



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Panek, Cecilia Analía

Modulación del receptor para fractalquina en monocitos



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Panek, C. (2024). *Modulación del receptor para fractalquina en Monocitos. (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4493>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

- ä ~ ^Ä } Äx ! • [Ä Ä [Ä ^ Ä ^ • &ä ää ää] • ä ä ä ä ä Ä ^ Ä ~ ^ Ä ä ~ } ä Ä ^ Ä ä Ä ä Ä | ^ } &ä ä Ä ^ Ä ä | } ^ } Ä
- ä } ä ä ä ä ä Ä



Modulación del receptor para fractalquina en Monocitos

Lic. Cecilia Analia Panek

Director: Dra. Marina Sandra Palermo

Codirector: Dr. Alejandro Andrés Castello

2015

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes

en Ciencia y Tecnología

Lugar de Realización: Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET

Academia Nacional de Medicina

Agradecimientos

V

#

u

#

o u

)

)

S

u

u

h 8

U 8 O h o 8

h 8 8

t 8

o 7

K 8

u

k 8 u

8

O U V

8

° 8
° u8@7 #
° # ° 8 ° U *real time*
° O h ° U
° V ° V ° U
° # ° M ° 8
° ° @ ° h
° O
° U ° U # ° -
°
° 8k° #@o

Índice

Abreviaturas.....13

Objetivos.....16

Introducción.....18

1. El Sistema Inmune Innato.....19

U
U

V
-
"
h

2. Los Monocitos.....23

o U

3. Las Células Dendríticas.25

) #
O) #
O) #
O) #) #
O) #) #
O) ##
O) #
O) #
O) #
U
h) #
h) #
\\) # *in vitro*

4. Los Macrófagos.....31

U °

k U° #
 ° U° #
 7
 h
) U° #
 \ U° # *in vitro*.

5. Las Citoquinas.....37

- @
 † @V
 O @
 † @
 @ @
 † @ @

6. Las Quimioquinas y sus Receptores.....41

O #CE#O #CE#k
) *CX3CR1*
 h #CE#k
 U
 h #CE#k
 -
 k
 °
 @ =Φ
 \

7. El Síndrome Urémico Hemolítico.....49

oy =
 u

Materiales y métodos.....53

1. Reactivos Generales.....54

2. Anticuerpos.....54

3. Soluciones.....55

u h" o
 o u
 o

Resultados.....64

Capítulo I.....65

1. Análisis de la expresión del receptor para fractalquina durante la diferenciación monocítica.....66

..... U
..... U)# U° #
- #CE#k)# U° #
..... #CE#k)#
U)#
- #CE#k)#
h)#
- #CE#k)#
U)#
) U)#
..... U U° #
..... U° #
..... U° # U · U
..... U° # U · U
- #CE#k U° # U · U
- #CE#k kV° U
o
.....

Capítulo II.....90

2. Señales intracelulares y mecanismos involucrados en la modulación del receptor CX₃CR1 por citoquinas.....91

- #CE#k U
- #CE#k U
@V
- #CE#k
- #CE#k
#CE#k
7 α° u o U h@M

.....	#CE#k
.....	
.....	#CE#k
.....	kV° U
.....	#
.....	kV°
.....	#CE#k
.....	U
.....	®
.....	kV°
.....	#CE#k
Capítulo III.....	107
3. Determinación de polimorfismos del gen CX₃CR1 en la población pediátrica argentina y pacientes con SUH.....	108
.....	#
.....	\
.....
.....
.....	#CE#k
.....
.....	#CE#k
.....
.....	#CE#k
Discusión y Conclusiones.....	115
Referencias.....	132

Abreviaturas

Ags: °
APC: #
Células NK: # *Natural Killer*
CX₃CL1: j
CX₃CR1: k
DC: #)
DNA:)
EHEC: *Escherichia coli*
ERK1/2: j
FcγRI: k @ 7 @8
FcγRIII: k @ 7 @8
FcεRII: k @ 7 @-
FITC: @ 7
FSC: 7 0 0
GAPDH: 8
GM-CSF: 7
HIV: † @ =
HIF-1α/-2α:
HLA-DR: °
ICAM: U
iDC: #
IgG/E: @ 8 -
IFM: @
IFN-γ: @
IL-1β/-4/-10/-13/-23: @
IRF: 7 @V
JNK: K V
KLF4: M
LFA-1: °
LPS: O
mAb:
MAPK: h
MAC: U
M-CSF:
mDC: #

MIP-1 α /-1 β : h
MHC-I/II: # U = @@
Mo: U
NF- κ B: 7
Ns: V
OR: \
PAMPs: h
PBMC: #
PBS: o
PCy5: 7
PE: 7
PI: @ h
PPAR γ / δ :
PRRs: k
RANTES: k u
RFLP:
RNA: k
RT-PCR:
SEM: -
SFB:
SSC: o
Stx: u o
SNP: h
SOCS1/3: h
STEC: *Escherichia coli* o
STAT1/3/6: u
SUH: o y =
TCR: k u
TGF- β :
Th1/2/17: u helper
TLR: k u
TNF- α : 7
UFC-GM: y
UFC-eo/baso: y

Objetivos

- **objetivo general**

#CE#k U h #CE#k

#

#CE#k U

7

#CE#k " V

#CE#k

oy= o

h **objetivos particulares**

Á- #CE#k U U°#)#

Á- #CE#k U°#

Á- #CE#k)#

Á° #CE#k U

Ⓢ Ⓢ Ⓢ Ⓢ V γ

Á° #CE#k

#CE#O

Á°

#CE#k

--# ou-# oy=

Introducción

1. El Sistema Inmune Innato.

1.1 Características generales.

El sistema inmune innato es el primer nivel de defensa del organismo contra patógenos y células dañadas. Se caracteriza por ser rápido, inespecífico y no adaptativo. Incluye componentes como células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y células dendríticas), proteínas de fase aguda, anticuerpos naturales y células NK. Este sistema actúa de manera inmediata y no requiere de una exposición previa al antígeno para desencadenar una respuesta.

Las células del sistema inmune innato reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones de daño (DAMP) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Este reconocimiento desencadena una cascada de señales que resulta en la activación de estas células y la liberación de mediadores inflamatorios, como citoquinas y quimioquinas, que atraen más células inmunes al sitio de infección y promueven la inflamación.

La respuesta del sistema inmune innato es crucial para la eliminación de patógenos y la iniciación de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, una activación excesiva o prolongada puede conducir a enfermedades autoinmunes o a un estado de inflamación crónica.

u#) h u#) u

1.2 Mecanismos de reconocimiento de la inmunidad innata. Comparación con la inmunidad adaptativa.

O u y V o h

O o

h° Uh hkk O h° Uh h

O

hkk -

7

h

h

O

)

1.3 Mecanismos celulares de la inmunidad innata

O

K

1.3.1 Células no inmunológicas de la inmunidad innata

= U

1.3.2 Células inmunológicas de la inmunidad innata.

0)
U U #
)# =

-Neutrófilos: 0
o

8 #o7 0
pool hU u
0
8 #o7 #k

h#

-Eosinófilos:
u
u O
y7# @

8° u° # -" h α) hU u
o
o

-Basófilos:

o
y7#
huU

-Plaquetas:

o
_

2. Los Monocitos

o U
U #o7
)
U° #)# O
U° #)#

2.1 Características generales de los Mo

o U h
h# u

o U

U
U° #) #
@
U
U

2.2 Subpoblaciones de Mo

) U
U
#)
7 k @ @ #) U
#) U
U #) U #)
U° # uV7 @
@
uK) #
in vitro - ## #E#
U #)
uV7 α
=φ oy=
U #)
O° ##k U
U
##k
k° Vu-o U @ U @
u
U ##k

... ##O ... U ...
 ... O ... ##O ... ##k ...
 ... U ...
 ... _ ... #CE#k ...
 ... U #) ...
 ... u ... U #) ... #) ...
 ...
 h ... U ...
 U #) #CE#k ... U #) #CE#k ... u87β ...
 @ U #o7 ##O ... U #) ...
 ... y7# 8U ... U #) ...
 O ... U ...
 ... #) ... Cho U ...
 ... U #) #) ... U #) ...
 ... #) #) #) #) #) ...
 ... U ... U #) #) #) #) #) #) ...
 ... U ...

3. Las Células Dendríticas

3.1 Características generales de las DC

O)# ... h# ... # ...
 ... o ...
 ... u ...
 # ...)# ...
 O)# ...
 ...)# ...)# ...
 ...

