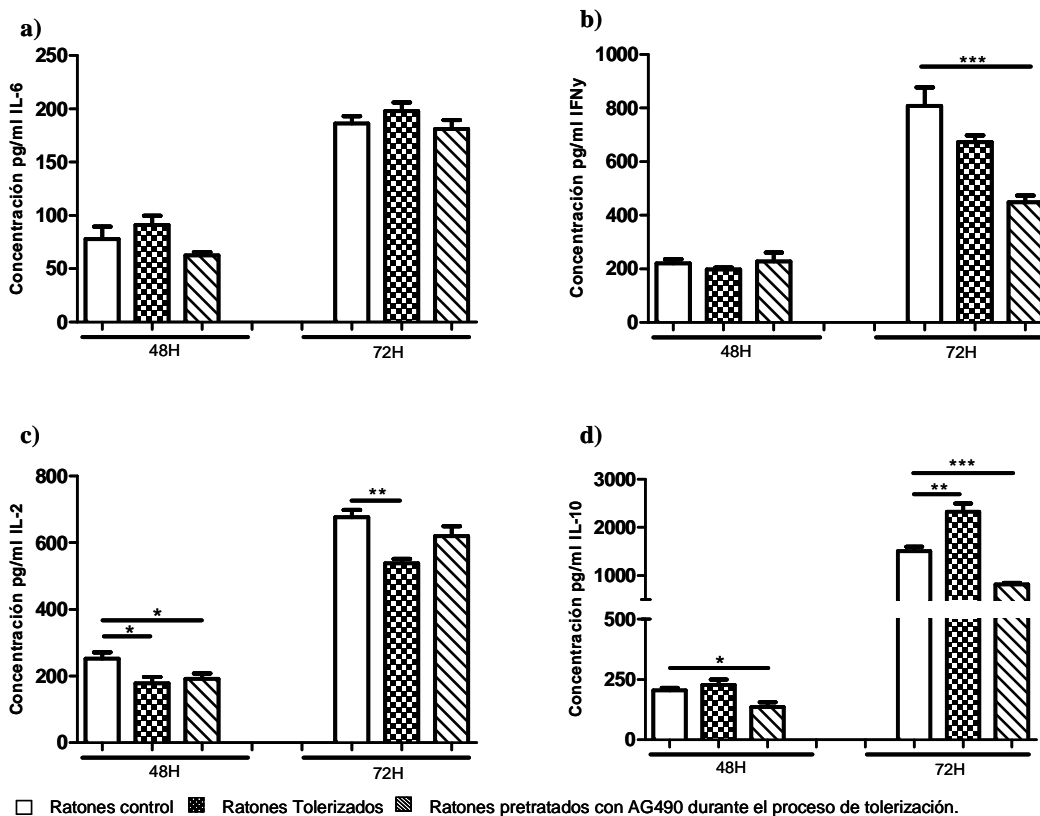


Figura 5.20. Niveles de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratones control, tolerizados, o tolerizados pretratados con AG490, estimulados con SEB. En la figura se representa los niveles determinados en el sobrenadante colectado a las 48 y 72 horas. a) IL-6, b) IFN γ , c) IL-2 y d) IL-10

5.2.3.2 Determinación de los niveles de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con anti CD3/CD28

A las 48 horas de cultivo, tanto los niveles de IL-6 como los de IL-10 fueron similares entre tratamientos, (Figura 5.21a y d)

Por el contrario, los niveles de IFN γ de ATol fueron significativamente menores en comparación con los Ctl ($229 \pm 26,85$ vs $477,6 \pm 45,96$ $p=0,0034$). Figura 5,19b Aunque los niveles de IFN γ de Tol fueron más altos, no se apreció diferencia significativa.

Similar a lo observado en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos estimulados con SEB, a la 48 horas, los niveles de IL-2 fueron significativamente menores en los Tol y ATol en comparación con Ctl ($595 \pm 47,72$ vs $1227 \pm 76,66$ $p=0,0004$ y $567,7 \pm 45,61$ vs $1227 \pm 76,66$ $p=0,0003$ respectivamente) figura 5,19c.

A las 72 horas, los niveles de IL-6, IFN γ , IL-2 e IL-10 fueron más elevados que los determinados a las 48 horas, sin embargo, los niveles IL-6 e IL-2 fueron menores en Tol que en los Ctl ($235,2\pm 22,53$ vs $338,4\pm 28,74$ $p=0,031$ y 1165 ± 97 vs $2369\pm 91,67$ $p=0,0001$) respectivamente. (Figura 5.19a y c).

Tanto los niveles de IFN γ como IL-2, fueron significativamente menores en ATol que en los Ctl ($461,8\pm 21,15$ vs $1019\pm 49,62$ $p=0,0001$ y $2369\pm 91,67$ vs $1165\pm 97,13$ $p=0,0001$) respectivamente. (Figura 5,19b y c)

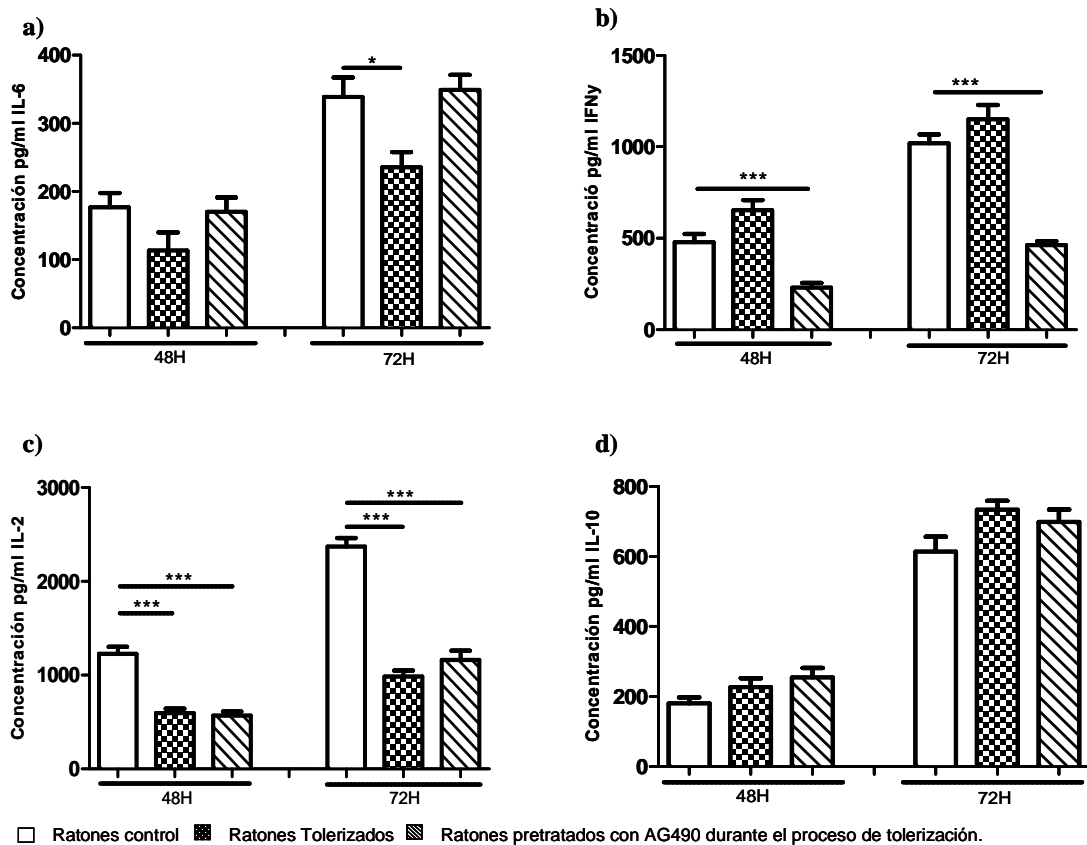


Figura 5.21. Niveles de citocinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratones control, tolerizados, o tolerizados pretratados con AG490, estimulados con anti CD3/CD28. En la figura se representa los niveles determinados en el sobrenadante colectado a las 48 y 72 horas. a) IL-6, b) IFN γ , c) IL-2 y d) IL-10

5.2.4 Identificación de las poblaciones celulares productoras de IL-10 e IFN γ por citometría de flujo.

Para identificar las poblaciones productoras de tanto de IL-10 como de IFN γ , esplenocitos de ratones control, de ratones tolerizados y de ratones tolerizados pretratados con AG490 fueron cultivados durante 72 horas. 6 horas antes de la finalización de ese periodo, se les adiciono GolgiStopTM.

Tal como se ilustra en las figura 5.20a, la población de las células CD3+, CD4+, CD45RBlow, fue más abundantes en los esplenocitos de ratones tolerizados, que en los esplenocitos de ratones tolerizados pretratados con AG490 y que los controles 68,15%, 20,31% y 14.64% respectivamente.

En esta población CD3+, CD4+, CD45RBlow, en promedio, el 43% de las células expreso LAG3 indistintamente del tratamiento que hayan recibido los ratones. Sin embargo, la diferencia fue en el porcentaje de células positivas para IL-10.

En los ratones tolerizados, el 34,59% de la de las células de la población CD3+, CD4+, CD45RBlow, LAG3+, fueron positivas para IL-10 Figura 5.20a

En los ratones tolerizados pretratados con AG490, el 9,9% de la de las células de la población CD3+, CD4+, CD45RBlow, LAG3+, figura 5.20b, fueron positivas para IL-10, mientras que solo el 2,2% de las células de los ratones control fue positiva para IL-10 figura 5.20c

De otro lado, LAG3 no fue expresado en las células CD3+, CD4+, CD45RBHigh, en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, el 19,43% de la población CD3+, CD4+, CD45RBHigh LAG3- de los ratones control, fue positiva para Finí figura 5.20c

En cuanto a los ratones tolerizados solo el 3,05% de la población CD3+, CD4+, CD45RBHigh LAG3- fue positiva para IFNy, mientras que el 9,66% de la población en ratones tolerizados pretratados con AG490, fue positiva para IFNy, figura 5.20a y b respectivamente.