-)#
=Φ u

3.2 Los linajes de las DC humanas

O)#
)#
=O)k #) u #)
" #) # VM)#
)#
)#

3.2.1 Las DC mieloides.

- #) #) #) #)
)##) U)#
#) U #) #) O)#
#) #))#
#) #) #) "

3.2.1.1 Las DC mieloides CD1c⁺.

o)#
k h"U# O)##)
#) #) #)
u O u
O)##) uck
o u#)
u#) o uV7α @ @
@ k uck
y @
u u)#

3.2.1.2 Las DC mieloides CD141^{hi}

k) # h" U # O) #
#)) #
O) #
#) #O #
uOk uOk
u #) in vitro O) # #) uV7 α #O @V
#) #) @

3.2.2 Las DC CD14⁺

O) # #)) #
O o
#) U U #) #
#) #) U o
#) =O) k #)
#) #) ##k o
u helper

3.2.3 Las DC plasmacitoides

O) #) #
#) #) #) #) #) k ° #)
#) o
#) @ k #) #O # # ") # ° #) O) #
U =# @
O) # @V @
#) #) uOk
uOk o
#) u u
#) #) u
#) V °

© U O

3.2.4 Las células de Langerhans

O O G# k

O #) U=#@ O G#)#

o

O #) O G#

3.2.5 Las DC inflamatorias

)#)#

U -

U)# O U #)

)# V)#

#) O #k #O

@V O)# U

u#) naïve

u#) @ @ uV7α @

@

3.3 Captación de Antígenos y Maduración

O)#

)#)# O)#

U=# -)#

O

)# u'naïve -

O)#
cho 8 cho)V# 8
)V
u uck O
uV7 @
)#)# O #)#
)#)# -
)# u
)#
u -
#) #) U=# @ @ #)
#)
)#
\
)#
)# u#) #)
)#

3.4 Participación de las quimioquinas en la migración de las DC.

k
)#
target
h homing ##k
)#
-)#

##O ##O

u

3.5 Plasticidad en las DC.

u)#

u

)# U u)#

)# u o

)#

)#

)#

u)#

o)#

u u)#

)#

in vitro in vivo

®)

3.6 Obtención de las células dendríticas *in vitro*

)#

in vitro)#

O)# #)

#) 8U

#07 uV7 α # O #))#

#)

)# #) 8U #07 uV7 α ® U ° #

U #07

O)# #)

- h" U # U

8U #o7 @)# o @ 8U #o7
h" U#)# @ 8U #o7 -
O
8U #o7 @
#) U O U #) #)
)# #) #) O)#
V
)#) Cho
uV7 #) O'U U U#U # 8\)V uV7
@ @ h8-)#
8 @V Cho
#) #) U=# @@ #)
)# uV7 α h8 - @ β @
O U 8U #o7 @ @
in vitro)#

4. Los Macrófagos

4.1 Características generales de los MAC

O U° #
U U° #
)# O U U° # de novo
O
U
8 #o7
##O ##O O
U
U° #)# O U° #
U° #

O 'U° #'

#

O 'U° #'

4.2 Rol de los macrófagos durante la homeostasis y en las respuestas inmunes

'U° #'

O 'U° #'

O 'U° #'

4.3 Activación de los MAC

O 'U° #'

'h° U h'

'hkk'

'@V' '@'

'U° #'

'U° #' O'

hkk

'u' 'uGk'

'V\)' 'V° Cho'

O hkk
 U° # u
 VM
 = hkk u
 h° U h u
 uOk U° # # @V @
 u u
 # @V u
 #) u @ u #)
 u
 @ @
 @ u

4.3.1 Fenotipos funcionales

U° #
 - @V U° #
 - @V
 U = # @ U° # uV7
 #)
 U° # h U° #
 # U° #
 U° # U
 U o et al. U° # @
 @V U U° #
 @V
 7 @8 @
 #)

#) @
O @
U=# @
...
† @ @ u #) u
#) VMi \
@ U° #
@ β @ h
@ U° #
@ @ #) U=# @
##O ##O #
U=# @ @ U° #
@V
- U° #
O
U° #
8# @
u
@ @
)
U° #
U
U
@ @ U @ β Cho U @ u87β
8#

4.3.2 Plasticidad

O U° #

u

in situ

o

U° #

U° #

U° #

U° #

U° #

U U

in vitro

in vivo

-

U° #

U

U

U

O

U° #

U° #

h

U° #

U° #

4.4 Determinantes moleculares de la polarización del MAC

y

U° # O

Q7 au° u

@V

uK

U° #

U

au° u

@

@

U au° u

O

U

Q7

@

@

uV7

u u

O

@

@

@

au° u

U

#)

@

au° u

@

u

#)

U

O' U° # 'ou° u' uκ
 o\#o O @ @V
 o\#o o\#o 'ou° u' 'ou° u'
 k @7 ou° u o\#o
 U° # O 'hh° k' 'hh° k'
 U
 # 'ou° u' 'hh° k'
 M M7
 U° # M7 'ou° u' U #) 7
 hh° k U uV7 # ##O V\o
 V7 " M7 U° #
 V7 " =@ α @ U
 U° # U o ° #)
 'ou° u' 'hh° k'
 - uκ V7 "
 U° # U o V7 "
 U U° # u° U -
 V7 " U 'in vitro' 'in vivo' O
 =@ α =@ α U° #
 U U V\o U U

h U° hM
 o @
 K/M U
 @ K/M U° #

4.5 Obtención de MAC *in vitro*

U° # U #o7 U° # 8U #o7
 U U° # 'in vitro' - 8U #o7 U #o7

U - U 8U #o7
 U #o7 U #
 o U # U #
 U #o7 8U #o7
 #) #) c-fms =@
 @ U #
 @V @ @ U U

5. Las Citoquinas

O
 O
 U u u
 u u
 - @V @
 u u
 - u u @8 @-
 U=# @@ k 7 k@ 7 k@

5.1 El Interferón-γ

o @V @
 u VM @V
 U # - @V u
 U # - U #
 U # -

O @
@V u
@

5.2.1 Vías de señalización en respuesta a la IL-10

O @
- @ k
@ k @ k
- @ k @ K Mou° u° O
K M° u @ k
O @
°u° u °u° u U° # °u° u O @
U° # uV7°
°u° u O °u° u
k
@
o\#o O o\#o °u° u @
°u° u
- °u° u °u° u
@
- @ h@M
K M 7 h@M
@ o
@ h@M
@ -kMU° hM
o U° hM @

5.3 Interleuquina-4 e Interleuquina-13

O @
u
u O @
@8 @- \

7 k@#) " U u -
 U° #
 #)
 O @ u
) #
 O @
 U h @
 " O @ @
 switch @- #) " U° #
 @ O @
 u #) @
 u - @
) # U #)
 '8U #o7'

5.3.1 Vías de señalización en respuesta a IL-4 o IL-13

O @ @
 @ k @ k
 @ k α @ k α
 @ @ k α @O @
 @ @
 O K M O K M α u
)
 @ @
 K M K M o # h@M K/MU° hM U

@

U° hM

o

ou° u° ou° u°

6. Las Quimioquinas y sus Receptores

O

)

O

#CE#

#CE# ##

#

#

CE

O

8

O

o

h

O

rolling

u

in

vitro° in vivo°

#

"rolling",

8

)

)

0

h

@

##k

##k

u

VM

8 #07

#k

#k

ho

U

U #h

##k

U

@ k

k

h

@V

U #h

##k U

0

=@

6.1 La quimioquina fractalquina/CX₃CL1 y su receptor CX₃CR1

0

#E#O

#E#k

#E#

#E#O

0

u

#CE#O

#CE#k

O

u

)#

U°#

@

Oh

uV7α @

@V

o

O

U

u VM-

)°U

)°U

)°U

#CE#O

O

h

#CE#O

O

8

#CE#k

- #CE#k

U

u

VM

)#

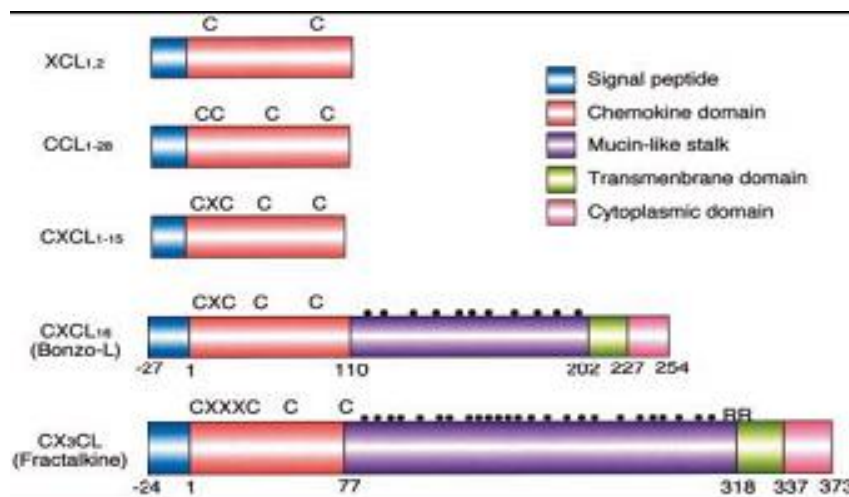
k

O

U

8

Estructura de las quimioquinas [231]



6.1.1 Descripción del gen *cx3cr1*

cx3cr1 # *et al.*

M

yuk

\k7

y

\k7

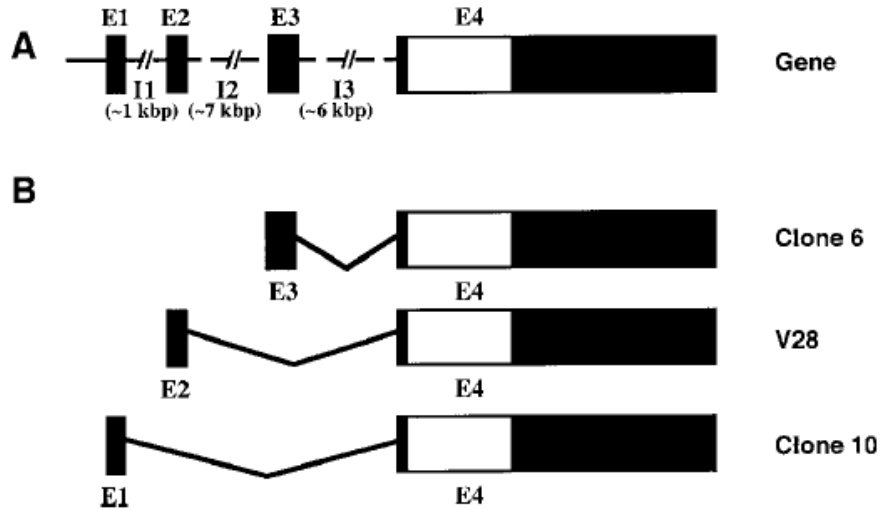
O # t
- h" U #
t # h" U #
O
u#) u#) VM U
t VM
U # #

o #E#k
o
o yuk
h yuk
yuk yuk
##k ##k h
yuk O

y
8° u° ou° u°
#E#k

h *cx3cr1*

Secuencia genómica y variantes de *splicing* del mRNA para CX₃CR1 en humanos [229]



6.1.2 Polimorfismos de CX₃CR1

V

single nucleotide polymorphism ovh

#E#k

#→u 8→°

#E#k

† @

u U

#E#k

@ U

@ U

O

† @ u U

6.1.3. Monocitos y fractalquina

y

U

#k

#k O U #) #)

#k U #) #k -

#k U

#k

#O U

U #k

y

#O U

#

#O U

U

#O U

in vitro U

6.1.4. Participación de CX₃CR1 en diferentes patologías

-Enfermedades renales

-

h

U @

#k VM

#)

#k

#k

-Rechazo de trasplantes

O

o

U

#E#k

U° #

VM

#E#k

-Aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares

O

U

O U

U #o7 Q O

U° # - U° #

=

U

)

#E#k

U

O

et al

#E#

U° # h

#E#k

U

#E#k

U

o @ #k
o
o

-Infecciones por HIV

o #O =
u #k) # u
#k
= O @ U

o y

h #k = *in vitro*
u

-Otras enfermedades inflamatorias

o #O
u u) #
#O #k #O
in vitro

O #O

h #O #k

V\)

7. Síndrome Urémico Hemolítico

7.1 Aspectos generales del SUH

oy=
O oy=
)
oy=
O

O
O U u
oy=
oy=

M et al. oy=
o o Shigella -=# -
oy= \ = O
ou-# oy=
oy=

ou-# o
O ou-#
y
U

h
8 o O
U o
U
uV7α @ @ @ -
)
)

oy= o
in vivo e in vitro
O Cho
o au-#
) Cho
uV7α @ β @ U
@\
-
) oy= O

7.2 Tratamiento

au-#
h
oy= =
y
-
-

u

$$oy = o$$

$$oy =$$

Materiales y Métodos

o
)
h

3.6. Soluciones para aislar Mo

3.6.1. Ficoll-Triyosom.

O
7 u
7@ \ 00 u hU 8- = " y
o
#

3.6.2. Solución Buffer T10

o
8

3.6.3. Solución Buffer T1:

- u
o =

3.6.4. Buffer de resuspensión:

o
h" U #

3.6.5. P100:

O
h
h
u
o7" h h u o7"
-
h" U #

4. Aislamiento y cultivo de Mo humanos a partir de paquetes de leucocitos (*Buffy coat*).

4.1. Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC)

h" o' Æ

))#

Ono' y @V

U°# @V y Ono'

U @ U'h U°#

khU@

4.4. Cultivo de Mo en presencia de citoquinas

O U

#

#\ O U @V y

@ @ @ @V -

@ @ @V

U

O U o" U h) U

@V y @ @

@V

5. Cultivo de células.

O u=h khU@ #

#\ u U

8 " \ 8 =

7 8 # U

7 \ o 8 " h "

6. Recuento de células

#

V O

O

7. Citometría de flujo

7.1. Evaluación de la expresión de diferentes antígenos en la superficie celular

O' U

U)# U°#

O h"o Æ

-)#

#) #) #) #) #) =O)k - U°#

#) #) #) #) #) ##k =O)k U

O h"o Æ

@ 7 @ O o° "

O # j

") 7 #o ") =

8 O U U°#)#

o o 7 o oo# 7o#

O

O

7 o h u y

u 7

7.2 Medición de STAT1 fosforilado en Ser-727 en Mo.

O U khU@ o7" #

#\ O

@V y @ @ @

@V 7Æ"

h @ ") h o K #° yo° #

O o

h ") h o K #° yo°

O h"o Æ "o

O

O

ou° u ho

o

@8 O

h h"o Æ

U

O U o" U h) U

@V y @ @ @

@V

8. Evaluación de la apoptosis

8.1 Evaluación de apoptosis y viabilidad por microscopía de fluorescencia

7

#

h

8.2 Evaluación de apoptosis por unión de Anexina-V y citometría de flujo

O t U U° #) #

o O t

#

j ")

@ o o K #° yo° "

9. Western Blot de lisados celulares y ensayos de actividad quinasa.

h U O

h"o Æ

k@

o

" h k @ O

o) oh° 8-

- o) oh° 8-

u 8 o

ht) 7 " k = #°

h"o O

h"o "o h"o

O h"o u

@8 @8

=kh ° yM O

-#O h

10. Aislamiento de RNA y análisis por transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR):

- kV° V o kV° @U V " h°
yo° U)# U° # U h

)V° kV°)V° @

7 o)V° o O K #° yo°

ku h#k

kV° #E#k †

8° h) = O # h#k 7 o)V°

U σ "k 8 @ k

o @ @ yo° O h#k

U U # U primers

O h#k

h#k

-)V° σ "k

8 # -

#

)V°

kV° u=h #E#k

h#k

h#k 8° h) =

O # k j O

O o-U O
..... M ‡
.....) O
U ‡ y O

12. Determinación de los polimorfismos del gen del receptor CX₃CR1

12.1 Obtención del DNA.

-)V° j @)V° U
j @8-V 8 U) yo°

12.2 Genotipificación.

O *Single nucleotide*
polimorphism oVh k7Ch *Restriction Fragment Length*
Polimorphisms)V° h#k #E#k
..... *primers Forward* ##8° 88 u## uu#° 88° °° u#u *Reverse*
u#° 8#° u#° 88u u#° 88° °° #u#
..... " " @ h @ 7 \ #
..... " " @ u U h#k
..... u
..... o U
.....)
h @ † @-
†
..... # @

12.3 Estadística.

O - =
‡ O
..... 7

Resultados

Capítulo I

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR PARA FRACTALQUINA (CX₃CR1) DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MONOCÍTICA.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

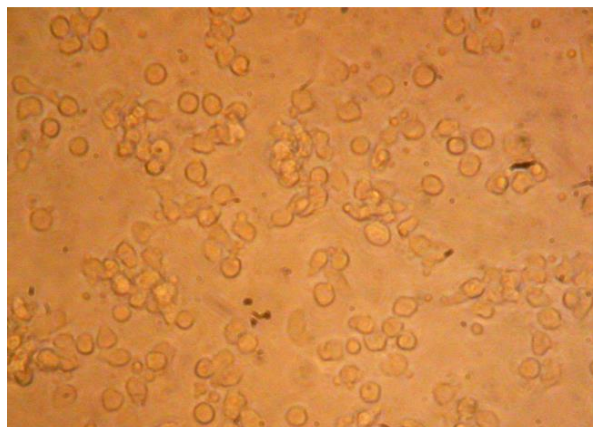
1. Análisis de la expresión del receptor para fractalquina (CX₃CR1) durante la diferenciación monocítica.

k U U ° #) #
#E#k U
U buffy coat
7 h
#) #) O U
8U #o7 @) # 8U #o7
U ° # U U

1.1 Cambios morfológicos de los Mo en cultivo.

) U 7
U O
U U ° #
7 " h
U) #
7 #

A)Á



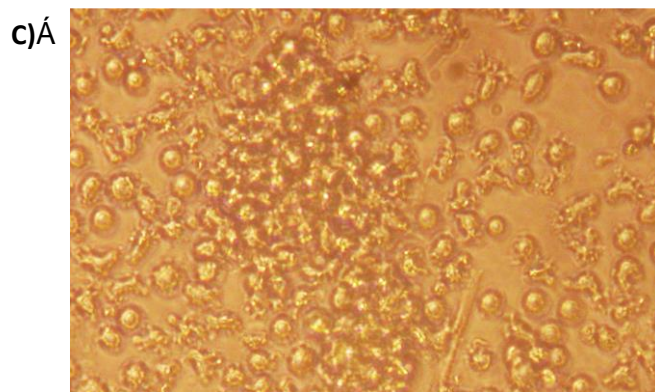
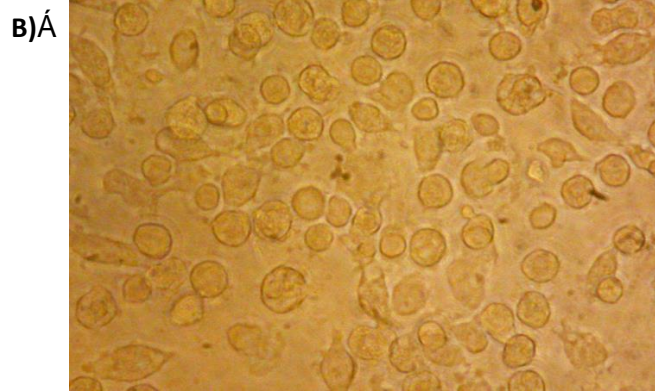


Figura 1: Morfología de los MAC e iDC generados a partir de Mo adherentes al plástico en presencia de citoquinas de diferenciación.

*Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (30ng/ml) sólo ó GM-CSF (50ng/ml) + IL-4 (20ng/ml), para generar MAC e iDC, respectivamente. Se tomaron fotografías de los **A)** Mo a las 2hs de comenzado el cultivo y de **B)** MAC y **C)** iDC, a los 7 días, en los distintos medios condicionantes. Magnificación del original: 400X. Los resultados son representativos de 7-14 experimentos con resultados similares.*

1.2 Cambios fenotípicos de los Mo durante la diferenciación a iDC y MAC.

h

U U #) #)) # #) O U

#) #) 8U #07 U #

#) #) 7 " #) #) 7 k @ #)

#) 7 # @U o-U U

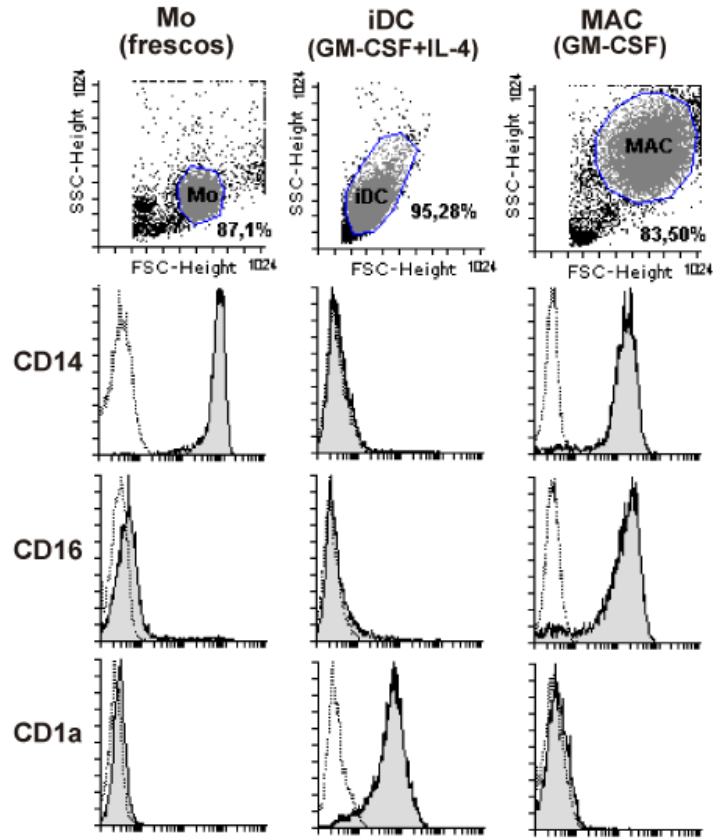
U # h U 8U #07 @

#)

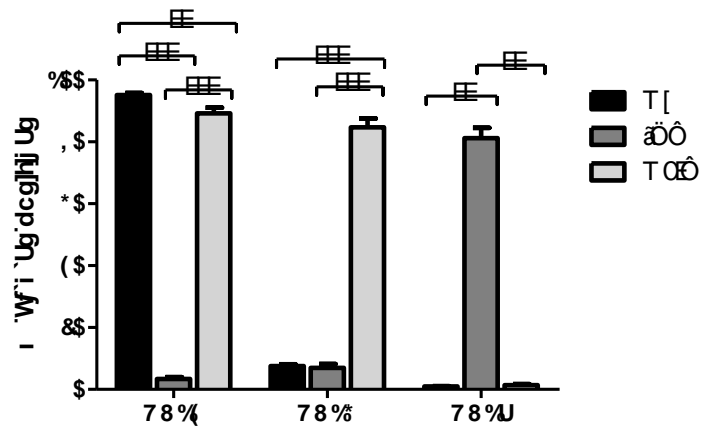
#) #) #)

U)#

A)



B)



c)

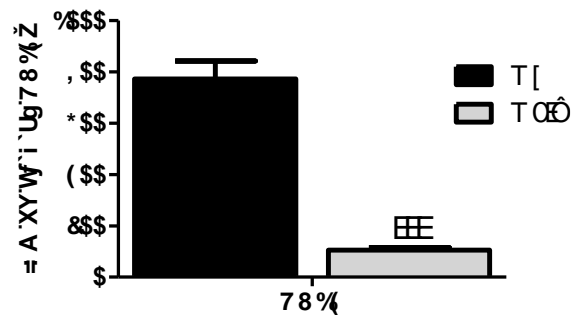


Figura 2: Análisis de los antígenos de superficie en Mo y las poblaciones derivadas de Mo.

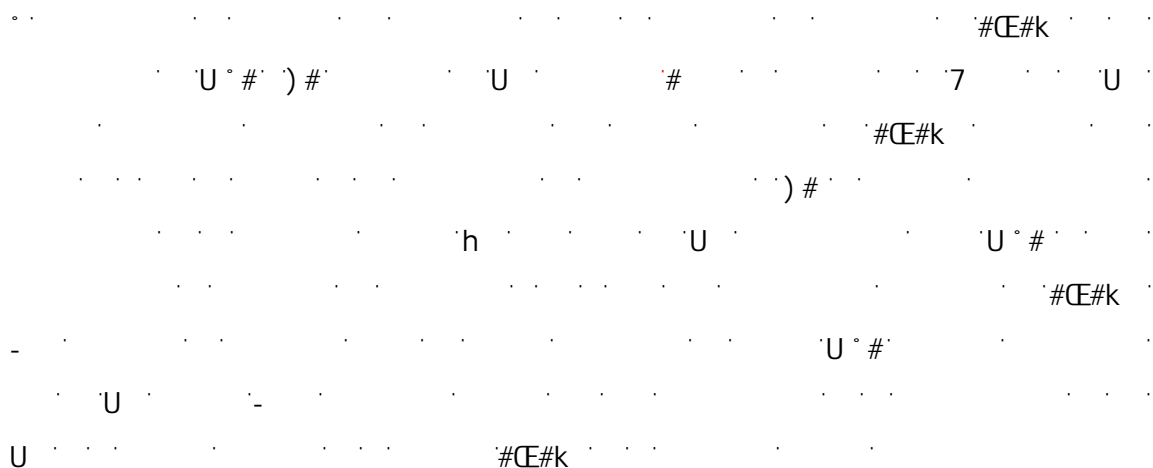
Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (30ng/ml) sólo ó GM-CSF (50ng/ml) + IL-4 (20ng/ml), para generar MAC e iDC, respectivamente. Los Mo frescos fueron marcados inmediatamente o al día 7 de comenzado el cultivo con: mAb anti-CD1a conjugado a FITC, mAb anti-CD16 conjugado a PE y mAb anti-CD14 conjugado a PCy5.

A) Cambios en la morfología en los Mo recientemente purificados, iDC y MAC fueron determinados por citometría de flujo mediante análisis de SSC vs. FSC. Un gráfico de puntos, representativo de cada población celular generada de acuerdo a las condiciones de cultivo, se muestra en el panel superior. Los análisis de expresión en superficie de CD14, CD16 y CD1a por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de las distintas poblaciones determinada de acuerdo al SSC vs. FSC. En el panel inferior se muestran histogramas representativos de la expresión en membrana de cada antígeno. Los histogramas punteados representan los controles de isotipo.

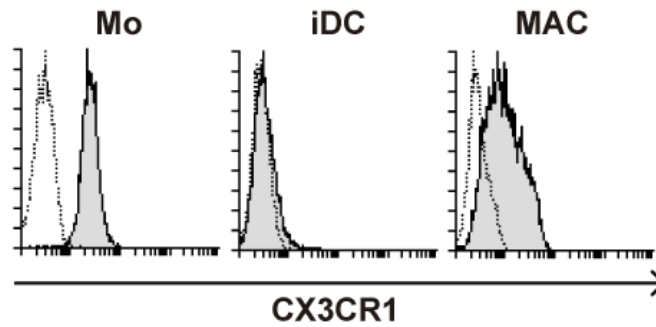
B) Porcentaje de células positivas para CD14, CD16 y CD1a en Mo frescos, iDC y MAC. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 7-14 dadores diferentes. La significancia estadística fue calculada para cada marcador por separado mediante test de Kruskal Wallis ($p < 0,001$) y post-test Mann Whitney U para comparar diferencias entre dos grupos. $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

C) IFM por célula en Mo y MAC CD14⁺. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 9-14 dadores diferentes. Significancia estadística calculada con test Mann Whitney. $***p < 0,001$.

1.2.1 Expresión de CX₃CR1 en las iDC y MAC:



A)



B)

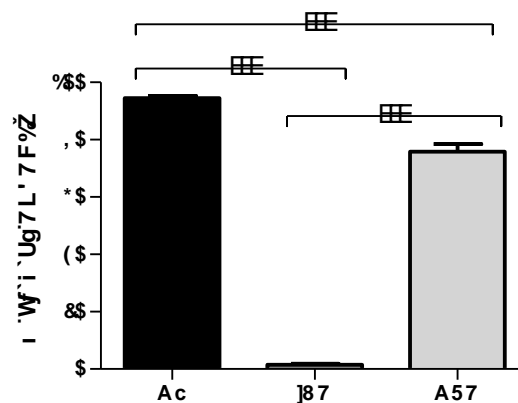


Figura 3: Análisis de la expresión de CX₃CR1 en superficie de Mo frescos y de las iDC y MAC derivados de Mo.

Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (30ng/ml) sólo ó GM-CSF (50ng/ml) + IL-4 (20ng/ml), para generar MAC e iDC, respectivamente. Los Mo frescos fueron marcados inmediatamente o al día 7 de comenzado el cultivo con: mAb anti-CX₃CR1 conjugado a FITC. Los análisis de expresión en superficie de CX₃CR1 por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de las distintas poblaciones determinada de acuerdo al SSC vs. FSC.

A) Se muestran histogramas representativos de la expresión en membrana de CX₃CR1 en las distintas poblaciones. Los histogramas punteados representan el control de isotipo.

B) Porcentaje de células positivas para CX₃CR1 en Mo frescos, iDC y MAC. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 7-14 dadores diferentes. La significancia estadística fue calculada mediante test de Kruskal Wallis ($p < 0,001$) y post-test Mann Whitney U para comparar diferencias entre dos grupos. *** $p < 0,001$.

1.2.2 Cinética de la pérdida del CX₃CR1 en iDC:

h

#CE#k

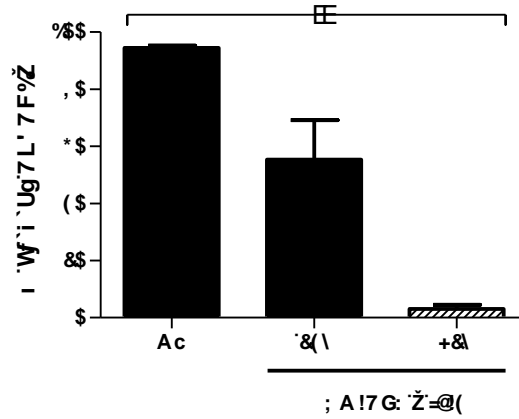
#CE#k

U

U) # #) #)

) U 7 "

A)



B)

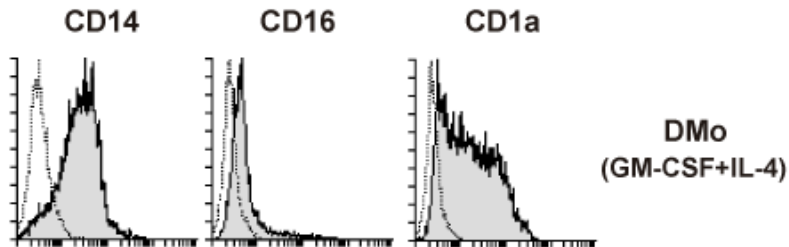


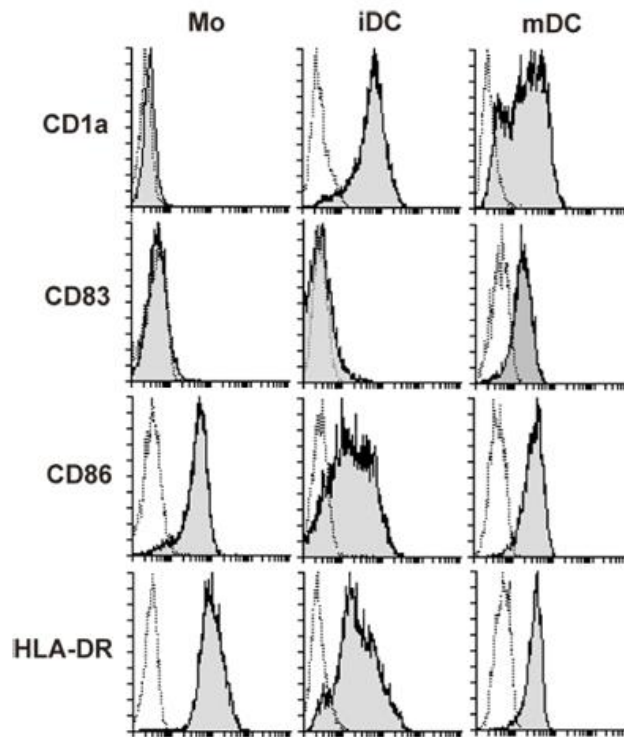
Figura 4: Análisis de la expresión de CX₃CR1 en superficie durante la diferenciación a iDC.

Mo purificados fueron cultivados (1.10⁶/ml) durante 24-72hs en presencia de GM-CSF (50ng/ml) + IL-4 (20ng/ml), para generar iDC. Los análisis de expresión de los distintos marcadores por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de las distintas poblaciones determinada de acuerdo al SSC vs. FSC.

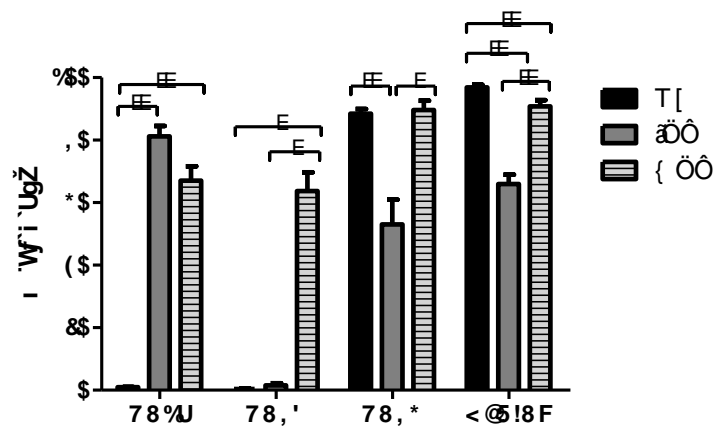
A) Los Mo frescos fueron marcados inmediatamente ó a las 24 ó 72hs de iniciado el cultivo con mAb anti-CX₃CR1 conjugado a FITC. Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas para CX₃CR1 en Mo frescos, iDC y MAC. Cada barra representa el promedio ± SEM de 3-14 dadores diferentes. La significancia estadística fue calculada mediante test de Kruskal Wallis (p<0,001) y post-test Mann Whitney U para comparar diferencias entre dos grupos. **p<0,01.

B) Los Mo fueron marcados a las 72hs de iniciado el cultivo con: mAb anti-CD1a conjugado a FITC, mAb anti-CD16 conjugado con PE y mAb anti-CD14 conjugado con PCy5. Se muestran

A)



B)



C)

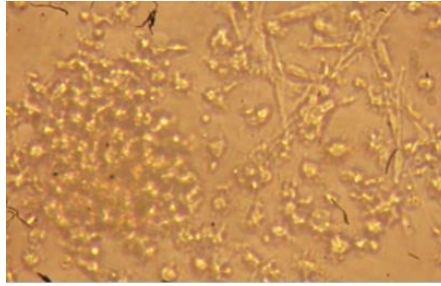


Figura 5: Cambios fenotípicos y morfológicos durante diferenciación y maduración de las DC. Mo purificados fueron cultivados ($1 \cdot 10^6$ /ml) durante 7 días en presencia de GM-CSF (50ng/ml) e IL-4 (20ng/ml), para generar iDC y por 48hs adicionales en presencia de LPS (500ng/ml) + IFN- γ (1000 U/ml) para obtener mDC. Los Mo frescos fueron marcados inmediatamente ó a los 7 ó 9 días de iniciado el cultivo con: mAb anti-CD1a conjugado a FITC, mAb anti-CD83 conjugado a PE, mAb anti-CD86 conjugado a PCy5 y mAb anti HLA-DR conjugado a FITC. Los análisis de expresión en superficie de CD1a, CD83, CD86 y HLA-DR por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región específica de las distintas poblaciones, determinadas de acuerdo al SSC vs. FSC.

A) Se muestran histogramas representativos de la expresión en membrana de cada antígeno. Los histogramas punteados representan los controles de isotipo.

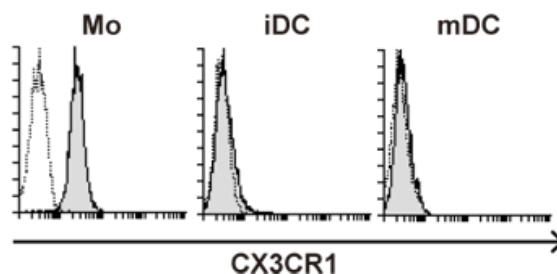
B) Porcentaje de células positivas para CD1a, CD83, CD86 y HLA-DR en Mo frescos, iDC y mDC. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 7-14 donadores diferentes. La significancia estadística fue calculada con el test de Kruskal Wallis ($p < 0.05$) y post-test Mann Whitney U para comparar diferencias entre dos grupos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

C) mDC, diferenciadas con IL-4+GM-CSF por 7 días y maduras con LPS+IFN- γ por 2 días adicionales. Magnificación del original: 400X. Este resultado es representativo de 7 experimentos con resultados similares.

1.3.1 Expresión de CX₃CR1 en las mDC:

o) #
 #CE#k o #CE#k 7

A)



B)

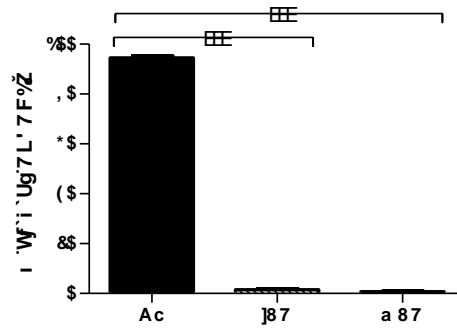


Figura 6: Análisis de la expresión de CX₃CR1 en superficie durante los procesos de diferenciación y maduración de las DC.

Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (50ng/ml) + IL-4 (20ng/ml), para generar iDC y por 48hs adicionales en presencia de LPS (500ng/ml) + IFN- γ (1000 U/ml) para obtener mDC. Los Mo frescos fueron marcados inmediatamente ó a los 7 ó 9 días de iniciado el cultivo con mAb anti-CX₃CR1 conjugado a FITC. Los análisis de expresión en superficie de CX₃CR1 por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de las distintas poblaciones determinada de acuerdo al SSC vs. FSC.

A) Se muestran histogramas representativos de la expresión en membrana de CX₃CR1. Los histogramas punteados representan el control de isotipo.

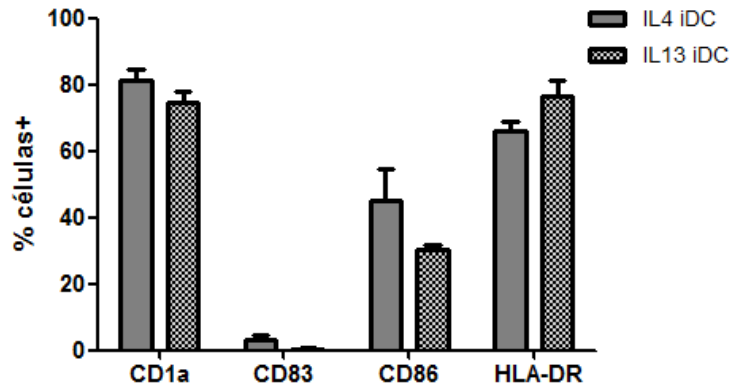
B) Porcentaje de células positivas para CX₃CR1 en Mo frescos, iDC y mDC. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 7-14 dadores diferentes. La significancia estadística fue calculada mediante el test Kruskal Wallis ($p < 0,001$) y post-test Mann Whitney U para comparar diferencias entre dos grupos. *** $p < 0,001$.

1.4 Protocolo alternativo para la diferenciación a iDC con IL-13:

o U
 @ 8U #o7 @ 8U
 #o7 U) #
 @ 8U #o7

O) # U 8U #o7 @
 U U) # O @
) # #) #) #) =O) k @
) # 7 # @) #
 7

A)



B)

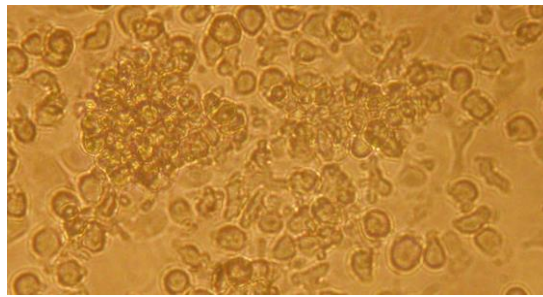


Figura 7: Cambios fenotípicos y morfológicos durante la diferenciación de Mo a iDC con el protocolo alternativo.

Mo purificados fueron cultivados ($1 \cdot 10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (50ng/ml) + IL-13 (20ng/ml), para generar iDC (IL-13 iDC). Las IL-13 iDC fueron marcados a los 7 días de iniciado el cultivo con: mAb anti-CD1a conjugado a FITC, mAb anti-CD83 conjugado a PE, mAb anti-CD86 conjugado a PCy5 y mAb anti HLA-DR conjugado a FITC. Los análisis de expresión en superficie de CD1a, CD83, CD86 y HLA-DR por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de la población de iDC determinada de acuerdo al SSC vs. FSC.

A) Se compararon los porcentajes de células positivas para cada antígeno de superficie en IL-4 iDC e IL-13 iDC. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 5-7 experimentos. La significancia estadística fue calculada para cada marcador mediante el test Mann Whitney U (ns).

B) iDC, diferenciadas con IL-13+GM-CSF por 7 días. Magnificación del original: 400X. Este resultado es representativo de 5 experimentos con resultados similares.

1.4.1. Expresión de CX₃CR1 en las IL-13-iDC

" #CE#k
 V
) U #CE#k 7

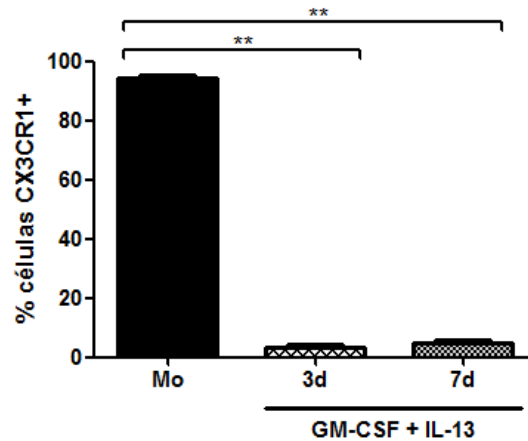


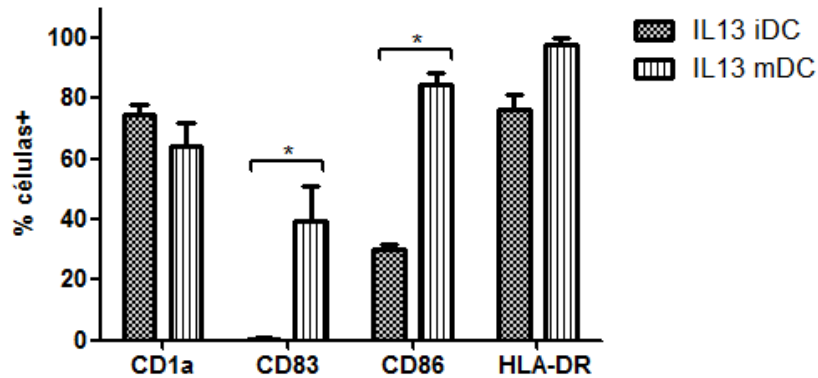
Figura 8: Expresión de CX₃CR1 en superficie durante la diferenciación de Mo a iDC con el protocolo alternativo.

Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 3 o 7 días en presencia de GM-CSF (50ng/ml) e IL-13 (20ng/ml), para generar iDC (IL-13 iDC). Los Mo frescos fueron marcados inmediatamente ó a los 3 o 7 días de iniciado el cultivo con: mAb anti-CX₃CR1 conjugado a FITC. Los análisis de expresión en superficie de CX₃CR1 por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de las distintas poblaciones determinada en cada caso de acuerdo al SSC vs. FSC. Se representaron los porcentajes de células positivas para CX₃CR1 en Mo, Mo expuestos por 72hs a las citoquinas de diferenciación IL-13+GM-CSF (IL-13 DMo) e IL-13 iDC. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 5-14 experimentos. La significancia estadística fue calculada mediante el test Kruskal Wallis ($p < 0,001$) y post-test Mann Whitney U para comparar diferencias entre dos grupos. ** $p < 0,01$.

1.5 Maduración de las IL-13-iDC

○ () # Ono @V) #
 =O) k #) #) 7
 ©) #
 7 "

A)



B)

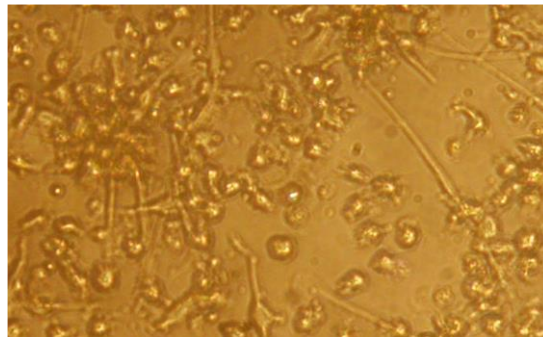


Figura 9: Cambios en la expresión de antígenos de superficie y morfología durante la maduración de IL-13 iDC.

Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (50ng/ml) + IL-13 (20ng/ml), para generar IL-13 iDC y por 48hs adicionales en presencia de LPS (500ng/ml) + IFN- γ (1000U/ml) para obtener IL-13 mDC. Los Mo diferenciados fueron marcados a los 7 o 9 días de iniciado el cultivo con: mAb anti-CD1a conjugado a FITC, mAb anti-CD83 conjugado a PE, mAb anti-CD86 conjugado a PCy5 y mAb anti HLA-DR conjugado a FITC. Los análisis de expresión en superficie de CD1a, CD83, CD86 y HLA-DR por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de las población de iDC y mDC determinadas de acuerdo al SSC vs. FSC.

A) Porcentajes de células positivas para cada antígeno de superficie en las IL-13 iDC e IL-13 mDC. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 3-5 muestras de dadores. La significancia estadística fue calculada para cada marcador por separado mediante el test Mann Whitney U. * $p < 0,05$.

B) IL-13 mDC, diferenciadas con IL-13+GM-CSF por 7 días y maduras con LPS+IFN- γ por 2 días adicionales. Magnificación del original: 400X. Este resultado es representativo de 3 experimentos con resultados similares.