La identificación de la población productora de INFy se realizo partiendo de células CD4+CD45RBlow LAG3+.

Como se puede observar en la figura 5.21, la población que más produjo INFy tanto en los cultivos de esplenocitos de ratones tolerizados, tolerizados pretratados con AG490 y control estimulados con 2µg de SEB, fue la población CD4+CD45RBlow LAG3+IL-10- , Figura 5.21a, c y e.

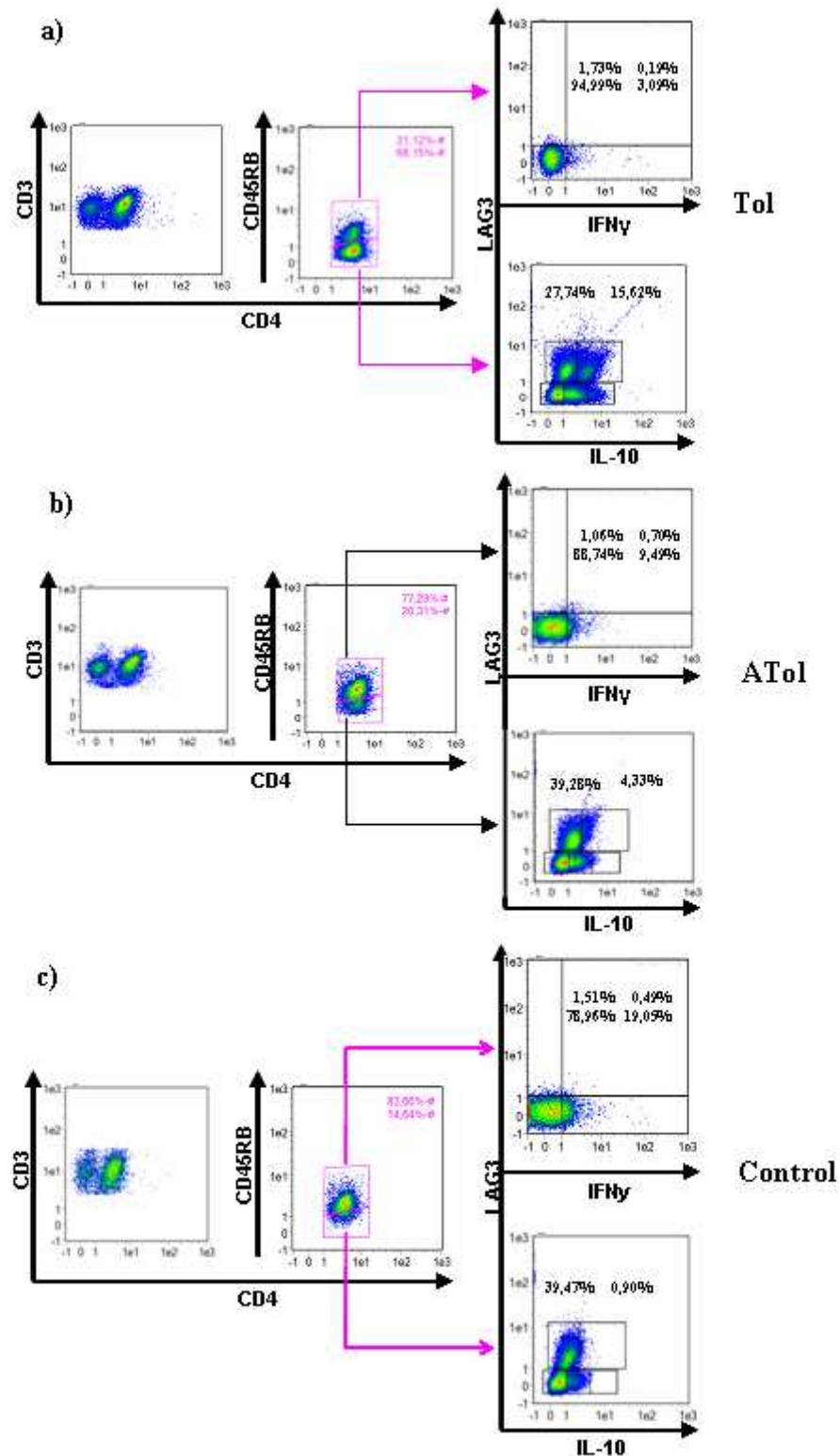


Figura 5.22. Identificación de las células productoras de IL-10. Las células CD3⁺CD4⁺CD45RB^{low} fueron las principales productoras de IL-10 en cultivo de esplenocitos de ratones tolerizados, panel a. En los ratones tolerizados pretratados con AG490, esta población fue reducida, panel b. Mientras que en los ratones control estuvo prácticamente ausente panel c.

La población CD4⁺CD45RB^{low} LAG3⁺IL-10⁻ de los ratones control fue la más positiva para INF γ , mientras que las CD4⁺CD45RB^{low} LAG3⁺IL-10⁻ de los ratones

tolerizados pretratados con AG490 fue la más baja ($21,24 \pm 2,92\%$ vs $10,41 \pm 1,77\%$ $P=0,0072$). Figura 5.21e y c.

Por su parte, el porcentaje de expresión de IFN γ en células CD4⁺CD45RB^{low} LAG3⁺IL-10⁻ de ratones tolerizados, fue menor en relación a los control ($21,24 \pm 2,92\%$ vs $17,17 \pm 1,83$) figura 5.21e y a, pero significativamente más elevada que los ratones tolerizados pretratados con AG490 ($17,17 \pm 1,83$ vs $10,41 \pm 1,77\%$ $P=0,04$). (Figura 5.21a y c)

En la población CD4⁺CD45RB^{low} LAG3⁺IL-10⁺ de los esplenocitos de ratones fue muy baja por lo que la determinación de las células que expresan IFN γ no se pudo determinar.

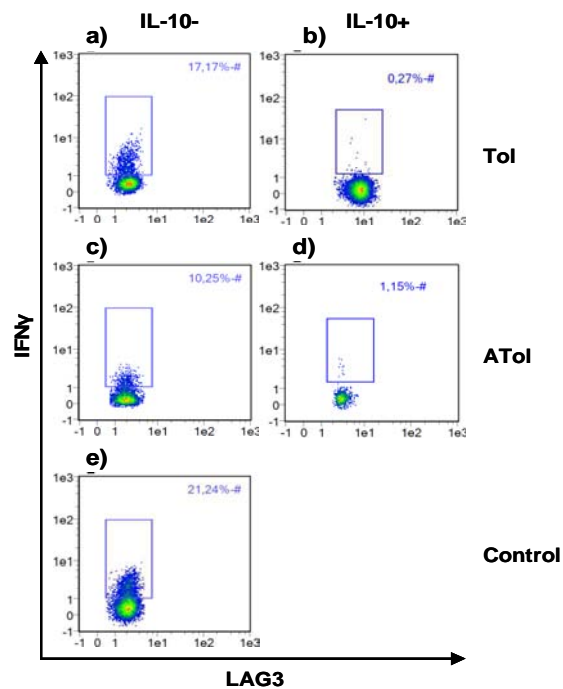


Figura 5.21. Población celular productora de IFN γ en cultivos de esplenocitos de ratones. Las células analizadas fueron seleccionadas por la expresión de CD3⁺CD4⁺CD45RB^{low} LAG3⁺ y agrupadas en función de la producción o no de IL-10

Análisis de la expresión génica.

Los niveles de expresión de *Diacylglycerol Kinase alpha* (DGK α), *Aryl Hidrocarbon Receptor* (AhR), *Lymphocyte specific protein tyrosine kinase* (LcK) y *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* (Fyn), fueron determinados en linfocitos TCD4 purificados de

ratones que fueron tratados con AG490 (ASK) o con iSTAT3 (SSK) previo a la inducción del shock tóxico y de ratones que fueron tratados con AG490 o con iSTAT3 durante el proceso de tolerización (ATol y STol respectivamente).

En comparación con SK, en los ratones Tol hubo una mayor expresión de DGK α (3,9 veces), y AhR (2,1 veces), mientras que la expresión de LcK disminuyó (0,47 veces). (Figura 22)

En cuanto a Fyn, no hubo diferencias en la expresión.

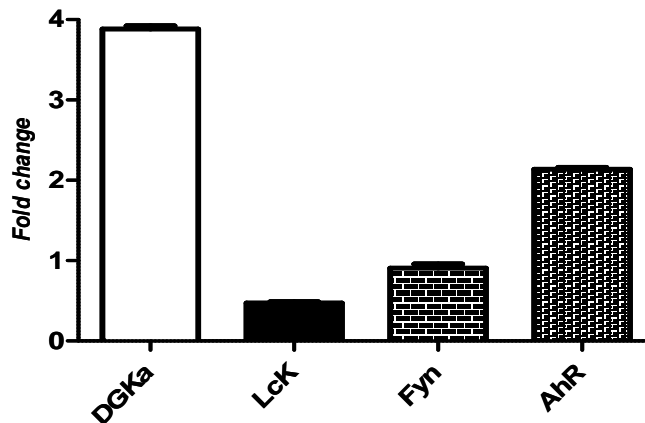


Figura 22. Niveles de expresión de los genes *Diacylglycerol Kinase α* (DGK α), *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (LcK), *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* (Fyn) y *Aryl hydrocarbon receptor* (AhR). En la imagen se representa la expresión relativa de los genes indicados en los ratones tolerogénicos respecto a los ratones en los que se indujo el shock tóxico

Los niveles de expresión de DGK α y LcK fueron menores (0,61 y 0,55) en ASK, mientras que en SSK no se afectó la expresión. (Figura 23a y b) Fyn y AhR tampoco se vieron modificadas en ASK ni SSK. (Figura 23c y d)

De otro lado, en linfocitos TCD4 de ATol y STol no se modificó la expresión de DGK α , LcK ni Fyn. (Figura 23a, b y c) Sin embargo, la expresión de AhR se redujo 0,65 veces en STol. (Figura 23d)

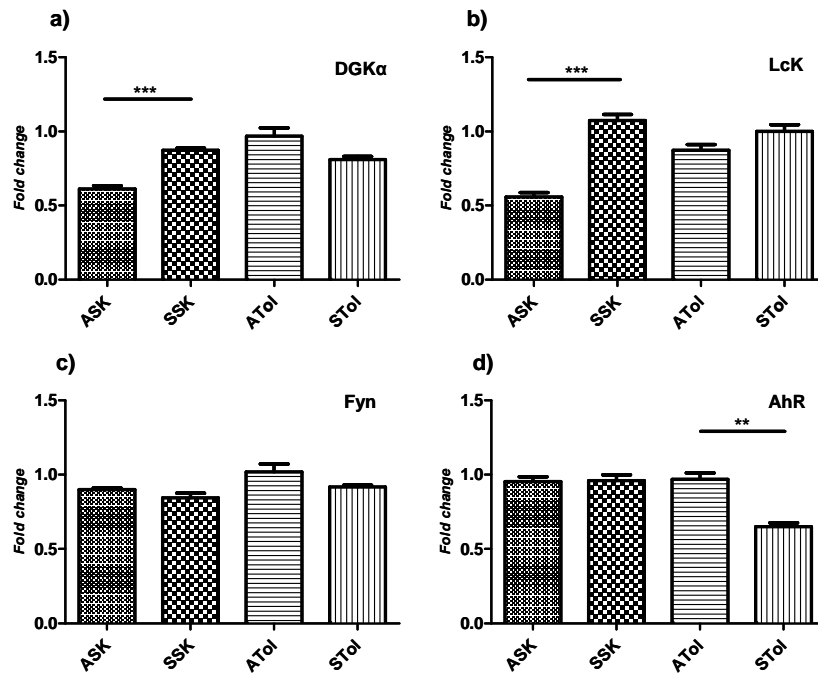


Figura 23. Niveles de expresión génica de *Diacylglycerol Kinase α* (DGKα) a), *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (LcK) b), *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* (Fyn) c), *Aryl hydrocarbon receptor* (AhR) d), en ratones pretratados con AG490 o *iSTAT3* y posterior inducción del shock tóxico ASK y SSK respectivamente, y en los ratones pretratados con AG490 o *iSTAT3* durante el proceso de tolerización con posterior inducción del shock tóxico ATol y STol respectivamente. En la imagen se representa la expresión relativa de los genes de los ratones tratados en relación a los no tratados con inhibidor en cada grupo de estudio. SK y Tol

Tras la precipitación

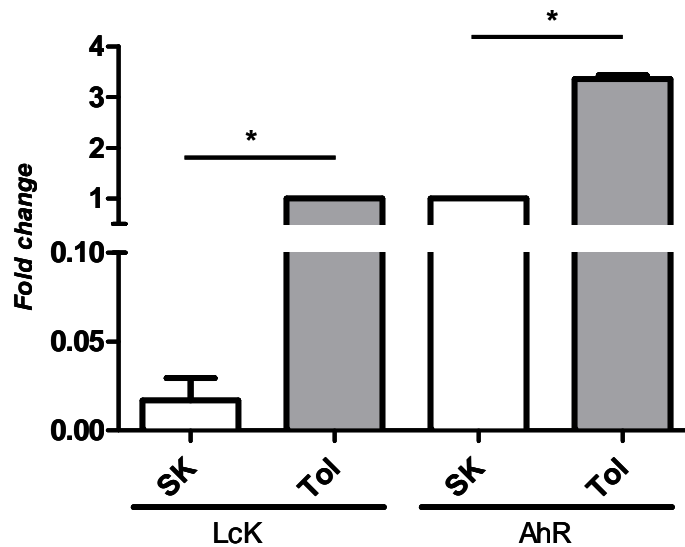


Figura 24. Niveles de expresión de los genes *Diacylglycerol Kinase α* (DGKα), *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (LcK), *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* (Fyn), *Aryl hydrocarbon receptor* (AhR) inmunoprecipitados con pSTAT1 y pSTAT3. En la imagen se representa la expresión relativa de los genes Inmunoprecipitados con pSTAT1 y pSTAT3 respecto a pSTAT1 de los ratones en los que se indujo el shock tóxico SK o en los ratones tolerizados Tol.

6. DISCUSIÓN

Citocinas en el shock tóxico tras la estimulación con SEB

En concordancia con lo descrito por otros autores, la inoculación de 25µg de SEB en combinación con 25mg de D-galactosamina, llevo a la liberación masiva de citocinas.^{204,205}

Dos horas después de la inducción del shock tóxico, pudieron ser detectados elevados niveles de citocina de tipo Th1 (IL-2 e IFNγ), IL-6 y TNFα, y moderados IL4 en suero de los ratones. Todos los ratones tratados murieron en las primeras 24 horas por el shock tóxico.

Modular la señalización provocada por citocinas proinflamatorias rescata de la muerte a los ratones estimulados con SEB

La relevancia de IFNγ y TNFα ha sido revelada por algunos trabajos. En estudios realizados con ratones knockout para IFNγ-R, los ratones fueron resistentes a shock inducido por lipopolisacaridos, mientras que en los ratones control, se hallaron niveles 10 veces más elevados de TNFα y el 80% de los ratones murieron.²⁰⁶ Adicionalmente, en el estudio de Dingues y Shlievert, los ratones tratados con anti IFNγ sobrevivieron al Soc. tóxico inducido por lipopolisacaridos.²⁰⁷

En cuanto a TNFα, su papel relevante en el shock tóxico quedo demostrado en los trabajos realizados por Miethke y colaboradores,³² y Diao y colaboradores.²⁰⁸ Ellos observaron que al tratar ratones con anticuerpo ant TNFα, disminuian el daño de tejidos y evitaron la muerte inducida por shock tóxico.

El papel de IL-6 aparece algo controversial. Por un lado IL-6 vía señalización IL-6-gp130-STAT3 previene la muerte celular inducida por activación en linfocitos T CD4 de ratones estimulados con SAGs, de tal manera que evitaría la delección clonal con lo que podría perpetuar la respuesta inflamatoria de las células T CD4 activadas.²⁰⁹

De otro lado, ratones C57BL/6 deficientes para IL-6 infectados con *Streptococcus pyogenes*

presentaron elevados niveles de TNF α , mayor necrosis muscular y muerte de los animales que en los ratones C57BL/6 control infectados,²⁰⁸ sugiriendo un papel regulador de IL-6 en el shock tóxico.

En nuestro trabajo utilizamos AG490, un inhibidor específico de la *protein tyrosine kinase* JAK2, que inicialmente fue pensado para inhibir específicamente JAK2,²¹⁰ pero que también puede inhibir la vía de señalización mediada por JAK1 y JAK3,^{211,212} y que ha sido utilizado por otros autores²¹³ para evaluar el papel de JAK2/NF κ B en sépsis.

AG490 provocó una caída en los niveles de citocinas IL-6 e IFN γ , citocinas que señalizan a través de JAK2, y evitó la muerte de los ratones en los que se indujo el shock tóxico. Adicionalmente, redujo los niveles de IL-2 posiblemente por la modulación de la vía de JAK3/STAT5a/b de la que depende IL-2.²¹⁴

Aunque no se ha descrito el uso de *iSTAT3* como modulador de la respuesta a SEB, la utilización de esta molécula resultó en una caída moderada los niveles de IL-6 y de IFN γ y rescato de la muerte al 80% de los ratones en los que se indujo el shock tóxico.

Al observar que la reducción en los niveles de IL-6 e IFN γ era característico en los ratones que no morían tras la inducción del shock tóxico y habiendo evaluado el papel de IFN γ , decidimos evaluar el papel de IL-6 administrando anti IL-6 una hora antes de inducir el shock tóxico.

Haciendo la salvedad de que restos de la anti IL-6 utilizada para bloquear la IL-6 producida en el shock tóxico, pueden modificar la determinación de la citocina, los niveles de IL-6 en suero de ratones tratados con anti IL-6 se redujeron drásticamente mientras que los de IL-10 aumentaron, y sorpresivamente, hallamos que la utilización de anti IL-6 evitó la muerte de los ratones en los que se indujo el shock tóxico con SEB.

Estos datos indicarían que la presencia de IL-6, IFN γ y TNF α sería necesaria para que ocurra la muerte en los ratones en los que se induce el shock tóxico, pues solo inhibiendo una citocina o su vía de señalización, los animales son rescatados de la muerte.

Tolerancia inducida por SEB rescata los animales del shock tóxico.

Los SAGs, tienen la propiedad de unirse a TCRV β específicamente y causar anérgia en las células que los contienen,^{215,216} quizás como mecanismo de las bacterias que los sintetizan para evadir el sistema inmune.¹

Esta propiedad de los SAGs ha sido ampliamente utilizada en el pasado para estudiar los mecanismos de inducción de tolerancia, de hecho, los eventos de delección tímica requeridos para conformar el repertorio de células T maduras, fue descrito inicialmente en modelos usando SAGs.²¹⁷

La exposición a SAGs ha sido considerada como el único modelo *in vivo* para estudiar la anérgia en células T,²¹⁵ lo que ha favorecido el desarrollo de trabajos encaminados al estudio de la tolerancia inducida por SEB en modelos animales.

En el presente trabajo, para estudiar las posibles consecuencias que tiene la exposición repetida a SEB, inyectamos ratones BALB/c con 3 μ g de SEB cada 72 horas y posteriormente inducimos el shock tóxico.

Tras la inducción evaluamos el perfil y los niveles de citocinas en suero hallando bajas concentraciones de IL-6, TNF α , IFN γ e IL-2 en comparación con los elevados niveles que se encontraron en los ratones en los que se indujo el shock tóxico.

En contraste, los niveles de IL-10 fueron mucho mayores que los del shock tóxico, mientras que los de IL-4 fueron moderadamente bajos. Esto indica que la exposición crónica a SEB genera una persistente producción de citocinas tipo Th2, principalmente IL-10,³⁶ que ha sido reportada como la principal responsable en la tolerancia inducida por SEB.^{218,219}

Aunque otras citocinas generan señalización a través de STAT3, IL-10 es la única en promover una potente respuesta antiinflamatoria vía STAT3 para antagonizar las señales proinflamatorias. La habilidad de IL-10 de inducir la síntesis de SOCS3 en monocitos esta correlacionada con su capacidad de inhibir la expresión de genes de TNF α e IL-1 inducidos por endotoxemia.^{220,221}

Puesto que IL-10 induce activación del gen de IL-10 vía STAT3,²²² interrumpir la señalización de la IL-10 inhibiendo la vía JAS/STAT con *STAT3 inhibitor VIII, 5, 15, DPP* provocó una disminución mayor en los niveles de IL-10 que cuando se utilizó AG490 que podría inhibir parcialmente la señal STAT3.

Para nuestro caso en particular, el modelo utilizado, es el primer sistema in vivo no transgénico en el que se demuestra que los ratones tolerizados con SEB sobreviven a la muerte tras inducir el shock tóxico con 25µg de SEB en combinación con 25mg de D-galactosamina, la misma combinación y dosis que causó la muerte al cien por cien de los ratones no tolerizado.

Activación de STAT1 y STAT3 en respuesta a la estimulación con SEB.

Como se puede apreciar en este trabajo, y como lo han presentado otros autores,²²³ SEB tiene la capacidad de activar la vía de señalización JAK/STAT1-STAT3.

Tanto la inoculación de 25µg de SEB para inducir el shock tóxico, como la primera estimulación con 3µg de SEB del proceso de tolerización, tuvieron la capacidad de inducir la fosforilación de las isoformas α y β tanto de STAT1 como de STAT3 y provocar su traslocación al núcleo dos horas después de la estimulación.

Tal como lo han descrito estudios anteriores, el nivel de expresión de STAT1 fosforilado resultaría de la secreción de IFN γ principalmente, y el nivel de activación de STAT1 sería directamente proporcional al nivel de IFN γ ,²²³ por lo que la inhibición de la señalización de IFN γ con AG490 provocó una disminución en la expresión de STAT1 fosforilado tanto en citoplasma como en el núcleo de los esplenocitos de los ratones que fueron tolerizados como en los que se indujo el shock tóxico.

Pretratar con anti IL-6 los ratones en los que se indujo el shock tóxico, disminuyó drásticamente los niveles de fosforilación de las isoformas α y β de STAT3, probando así que IL-6 es la principal responsable de la activación de STAT3, por lo menos en los ratones en los que se induce el shock tóxico y probablemente también en la primera estimulación con 3µg de SEB del proceso de tolerización.

En cuanto a la activación de STAT1 y STAT3 en los ratones tolerizados debemos resaltar varias cosas.

Primero. Los niveles de fosforilación de las isoformas α y β de STAT1 y 3 decrecen tanto en el citoplasma como en el núcleo tras la segunda inyección de 3 μ g de SEB.

Segundo, Los niveles de fosforilación de las isoformas α y β de STAT1 y 3 desaparecen tanto en el citoplasma como en el núcleo tras la tercera inyección de 3 μ g de SEB, sin embargo las isoformas α y β de STAT1 totales están presentes en el núcleo. Este fenómeno podría estar dado por la a activación continuada de STAT1 mediada por IFN γ lo que lleva a la expresión del gen *STAT1* incrementado así la concentración de STAT1 no fosforilado que tienen la capacidad de ir al núcleo y prolongar la expresión de genes reguladores inducidos por IFN.^{67,224,225}

Tercero, Tras la inducción del shock tóxico en los ratones tolerizados, Los niveles de fosforilación de las isoformas α y β de STAT1 y 3 se reestablecen tanto en el citoplasma como en el núcleo. Es de resaltar que en el núcleo, la fosforilación de la isoforma β de STAT1 esta marcadamente reducida en comparación con la isoforma α , mientras que en comparación con la isoforma α , la isoforma β de STAT3 está fuertemente fosforilada y podría ser el resultado de la tolerización ya que ni en los ratones en los que se indujo el shock tóxico, ni en los ratones primo estimulados con SEB se observa este fenómeno.

Adicionalmente, la isoforma β de STAT3 está implicada en la supervivencia al shock endotóxico y en la regulación negativa de la transcripción.²²⁶⁻²²⁸

Cuarto, *iSTAT3* modifica la activación de la la isoforma β de STAT3 en respuesta a SEB, no está claro si una especificidad selectiva de *iSTAT3* hacia la isoforma β de STAT3.

Linfocitos T CD4 responsables de la tolerancia inducida por SEB.

Estudios realizados^{37,39,216,229} señalan a las células T CD4 como posibles responsables del fenómeno de tolerancia inducido por SEB. Sin embargo, existen grandes

variaciones entre modelos utilizados para dicho estudio como las dosis de SEB (1-200 μ g), el origen de la propia toxina (SIGMA- Toxin Technology), periodo de tolerización (2-28 días), intervalos de tiempo entre inyecciones (1-5 días), cepa de ratones utilizados (BALB/c - C57BL/6), además en la mayoría de modelos no se usó D-galactosamina ni ningún otro sensibilizante, ni se evaluó la supervivencia de los ratones tolerizados tras la inducción del shock tóxico. Por lo que fue necesario determinar si en nuestro modelo las células T CD4 tenían esa capacidad reguladora.

Para probarlo ratones no tratados recibieron esplenocitos totales o linfocitos T CD4 purificados de ratones tolerizados o de ratones control. 24 horas después de la transferencia se indujo el shock tóxico.

El cien por cien de los ratones que recibieron tanto esplenocitos totales o linfocitos T CD4 purificados de ratones tolerizados sobrevivieron. Confirmando así que en nuestro modelo los linfocitos T CD4, objeto de nuestro estudio, tienen capacidad reguladora.

SEB modifica la expresión de TCRV β 8 y los receptores de interleucinas.

Receptor de las células T

SEB tiene la capacidad de activar linfocitos T a través de su TCR, principalmente TCRV β 8, aunque también puede activar los TCRV β 3, 7 y 17.^{5,19,230}

En nuestro trabajo se pudo observar que SEB provocó una disminución en la expresión de los TCRV β 8 6 horas después de la inducción del shock tóxico tanto en los ratones tolerizados como en los no tolerizados. Sin embargo, al evaluar de manera independiente la expresión de TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3 se pudo apreciar que la primoestimulación con SEB provocó una caída en la expresión de TCRV β 8.3 principalmente y fue independiente de la dosis de SEB, (25 μ g para shock tóxico y 3 μ g en el proceso de tolerización). No obstante, posteriores inoculaciones con SEB afectaron principalmente la expresión de los TCRV β 8.3.

Adicionalmente, SEB provocó una marcada disminución en la expresión de los TCRV β 3, 4, 6, 7, 14 y 17 tanto en el modelo de shock tóxico como en el de tolerización. (Datos no mostrados en este trabajo)

Estudios realizados señalan que la pérdida en la expresión de los TCRV β 6 y 8 está dada por una internalización de los receptores tras la activación.^{231,232} Sin embargo, no es claro el mecanismo por el cual SEB afecta de diferente manera a TCRV β 8.1-2 y TCRV β 8.3 o si la señal dada a través de cada uno de estos TCR lleva a una función diferente la célula activada.

Los receptores de Interleucinas

Los linfocitos TCRV β 8+ de los ratones en los que se indujo el shock tóxico presentaron un aumento en la expresión de IL-2R α e IFNyR β mientras que la expresión de IL-10R fue baja en comparación con los ratones tolerizados.

Un aumento en la expresión de IL-2R α también fue observado en los linfocitos TCRV β 8- tanto en los ratones en los que se indujo el shock tóxico como en los tolerizados aunque en menor proporción en estos últimos.

Está claro que la estimulación del TCR directamente lleva a la expresión de IL-2 y su receptor^{233,234} y como se mencionó anteriormente, SEB activo los TCRV β 4, 6, 7, 14 y 17 lo que indicaría la presencia de IL-2R β en los TCRV β 8-.

Inhibir con AG490 la vía JAK/STAT5 de la que depende la expresión de IL-2R β ¹⁸¹ JAK/STAT1 de la que depende la expresión IFNyR β de resultado en una reducción en la expresión de IL-2R β y de IFNyR β .

Por otra parte, el aumento en la expresión de IL-10R que se observó tanto en ratones en los que se indujo el shock tóxico como en los ratones tolerizados, disminuyó considerablemente cuando se alteró la vía JAK/STAT con AG490

Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) es una de las moléculas que modula la respuesta inmunológica por diferentes mecanismos entre los que está suprimir la producción de IFN γ ,⁹⁷ inhibir la señal de IL-2 interactuando directamente con STAT5.^{69,235}

CTLA4 fue altamente expresada en los ratones tolerizados, y aunque es inducida por *nuclear factor of activated T cells* (NFAT),²³⁶ el uso de iSTAT3 redujo su expresión, por lo que STAT3 estaría de manera indirecta la expresión de CTLA4.

Por el contrario, la inhibición de la vía JAK con AG490 favoreció la expresión de CTLA4 en los ratones en los que se indujo el shock tóxico mientras que no afectó la expresión en los ratones tolerizados. No se ha reportado la implicación de la vía JAK/STAT en la inducción o inhibición de CTLA4. Por lo que sería necesario profundizar en este aspecto.

SEB induce células TCD4+ con capacidad reguladora mediada por IL-10.

La supervivencia y los elevados niveles de IL-10 hallados en el suero de ratones a los que se les transfirieron linfocitos T CD4+ purificados a partir de ratones tolerizados, confirmo que son los linfocitos TCD4+ los principales responsables de la tolerancia inducida por SEB.

Recientemente se ha sugerido que la coexpresión de CD49b y *Lymphocyte-activation gene 3* (LAG3) en linfocitos T CD4 está asociado con la síntesis de altas cantidades de IL-10 e identifica las células T reguladoras inducidas tipo 1 (Tr1),¹⁹⁵ por lo que determinar si los linfocitos T CD4 productores IL-10 presentes en los ratones tolerizados coexpresaban CD49b y LAG3 fue necesario.

Aunque CD49b no se expresó, las células productoras de IL-10 expresaron en su membrana LAG3 y no expresaron IFN γ , mientras que la población LAG3+ IL-10-expreso moderada producción de IFN γ . Lo que identifica una célula CD4 doble productora.

Similar a lo observado *in vivo*, la introducción de AG490 durante el proceso de tolerización, llevo a la pérdida parcial en la producción de IL-10 e IFN γ en las células LAG3+ cultivadas.

Aunque no pudimos determinar la coexpresión de CD49b, LAG3 y IL-10, podemos decir que durante el proceso de tolerización se induce un tipo de célula reguladora que debe ser plenamente identificada.

SEB modifica la expresión de moléculas implicadas en la señalización vía TCR.

Una única dosis de SEB puede modificar la expresión génica de citocinas, receptores de citocinas, quimiocinas y receptores de quimiocinas¹⁶ y otras moléculas vinculadas con la señalización JAK/STAT como se ha mencionado antes. Sin embargo, la actividad de moléculas vinculadas con la señalización vía TCR han sido poco revisadas.

Aunque *Diacylglycerol kinase α* (DGK α) está implicado en la inérgia en linfocitos T,⁴³ no ha sido vinculado con SEB en este proceso, sin embargo, *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* (Fyn) y *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (LcK) han sido señalados por estar directa o indirectamente implicados en la anérgia inducida por SEB.^{41,42}

Por su parte, *Aryl hydrocarbon receptor* (AhR) ha sido vinculado con la regulación de mediada por la producción de IL-10.^{202,203}

En ratones tolerizados la expresión génica de tanto DGK α como de AhR fue mucho mas elevada que la observada en los ratones en los que se indujo el shock tóxico, por el contrario, la expresión de LcK disminuyo en los ratones tolerizados. Mientras que Fyn no se vio afectada.

AG490 tubo la capacidad de disminuir la expresión de DGK α y de LcK en los ratones en los que se indujo el shock tóxico, mientras que iSTAT provoco una marcada reducción de AhR.

Tras la inmunoprecipitación de la cromatina de linfocitos TCD4+ purificados de ratones en los que se indujo el shock tóxico o que fueron tolerizados, se observo que STAT3

fosforilado se une al promotor de AhR por lo que podría estar implicado en la activación de la transcripción.

De otro lado, se observó que STAT1 fosforilado se une al promotor de AhR por lo que podría estar implicado en la activación de la transcripción.

Con esto podemos resaltar la relevancia que tiene STAT1 y STAT3 en la expresión de moléculas reguladoras.

Conclusiones

La modulación de la vía IFN γ -JAK/STAT1 con AG490 previene la muerte de los ratones en los que se induce shock tóxico por la administración de *Staphylococcal enterotoxi B* (SEB) en combinación con D-Galactosamina.

Interleucina 6 (IL-6) es coresponsable del shock tóxico inducido por SEB

Las inyecciones periódicas de 3 μ g de SEB modulan la respuesta de las células TCD4 y conducen a un estado de tolerancia hacia el superantígeno de tal manera que los ratones no mueren tras la inducción del shock tóxico.

STAT1 participa en la expresión de *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (LcK) por lo menos durante la fase inicial del shock tóxico.

STAT3 es fuertemente activado durante el proceso de tolerización y participa en la expresión de *Aryl hydrocarbon receptor* AhR

8. Bibliografía

1. Fraser J, Arcus V, Kong P, Baker E, Proft T. Superantigens - Powerful modifiers of the immune system. *Mol Med Today*. 2000;6(3):125. doi:10.1016/S1357-4310(99)01657-3.
2. Herman a, Kappler JW, Marrack P, Pullen a M. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:745–772. doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.003525.
3. Acha-Orbea H, MacDonald HR. Superantigens of mouse mammary tumor virus. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:459–486. doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.002331.
4. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(3):422–447. doi:10.1128/CMR.00104-12.
5. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*. 1990;248(4959):1066. doi:10.1126/science.248.4959.1066-b.
6. Baker MD, Acharya KR. Superantigens: structure-function relationships. *Int J Med Microbiol*. 2004;293(7-8):529–537. doi:10.1078/1438-4221-00298.
7. Hamir AN. *Systemic Staphylococcus aureus infection in a free-ranging raccoon (Procyon lotor)*. Journal of wildlife diseases 46, 665–668 (2010). doi:10.7589/0090-3558-46.2.665.
8. Schlievert PM, Strandberg KL, Lin YC, Peterson ML, Leung DYM. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1-3):39–49. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.039.
9. Marshall CS, Cheng a. C, Markey PG, et al. Acute Post-Streptococcal Glomerulonephritis in the Northern Territory of Australia: A Review of 16 Years Data and Comparison with the Literature. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(4):703–710. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0185.
10. Saline M, Rödström KEJ, Fischer G, Orekhov VY, Karlsson BG, Lindkvist-Petersson K. The structure of superantigen complexed with TCR and MHC reveals novel insights into superantigenic T cell activation. *Nat Commun*. 2010;1(May):119. doi:10.1038/ncomms1117.
11. Kim J, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science*. 1994;266(5192):1870–1874. doi:10.1126/science.7997880.
12. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:77–104. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.77.
13. Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(3):299–306. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02203.x.

14. Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DYM, Gutierrez J a., Bohach G a., Schlievert PM. Characterization of Staphylococcus aureus enterotoxin L. *Infect Immun*. 2003;71(5):2916–2919. doi:10.1128/IAI.71.5.2916-2919.2003.
15. Saline M, Rödström KEJ, Fischer G, Orekhov VY, Karlsson BG, Lindkvist-Petersson K. The structure of superantigen complexed with TCR and MHC reveals novel insights into superantigenic T cell activation. *Nat Commun*. 2010;1:119. doi:10.1038/ncomms1117.
16. Rajagopalan G, Tilahun AY, Asmann YW, David CS. Early gene expression changes induced by the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B and its modulation by a proteasome inhibitor. *Physiol Genomics*. 2009;37(3):279–293. doi:10.1152/physiolgenomics.90385.2008.
17. Arad G, Levy R, Hillman D, Kaempfer R. Superantigen antagonist protects against lethal shock and defines a new domain for T-cell activation. *Nat Med*. 2000;6(4):414–421. doi:10.1038/74672.
18. Kappler J, Kotzin B, Herron L, et al. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science*. 1989;244(4906):811–813. doi:10.1126/science.2524876.
19. Callahan JE, Herman a, Kappler JW, Marrack P. Stimulation of B10.BR T cells with superantigenic staphylococcal toxins. *J Immunol*. 1990;144(7):2473–2479.
20. Zhang L, Rogers TJ. Assessment of the functional regions of the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Toxins (Basel)*. 2013;5(10):1859–1871. doi:10.3390/toxins5101859.
21. Li H, Llera a, Tsuchiya D, et al. Three-dimensional structure of the complex between a T cell receptor beta chain and the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Immunity*. 1998;9(6):807–816. doi:10.1016/S1074-7613(00)80646-9.
22. Angus DC (Pitt), van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840–51. doi:10.1056/NEJMra1208623.
23. Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology*. 2008;212(9-10):715–722. doi:10.1016/j.imbio.2007.09.010.
24. Zanotti S, Kumar A, Kumar A. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002;11(8):1061–1075. doi:10.1517/13543784.11.8.1061.
25. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):16–34. doi:10.1128/CMR.13.1.16-34.2000.
26. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. TOXIC SHOCK SYNDROME AND BACTERIAL SUPERANTIGENS : An Update. 2001:77–104.
27. Krakauer T, Stiles BG. Pentoxifylline inhibits superantigen-induced toxic shock and cytokine release. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(4):594–598.
28. Fremont DH, Hendrickson W a, Marrack P, Kappler J. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science*. 1996;272(5264):1001–1004. doi:10.1126/science.272.5264.1001.

29. Faulkner L, Cooper A, Fantino C, Altmann DM, Sriskandan S. The mechanism of superantigen-mediated toxic shock: not a simple Th1 cytokine storm. *J Immunol.* 2005;175(10):6870–6877. doi:175/10/6870 [pii].
30. Bozza F a, Salluh JI, Japiassu AM, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care.* 2007;11(2):R49. doi:10.1186/cc5783.
31. Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature.* 1991;349(6306):245–248. doi:10.1038/349245a0.
32. Miethke T, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1992;175(1):91–98. doi:10.1084/jem.175.1.91.
33. Assenmacher M, Löhning M, Scheffold A, Manz R a., Schmitz J, Radbruch A. Sequential production of IL-2, IFN- γ and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1998;28(5):1534–1543. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1534::AID-IMMU1534>3.0.CO;2-R.
34. Florentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, Garra AO. IL-10 INHIBITS CYTOKINE PRODUCTION BY ACTIVATED MACROPHAGES ' IL-10 inhibits the ability of macrophage but not B cell APC to stimulate cytokine synthesis by Th1 T cell clones . In this study we have examined the. *J Immunol.* 1991;147(11):3815–3822.
35. Plaza R, Rodriguez-Sanchez JL, Juarez C. Staphylococcal enterotoxin B in vivo modulates both gamma interferon receptor expression and ligand-induced activation of signal transducer and activator of transcription 1 in T cells. *Infect Immun.* 2007;75(1):306–313. doi:10.1128/IAI.01220-06.
36. Florquin S, Amraoui Z, Goldman M. Persistent production of TH2-type cytokines and polyclonal B cell activation after chronic administration of staphylococcal enterotoxin B in mice. *J Autoimmun.* 1996;9(5):609–615. doi:10.1006/jaut.1996.0080.
37. Feunou P, Poulin L, Habran C, Le Moine A, Goldman M, Braun MY. CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells act respectively as inducer and effector T suppressor cells in superantigen-induced tolerance. *J Immunol.* 2003;171(7):3475–3484. doi:10.4049/jimmunol.171.7.3475.
38. Sundstedt A, Höiden I, Rosendahl A, Kalland T, van Rooijen N, Dohlsten M. Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J Immunol.* 1997;158(1):180–186.
39. Noël C, Florquin S, Goldman M, Braun MY. Chronic exposure to superantigen induces regulatory CD4(+) T cells with IL-10-mediated suppressive activity. *Int Immunol.* 2001;13(4):431–439.
40. Jie Y, Pan Z, Chen Y, et al. Non-specific tolerance induced by staphylococcal enterotoxin B in treating high risk corneal transplantation in rats. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(3):364–368. doi:10.1136/bjo.2004.048959.
41. Watson ARO, Janik DK, Lee WT. Superantigen-induced CD4 memory T cell anergy. I. Staphylococcal enterotoxin B induces Fyn-mediated negative signaling. *Cell Immunol.* 2012;276(1-2):16–25. doi:10.1016/j.cellimm.2012.02.003.

42. Watson ARO, Lee WT. Defective T cell receptor-mediated signal transduction in memory CD4 T lymphocytes exposed to superantigen or anti-T cell receptor antibodies. *Cell Immunol.* 2006;242(2):80–90.
43. Olenchok B a, Guo R, Carpenter JH, et al. Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy. *Nat Immunol.* 2006;7(11):1174–1181. doi:10.1038/ni1400.
44. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(11):900–911. doi:10.1038/nri1226.
45. Remy I, Wilson I a, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science.* 1999;283(5404):990–993. doi:10.1126/science.283.5404.990.
46. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 1994;264(5164):1415–1421. doi:10.1126/science.8197455.
47. O’Sullivan L a., Liongue C, Lewis RS, Stephenson SEM, Ward AC. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol.* 2007;44(10):2497–2506. doi:10.1016/j.molimm.2006.11.025.
48. Ross J a., Nagy ZS, Cheng H, Stepkowski SM, Kirken R a. Regulation of T cell homeostasis by JAKs and STATs. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55(4):231–245. doi:10.1007/s00005-007-0030-x.
49. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VET, Silvennoinen O, O’Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol.* 2004;5(12):253. doi:10.1186/gb-2004-5-12-253.
50. Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst.* 2006;2(11):536–550. doi:10.1039/b606246f.
51. Miklossy G, Hilliard TS, Turkson J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(8):611–29. doi:10.1038/nrd4088.
52. Hevehan DL, Miller WM, Papoutsakis ET. Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation. *Blood.* 2002;99(5):1627–1637. doi:10.1182/blood.V99.5.1627.
53. Mitchell TJ, John S. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology.* 2005;114(3):301–312. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02091.x.
54. Chakraborty a, Tweardy DJ. Granulocyte colony-stimulating factor activates a 72-kDa isoform of STAT3 in human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1998;64(5):675–680.
55. Garcia R, Bowman TL, Niu G, et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene.* 2001;20(20):2499–2513. doi:10.1038/sj.onc.1204349.
56. Wong M, Fish EN. RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells. *J Biol Chem.* 1998;273(1):309–314. doi:10.1074/jbc.273.1.309.

57. Lim CP, Cao X. Regulation of Stat3 Activation by MEK Kinase 1. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21004–21011. doi:10.1074/jbc.M007592200.
58. Pallandre J-R, Brillard E, Créhange G, et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol.* 2007;179(11):7593–7604. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7593.
59. Gamero AM, Lerner AC. Signaling via the T cell antigen receptor induces phosphorylation of Stat1 on Serine 727. *J Biol Chem.* 2000;275(22):16574–16578. doi:10.1074/jbc.M910149199.
60. Delgoffe GM, Murray PJ, Vignali DAA. Interpreting mixed signals: The cell's cytokine conundrum. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):632–638. doi:10.1016/j.coi.2011.07.013.
61. Morinobu A, Gadina M, Strober W, et al. STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12281–12286. doi:10.1073/pnas.182618999.
62. Maiti NR, Sharma P, Harbor PC, Haque SJ. Serine phosphorylation of Stat6 negatively controls its DNA-binding function. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25(9):553–563. doi:10.1089/jir.2005.25.553.
63. Gupta S, Jiang M, Pernis AB. IFN-alpha activates Stat6 and leads to the formation of Stat2:Stat6 complexes in B cells. *J Immunol.* 1999;163(7):3834–3841. doi:ji_v163n7p3834 [pii].
64. Delgoffe GM, Vignali D a a. STAT heterodimers in immunity: A mixed message or a unique signal? *Jak-Stat.* 2013;2(1):e23060. doi:10.4161/jkst.23060.
65. Novak U, Mui A, Miyajima A, Paradiso L. Formation of STAT5-containing DNA binding complexes in response to colony-stimulating factor-1 and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem.* 1996;271(31):18350–18354. doi:10.1074/jbc.271.31.18350.
66. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):598–604. doi:10.1016/j.coi.2011.08.003.
67. Yang J, Stark GR. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res.* 2008;18(4):443–451. doi:10.1038/cr.2008.41.
68. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NF- κ B. *Genes Dev.* 2007;21(11):1396–1408. doi:10.1101/gad.1553707.
69. Srahna M, Van Grunsven L a., Remacle JE, Vandenberghe P. CTLA-4 interacts with STAT5 and inhibits STAT5-mediated transcription. *Immunology.* 2006;117(3):396–401. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02313.x.
70. Vallania F, Schiavone D, Dewilde S, et al. Genome-wide discovery of functional transcription factor binding sites by comparative genomics: the case of Stat3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(13):5117–5122. doi:10.1073/pnas.0900473106.

71. Hutchins AP, Diez D, Takahashi Y, et al. Distinct transcriptional regulatory modules underlie STAT3's cell type-independent and cell type-specific functions. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(4):2155–2170. doi:10.1093/nar/gks1300.
72. Hutchins AP, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: Recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics.* 2013;12(6):489–498. doi:10.1093/bfgp/elt028.
73. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(5):375–386. doi:10.1038/nri1604.
74. Begitt A, Droscher M, Meyer T, et al. STAT1-cooperative DNA binding distinguishes type 1 from type 2 interferon signaling. *Nat Immunol.* 2014;15(2):168–76. doi:10.1038/ni.2794.
75. Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, et al. DNA binding specificity of different STAT proteins: Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6675–6688. doi:10.1074/jbc.M001748200.
76. Seidel HM, Milocco LH, Lamb P, Darnell JE, Stein RB, Rosen J. Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(7):3041–3045. doi:10.1073/pnas.92.7.3041.
77. Shuai K. The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;71(3-4):405–422. doi:10.1016/S0079-6107(98)00051-0.
78. Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):593–605. doi:10.1038/nri1667.
79. Liu B, Liao J, Rao X, et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(18):10626–10631. doi:10.1073/pnas.95.18.10626.
80. Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* 2001;15(23):3088–3103. doi:10.1101/gad.944801.
81. Dalpke A, Heeg K, Bartz H, Baetz A. Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology.* 2008;213(3-4):225–235. doi:10.1016/j.imbio.2007.10.008.
82. Croker B a., Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(4):414–422. doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.010.
83. Yu Q, Park J-H, Doan LL, Erman B, Feigenbaum L, Singer A. Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. *J Exp Med.* 2006;203(1):165–175. doi:10.1084/jem.20051836.
84. Dickensheets H, Vazquez N, Sheikh F, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling. *Genes Immun.* 2007;8(1):21–27. doi:10.1038/sj.gene.6364352.

85. Chong MMW, Cornish AL, Darwiche R, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8+ T cell differentiation. *Immunity*. 2003;18(4):475–487. doi:10.1016/S1074-7613(03)00078-5.
86. Kasmi KC El, Kasmi KC El, Holst J, et al. General Nature of the STAT3-Activated Anti-In ammatory Response 1. *J Immunol*. 2006;3(3).
87. Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol*. 2003;4(6):551–556. doi:10.1038/ni938.
88. Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, et al. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes to Cells*. 1999;4(6):339–351. doi:10.1046/j.1365-2443.1999.00263.x.
89. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*. 2001;19(5):378–387. doi:10.1634/stemcells.19-5-378.
90. Piessevaux J, Lavens D, Peelman F, Tavernier J. The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(5-6):371–381. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.08.006.
91. Bjørbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*. 1998;1(4):619–625. doi:10.1016/S1097-2765(00)80062-3.
92. Adams TE, Hansen JA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N. Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. *J Biol Chem*. 1998;273(3):1285–1287. doi:10.1074/jbc.273.3.1285.
93. Soriano SF, Hernanz-Falcón P, Rodríguez-Frade JM, et al. Functional inactivation of CXC chemokine receptor 4-mediated responses through SOCS3 up-regulation. *J Exp Med*. 2002;196(3):311–321. doi:10.1084/jem.20012041.
94. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem*. 2000;275(21):15985–15991. doi:10.1074/jbc.275.21.15985.
95. Seki Y, Inoue H, Nagata N, et al. SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat Med*. 2003;9(8):1047–1054. doi:10.1038/nm896.
96. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, et al. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest*. 2001;108(12):1781–1788. doi:10.1172/JCI200113568.
97. Fang M, Dai H, Yu G, Gong F. Gene delivery of SOCS3 protects mice from lethal endotoxic shock. *Cell Mol Immunol*. 2005;2(5):373–377.
98. Fujimoto M, Tsutsui H, Yumikura-Futatsugi S, et al. A regulatory role for suppressor of cytokine signaling-1 in T(h) polarization in vivo. *Int Immunol*. 2002;14(11):1343–1350.

99. Egwuagu CE, Yu C-R, Zhang M, Mahdi RM, Kim SJ, Gery I. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol.* 2002;168(7):3181–3187. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3181.
100. Woldman I, Varinou L, Ramsauer K, Rapp B, Decker T. The Stat1 Binding Motif of the Interferon- γ Receptor Is Sufficient to Mediate Stat5 Activation and Its Repression by SOCS3. *J Biol Chem.* 2001;276(49):45722–45728. doi:10.1074/jbc.M105320200.
101. Song MM, Shuai K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem.* 1998;273(52):35056–35062. doi:10.1074/jbc.273.52.35056.
102. Lang R, Pauleau A-L, Parganas E, et al. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol.* 2003;4(6):546–550. doi:10.1038/ni932.
103. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, et al. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature.* 2007;448(7157):1058–1062. doi:10.1038/nature06096.
104. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145–173. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045.
105. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin M a, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348–2357. doi:10.1111/j.1442-9071.2011.02672.x.
106. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell.* 2006;126(6):1121–1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035.
107. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity.* 2006;24(6):677–688. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002.
108. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485–517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
109. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W EA. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3+ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9+IL-10+Foxp3– effector T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1347–1355. doi:10.1038/ni.1677.Interleukin.
110. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1341–1346. doi:10.1038/ni.1659.
111. Jäger A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol.* 2010;72(3):173–184. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x.

112. Bluestone J a, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(3):253–257. doi:10.1038/nri1032.
113. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775–787. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009.
114. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol.* 2009;39(8):2076–2082. doi:10.1002/eji.200939722.
115. Boyton RJ, Altmann DM. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol.* 2002;23(11):526–529. doi:10.1016/S1471-4906(02)02319-0.
116. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity.* 2009;30(5):646–655. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001.
117. O’Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science.* 2010;327(5969):1098–1102. doi:10.1126/science.1178334.
118. Spellberg B, Edwards JE. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2001;32(1):76–102. doi:10.1086/317537.
119. Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia A. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol.* 1999;29(12):4092–4101. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<4092::AID-IMMU4092>3.0.CO;2-A.
120. Bird JJ, Brown DR, Mullen a C, et al. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity.* 1998;9(2):229–237. doi:10.1016/S1074-7613(00)80605-6.
121. Pot C, Apetoh L, Awasthi A, Kuchroo VK. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of TH17 cells by IL-27. *Semin Immunol.* 2011;23(6):438–445. doi:10.1016/j.smim.2011.08.003.
122. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:297–322. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.297.
123. Chang HC, Han L, Goswami R, et al. Impaired development of human Th1 cells in patients with deficient expression of STAT4. *Blood.* 2009;113(23):5887–5890. doi:10.1182/blood-2008-09-179820.
124. Nishikomori R, Usui T, Wu C-Y, Morinobu A, O’Shea JJ, Strober W. Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R beta 2 chain expression and signaling. *J Immunol.* 2002;169(8):4388–4398. doi:10.4049/jimmunol.169.8.4388.
125. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2002;3(6):549–557. doi:10.1038/ni794.
126. Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are TH1 and TH2 effector cells made? *Curr Opin Immunol.* 2009;21(2):153–160. doi:10.1016/j.coi.2009.03.010.

127. Naoe Y, Setoguchi R, Akiyama K, et al. Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbf beta binding to the Il4 silencer. *J Exp Med*. 2007;204(8):1749–1755. doi:10.1084/jem.20062456.
128. Hwang ES, Hong J-H, Glimcher LH. IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J Exp Med*. 2005;202(9):1289–1300. doi:10.1084/jem.20051044.
129. Yang Y, Xu J, Niu Y, Bromberg JS, Ding Y. T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17. *J Immunol*. 2008;181(12):8700–8710. doi:10.4049/jimmunol.181.12.8700.
130. Yagi R, Suzuki W, Seki N, et al. The IL-4 production capability of different strains of naive CD4(+) T cells controls the direction of the T(h) cell response. *Int Immunol*. 2002;14(1):1–11. doi:10.1093/intimm/14.1.1.
131. Noben-Trauth N, Hu-Li J, Paul WE. IL-4 secreted from individual naive CD4+ T cells acts in an autocrine manner to induce Th2 differentiation. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1428–1433. doi:10.1002/1521-4141(200205)32:5<1428::AID-IMMU1428>3.0.CO;2-0.
132. Kemeny D. The role of the T follicular helper cells in allergic disease. *Cell Mol Immunol*. 2012;9(5):386–389. doi:10.1038/cmi.2012.31.
133. Till S, Walker S, Dickason R, et al. IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Immunol*. 1997;110(1):114–121. doi:10.1046/j.1365-2249.1997.4941392.x.
134. Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 1999;163(7):3771–3777. doi:10.1046/j.1365-2249.1997.4941392.x.
135. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):838–848. doi:10.1038/nri2870.
136. Children T, Alto P, Children T. INDUCTION OF HUMAN IgE SYNTHESIS REQUIRES INTERLEUKIN 4 AND T / B CELL INTERACTIONS INVOLVING THE T CELL RECEPTOR / CD3 COMPLEX AND MHC CLASS II ANTIGENS The synthesis of IgE is regulated by isotype-specific mechanisms . Powerful poly- clonal B cell activ. 1989;169(April).
137. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23–35. doi:10.1038/nri978.
138. Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: From discovery to therapy. *Int Immunol*. 2009;21(12):1303–1309. doi:10.1093/intimm/dxp102.
139. Blom L, Poulsen BC, Jensen BM, Hansen A, Poulsen LK. IL-33 induces IL-9 production in human CD4+ T cells and basophils. *PLoS One*. 2011;6(7):1–11. doi:10.1371/journal.pone.0021695.

140. Sismanopoulos N, Delivanis D a., Alysandratos KD, et al. IL-9 induces VEGF secretion from human mast cells and IL-9/IL-9 receptor genes are overexpressed in atopic dermatitis. *PLoS One*. 2012;7(3):5–9. doi:10.1371/journal.pone.0033271.
141. Parker JC, Thavagnanam S, Skibinski G, et al. Chronic IL9 and IL-13 Exposure Leads to an Altered Differentiation of Ciliated Cells in a Well-Differentiated Paediatric Bronchial Epithelial Cell Model. *PLoS One*. 2013;8(5). doi:10.1371/journal.pone.0061023.
142. Temann UA, Laouar Y, Eynon EE, Homer R, Flavell R a. IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *Int Immunol*. 2007;19(1):1–10. doi:10.1093/intimm/dxl117.
143. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992;326(5):298–304. doi:10.1056/NEJM199201303260504.
144. Hakemi M, Eskandari N, Yazdani R, Farahani R, Sherkat R. Cytokines (interleukin-9, IL-17, IL-22, IL-25 and IL-33) and asthma. *Adv Biomed Res*. 2014;3(1):127. doi:10.4103/2277-9175.133249.
145. Seder R a, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*. 1992;176(4):1091–1098. doi:10.1084/jem.176.4.1091.
146. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*. 1993;362(6417):245–248. doi:10.1038/362245a0.
147. Min B, Prout M, Hu-Li J, et al. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med*. 2004;200(4):507–517. doi:10.1084/jem.20040590.
148. Perrigoue JG, Saenz SA, Siracusa MC, et al. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol*. 2009;10(7):697–705. doi:10.1038/ni.1740.
149. Gregory GD, Raju SS, Winandy S, Brown M a. Mast cell IL-4 expression is regulated by Ikaros and influences encephalitogenic Th1 responses in EAE. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1327–1336. doi:10.1172/JCI27227.
150. Ierna MX, Scales HE, Saunders KL, Lawrence CE. Mast cell production of IL-4 and TNF may be required for protective and pathological responses in gastrointestinal helminth infection. *Mucosal Immunol*. 2008;1(2):147–155. doi:10.1038/mi.2007.16.
151. Yoshimoto T, Paul WE. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med*. 1994;179(4):1285–1295. doi:10.1084/jem.179.4.1285.
152. Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*. 2003;19(5):739–748. doi:10.1016/S1074-7613(03)00292-9.

153. Goenka S, Kaplan MH. Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol Res.* 2011;50(1):87–96. doi:10.1007/s12026-011-8205-2.
154. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity.* 1996;4(3):313–319. doi:10.1016/S1074-7613(00)80439-2.
155. Takeda K, Tanaka T, Shi W, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature.* 1996;380(6575):627–630. doi:10.1038/380627a0.
156. Asnagli H, Afkarian M, Murphy KM. Cutting edge: Identification of an alternative GATA-3 promoter directing tissue-specific gene expression in mouse and human. *J Immunol.* 2002;168(9):4268–4271. doi:10.4049/jimmunol.168.9.4268.
157. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity.* 1998;9(5):745–755. doi:10.1016/S1074-7613(00)80671-8.
158. Chang S, Aune TM. Dynamic changes in histone-methylation “marks” across the locus encoding interferon-gamma during the differentiation of T helper type 2 cells. *Nat Immunol.* 2007;8(7):723–731. doi:10.1038/ni1473.
159. Ivanov II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol.* 2007;19(6):409–417. doi:10.1016/j.smim.2007.10.011.
160. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201(2):233–240. doi:10.1084/jem.20041257.
161. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007;8(9):967–974. doi:10.1038/ni1488.
162. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 2007;448(7152):480–483. doi:10.1038/nature05969.
163. Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunol Rev.* 2004;202:84–95. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00201.x.
164. Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(9):688–698. doi:10.1038/nri1688.
165. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003;421(6924):744–748. doi:10.1038/nature01355.
166. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, et al. Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity.* 2007;26(3):371–381. doi:10.1016/j.immuni.2007.02.009.

167. Levings MK, Allan S, d’Hennezel E, Piccirillo C a. Functional Dynamics of Naturally Occurring Regulatory T Cells in Health and Autoimmunity. *Adv Immunol.* 2006;92(06):119–155. doi:10.1016/S0065-2776(06)92003-3.
168. Ramsdell F, Fowlkes BJ. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science.* 1990;248(4961):1342–1348. doi:10.1126/science.1972593.
169. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531–562. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122.
170. Joosten S a, van Meijgaarden KE, Savage ND, et al. Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(19):8029–8034. doi:10.1073/pnas.0702257104.
171. Taylor AL, Cross EL a, Llewelyn MJ. Induction of contact-dependent CD8 + regulatory T cells through stimulation with staphylococcal and streptococcal superantigens. *Immunology.* 2012;135(2):158–167. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03529.x.
172. Monteiro M, Almeida CF, Caridade M, et al. Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta. *J Immunol.* 2010;185(4):2157–2163. doi:10.4049/jimmunol.1000359.
173. Sag D, Krause P, Hedrick CC, Kronenberg M, Wingender G. IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *J Clin Invest.* 2014;124(9):1–16. doi:10.1172/JCI72308DS1.
174. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.* 2003;171(12):6323–6327. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6323.
175. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30(1):531–564. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
176. Mahmud S a, Manlove LS, Farrar M a. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *Jak-Stat.* 2013;2(1):e23154. doi:10.4161/jkst.23154.
177. Lee HM, Bautista JL, Scott-Browne J, Mohan JF, Hsieh CS. A Broad Range of Self-Reactivity Drives Thymic Regulatory T Cell Selection to Limit Responses to Self. *Immunity.* 2012;37(3):475–486. doi:10.1016/j.immuni.2012.07.009.
178. Moran AE, Holzapfel KL, Xing Y, et al. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med.* 2011;208(6):1279–1289. doi:10.1084/jem.20110308.
179. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12(4):431–440. doi:10.1016/S1074-7613(00)80195-8.

180. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol.* 2005;6(2):152–162. doi:10.1038/ni1160.
181. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2007;178(1):280–290. doi:178/1/280 [pii].
182. Soper DM, Kasprovicz DJ, Ziegler SF. IL-2R?? links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol.* 2007;37(7):1817–1826. doi:10.1002/eji.200737101.
183. Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, et al. Nonredundant roles for Stat5a / b in directly regulating Foxp3 Nonredundant roles for Stat5a / b in directly regulating Foxp3. *Blood.* 2013;109(10):4368–4375. doi:10.1182/blood-2006-11-055756.
184. Vignali D a, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523–532. doi:10.1038/nri2343.
185. Lio C-WJ, Hsieh C-S. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity.* 2008;28(1):100–111. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.021.
186. O’Shea JJ, Lahesmaa R, Vahedi G, Laurence A, Kanno Y. Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):239–250. doi:10.1038/nri2958.
187. Takaki H, Ichiyama K, Koga K, et al. STAT6 inhibits TGF-β1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J Biol Chem.* 2008;283(22):14955–14962. doi:10.1074/jbc.M801123200.
188. O’Malley JT, Sehra S, Thieu VT, et al. Signal transducer and activator of transcription 4 limits the development of adaptive regulatory T cells. *Immunology.* 2009;127(4):587–595. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03037.x.
189. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science.* 2009;326(5955):986–991. doi:10.1126/science.1172702.
190. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001;182:207–214. doi:1820117 [pii].
191. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings M. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001;(II):68–79. doi:10.1034/j.1600-065X.2001.1820105.x.
192. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2004;172(10):5986–5993.
193. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006;212:28–50. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x.

194. Groux H, O'Garra a, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737–742. doi:10.1016/S0887-7963(98)80079-5.
195. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med*. 2013;19(6):739–46. doi:10.1038/nm.3179.
196. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*. 2004;199(11):1567–1575. doi:10.1084/jem.20032058.
197. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol*. 2012;3(FEB):1–12. doi:10.3389/fimmu.2012.00030.
198. McKinstry KK, Strutt TM, Buck A, et al. IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge. *J Immunol*. 2009;182(12):7353–7363. doi:10.4049/jimmunol.0900657.
199. Lazarevic V, Chen X, Shim J-H, et al. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat Immunol*. 2011;12(1):96–104. doi:10.1038/ni.1969.
200. Wang H, Meng R, Li Z, et al. IL-27 induces the differentiation of Tr1-like cells from human naive CD4+ T cells via the phosphorylation of STAT1 and STAT3. *Immunol Lett*. 2011;136(1):21–28. doi:10.1016/j.imlet.2010.11.007.
201. Yang Y, Ochando J, Yopp A, Bromberg JS, Ding Y. IL-6 plays a unique role in initiating c-Maf expression during early stage of CD4 T cell activation. *J Immunol*. 2005;174(5):2720–2729. doi:174/5/2720 [pii].
202. Pot C, Jin H, Awasthi A, et al. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J Immunol*. 2009;183(2):797–801. doi:10.4049/jimmunol.0901233.
203. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol*. 2010;11(9):854–861. doi:10.1038/ni.1912.
204. Rajagopalan G, Smart MK, Patel R, David CS. Acute systemic immune activation following conjunctival exposure to staphylococcal enterotoxin B. *Infect Immun*. 2006;74(10):6016–6019. doi:10.1128/IAI.00671-06.
205. Sperber K, Silverstein L, Brusco C, Yoon C, Mullin GE, Mayer L. Cytokine secretion induced by superantigens in peripheral blood mononuclear cells, lamina propria lymphocytes, and intraepithelial lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995;2(4):473–477.
206. Car BD, Eng VM, Schnyder B, et al. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J Exp Med*. 1994;179(5):1437–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191498&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.

207. Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*. 2002;39(9):531–536. doi:10.1016/S0161-5890(02)00210-9.
208. Diao H, Kohanawa M. Endogenous interleukin-6 plays a crucial protective role in streptococcal toxic shock syndrome via suppression of tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun*. 2005;73(6):3745–3748. doi:10.1128/IAI.73.6.3745-3748.2005.
209. Atsumi T, Sato M, Kamimura D, et al. IFN- γ expression in CD8+ T cells regulated by IL-6 signal is involved in superantigen-mediated CD4+ T cell death. *Int Immunol*. 2009;21(1):73–80. doi:10.1093/intimm/dxn125.
210. Levitzki A, Mishani E. Tyrphostins and other tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:93–109. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142657.
211. Xiong H, Zhang Z-G, Tian X-Q, et al. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells. *Neoplasia*. 2008;10(3):287–297. doi:PMC2259457.
212. Kirken R a, Erwin R a, Taub D, et al. Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *J Leukoc Biol*. 1999;65(6):891–899.
213. Peña G, Cai B, Deitch EA, Ulloa L. JAK2 inhibition prevents innate immune responses and rescues animals from sepsis. *J Mol Med*. 2010;88(8):851–859. doi:10.1007/s00109-010-0628-z.
214. Lin JX, Leonard WJ. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene*. 2000;19(21):2566–2576. doi:10.1038/sj.onc.1203523.
215. Rellahan BL, Jones L a, Kruisbeek a M, Fry a M, Matis L a. In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med*. 1990;172(4):1091–1100. doi:10.1084/jem.172.4.1091.
216. Ziegler C, Goldmann O, Hobeika E, Geffers R, Peters G, Medina E. The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: From antigen-reactivity to in vivo anergy. *EMBO Mol Med*. 2011;3(11):652–666. doi:10.1002/emmm.201100173.
217. Pircher H, Mak TW, Lang R, et al. T cell tolerance to Mlsa encoded antigens in T cell receptor V beta 8.1 chain transgenic mice. *EMBO J*. 1989;8(3):719–727. doi:2524380.
218. Florquin S, Amraoui Z, Abramowicz D, Goldman M. Systemic release and protective role of IL-10 in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J Immunol*. 1994;153(6):2618–2623. doi:10.1084/jem.180.3.1153.
219. Bean a. GD, Freiberg R a., Andrade S, Menon S, Zlotnik a. Interleukin 10 protects mice against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. *Infect Immun*. 1993;61(11):4937–4939.
220. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008;226(1):205–218. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x.

221. Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19(6):563–573. doi:10.1089/107999099313695.
222. Staples KJ, Smallie T, Williams LM, et al. IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol.* 2007;178(8):4779–4785. doi:178/8/4779 [pii].
223. Cimeno R, Codony-servat J, Rodriguez-sanchez JL. Stat1 Implication. 1996.
224. Brown S, Zeidler MP. Unphosphorylated STATs go nuclear. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18(5):455–460. doi:10.1016/j.gde.2008.09.002.
225. Cheon H, Stark GR. Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(23):9373–9378. doi:10.1073/pnas.0903487106.
226. Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, et al. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol.* 2004;5(4):401–409. doi:10.1038/ni1052.
227. Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, et al. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem.* 1996;271(22):13221–13227. doi:10.1074/jbc.271.22.13221.
228. Yoo JY, Huso DL, Nathans D, Desiderio S. Specific ablation of Stat3 β distorts the pattern of stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock. *Cell.* 2002;108(3):331–344. doi:10.1016/S0092-8674(02)00636-0.
229. Schartner JM, Singh a. M, Dahlberg PE, Nettenstrom L, Seroogy CM. Recurrent superantigen exposure in vivo leads to highly suppressive CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells with anergic and suppressive genetic signatures. *Clin Exp Immunol.* 2009;155(2):348–356. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03827.x.
230. Papageorgiou a C, Tranter HS, Acharya KR. Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors. *J Mol Biol.* 1998;277(1):61–79. doi:10.1006/jmbi.1997.1577.
231. Tii DYML. Bacterial Superantigens Induce Vp-Specific Receptor Internalization T Cell. 1996;33(10):891–900.
232. Niedergang F, Hemar a., Hewitt CR a, Owen MJ, Dautry-Varsat a., Alcover a. The Staphylococcus aureus enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J Biol Chem.* 1995;270(21):12839–12845. doi:10.1074/jbc.270.21.12839.
233. Chueh FY, Yu CL. Engagement of T-cell antigen receptor and CD4/CD8 co-receptors induces prolonged STAT activation through autocrine/paracrine stimulation in human primary T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;426(2):242–246. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.074.

234. Hur EM, Son M, Lee O-H, et al. LIME, a novel transmembrane adaptor protein, associates with p56lck and mediates T cell activation. *J Exp Med.* 2003;198(10):1463–1473. doi:10.1084/jem.20030232.
235. Carreno BM, Bennett F, Chau T a, et al. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol.* 2000;165(3):1352–1356. doi:10.4049/jimmunol.165.3.1352.
236. Gibson HM, Hedgcock CJ, Aufiero BM, et al. Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J Immunol.* 2007;179(6):3831–3840. doi:179/6/3831 [pii].