1.6 Diferenciación de los Mo a iDC en presencia de IFN- γ

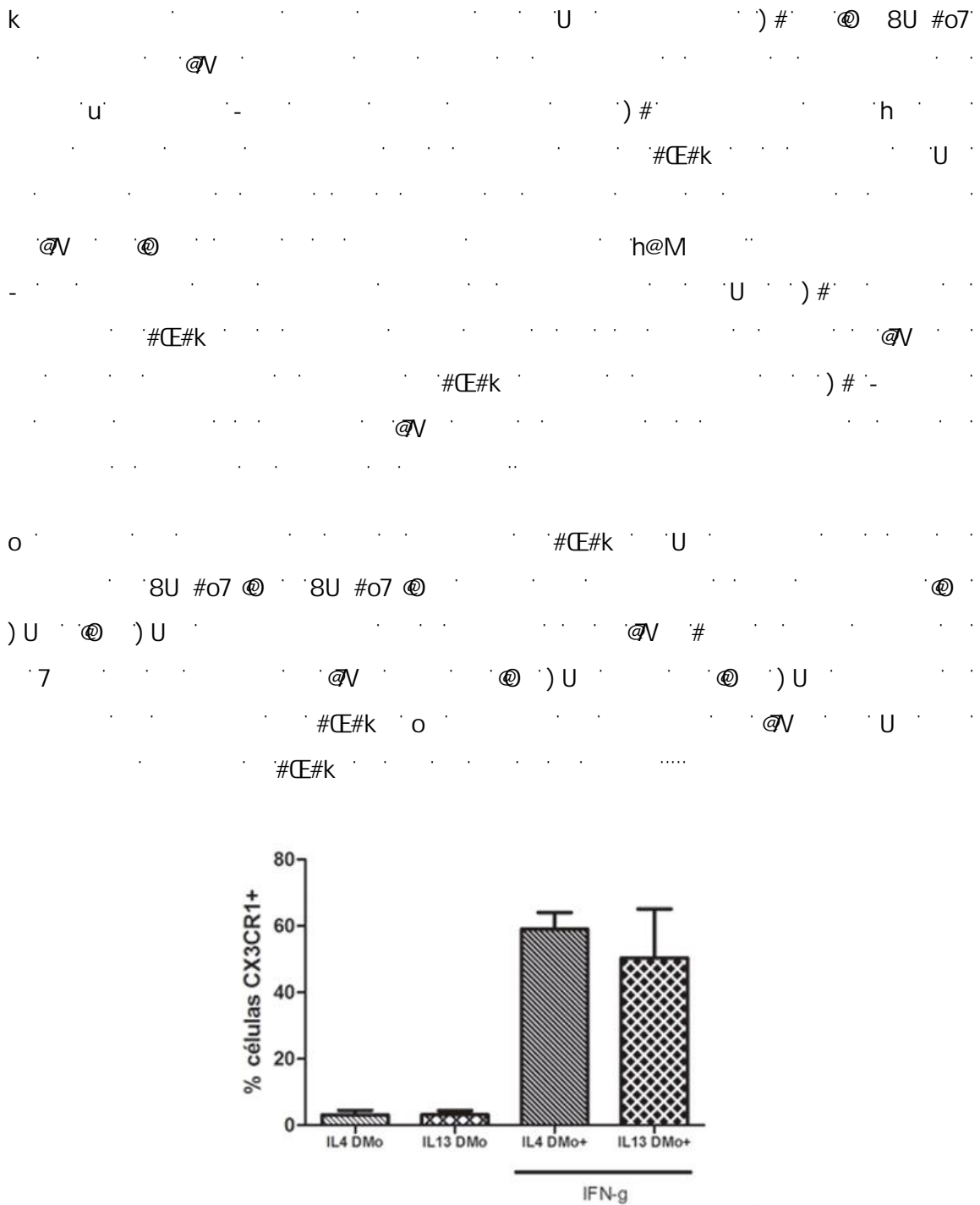
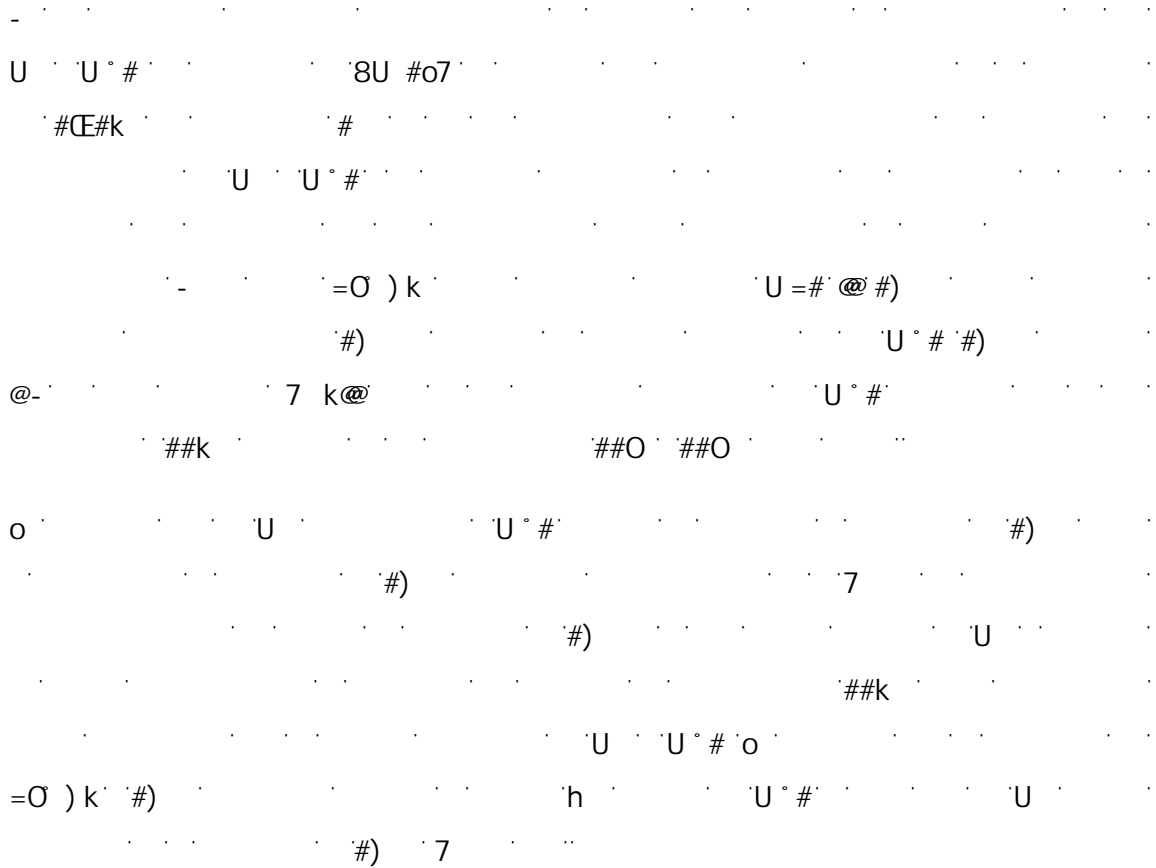


Figura 10: Expresión de CX₃CR1 en Mo diferenciados por 3 días a iDC en presencia/ausencia de IFN- γ .

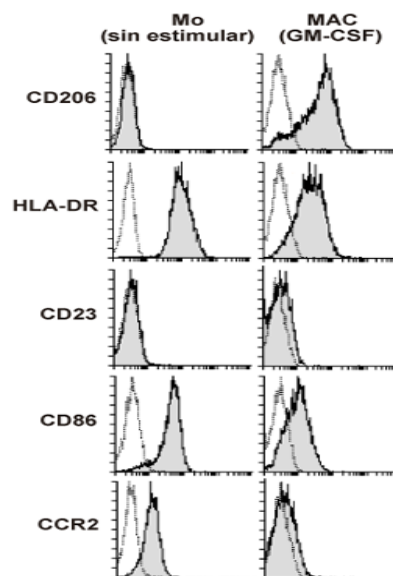
Mo purificados fueron cultivados ($1 \cdot 10^6$ /ml) durante 3 días en presencia de GM-CSF (50ng/ml) e IL-13 o IL-4 (20ng/ml), con o sin IFN- γ (1000 U/ml) para inducir diferenciación a DMo. Los Mo diferenciados fueron marcados a las 72hs de iniciado el cultivo con: mAb anti-CX₃CR1 conjugado a FITC. Los análisis de expresión en superficie de CX₃CR1 por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de las población de los DMo determinada de acuerdo al FSC vs.

SSC. Se representaron los porcentajes de células positivas para CX₃CR1 en los DMO diferenciados en los distintos medios condicionantes. Cada barra representa el promedio ± SEM de 3-5 experimentos. La significancia estadística fue calculada mediante el test de Kruskal Wallis (p<0,05) y post-test Mann Whitney U para comparar diferencias entre dos grupos (ns).

1.7 Cambios fenotípicos de los Mo durante la diferenciación a MAC.



A)



B)

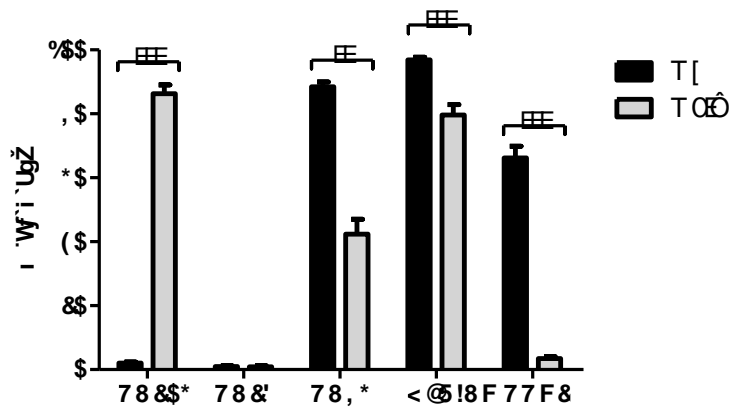


Figura 11: Cambios fenotípicos durante la diferenciación de los Mo a MAC.

Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (30ng/ml) para generar MAC. Los Mo frescos fueron marcados inmediatamente o a los 7 días de iniciado el cultivo con: mAb anti-CD206 conjugado a FITC, mAb anti-CD23 conjugado a PE, mAb anti-CD86 conjugado a PCy5, mAb anti HLA-DR conjugado a FITC y mAb anti-CCR2 conjugado a PE. Los análisis de expresión en superficie de CD206, CD23, CD86, HLA-DR y CCR2 por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de los Mo y MAC, ambas determinadas de acuerdo al SSC vs. FSC.

A) Se muestran histogramas representativos de la expresión en membrana de cada antígeno en Mo y MAC. Los histogramas punteados representan los controles de isotipo.

B) Porcentaje de células positivas para cada marcador en Mo frescos y MAC. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 10-14 dadores. La significancia estadística fue calculada para cada marcador por separado mediante el test Mann Whitney U, para comparar diferencias entre dos grupos. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

1.8 Activación de los MAC

O 'U° #'

O 'U° #'

u 'Cho

U

U° #'

h

#E#k 'U° #'

U 'U° #'

8U #o7 U

1.8.1. Cambios morfológicos en los MAC polarizados hacia los perfiles M1 y M2.

h U° # Cho @V
U h U° #
U U @
u U
o U
U° # 7
U
7

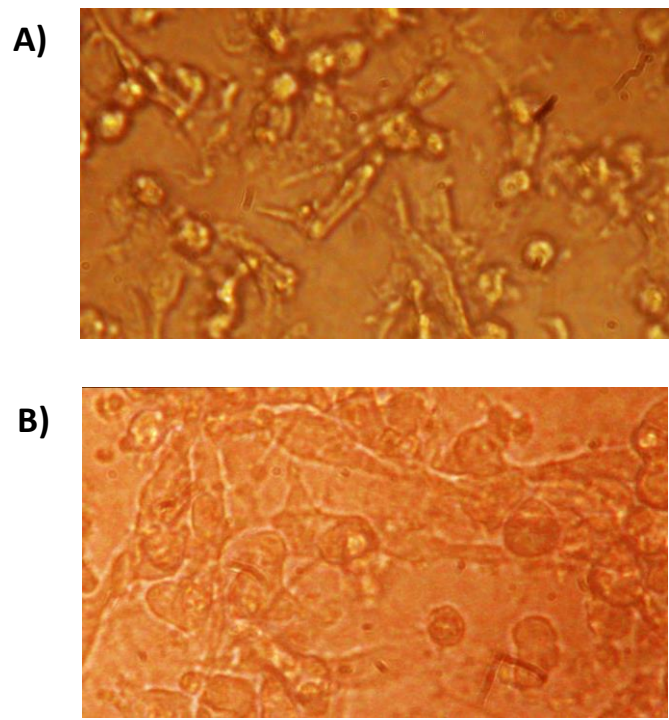
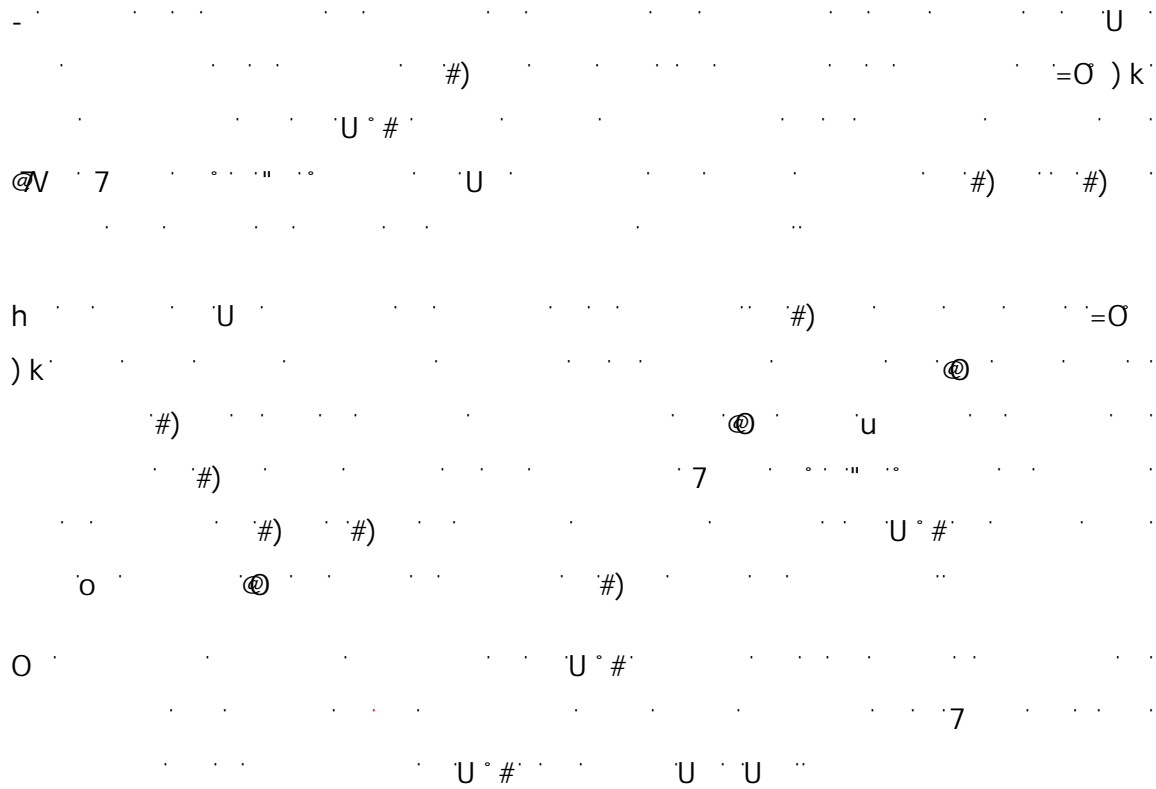


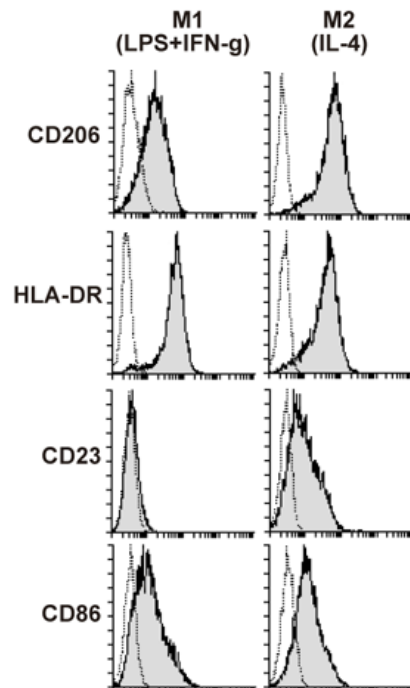
Figura 12: Morfología de los MAC polarizados a los perfiles M1 y M2.
*Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (30ng/ml), para generar MAC y por 3 días más en presencia de LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (400U/ml) para inducir fenotipo M1 ó en presencia de IL-4 (25 ng/ml) para inducir fenotipo M2. Se tomaron fotografías al final del período de polarización de los **A)** M1 y de los **B)** M2. Magnificación del*

original: 400X. Los resultados son representativos de 6-8 experimentos con resultados similares.

1.8.2. Cambios fenotípicos en los MAC polarizados hacia los perfiles M1 y M2.



A)



B)

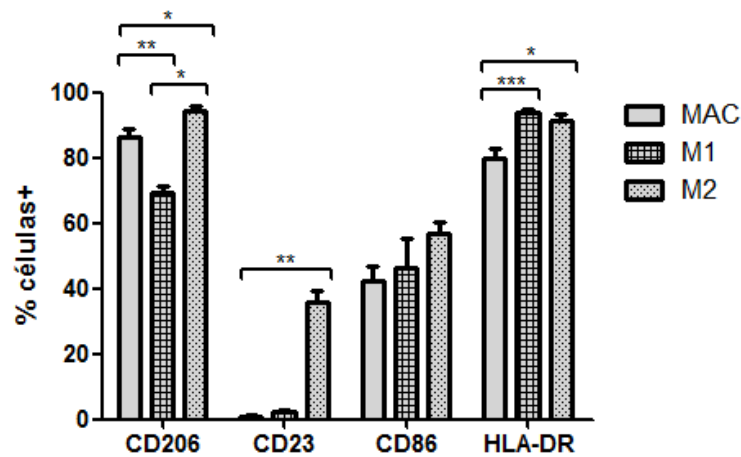


Figura 13: Fenotipo de los MAC polarizados a los perfiles M1 y M2.

Mo purificados fueron cultivados ($1 \cdot 10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (30ng/ml), para generar MAC y por 3 días más en presencia de LPS (100 ng/ml)+ IFN- γ (400U/ml) para inducir fenotipo M1 ó en presencia de IL-4 (25ng/ml) para inducir fenotipo M2. Los MAC fueron marcados a los 7 ó 10 días de iniciado el cultivo con: mAb anti-CD206 conjugado a FITC, mAb anti-CD23 conjugado a PE, mAb anti-CD86 conjugado a PCy5, mAb anti HLA-DR conjugado a FITC. Los análisis de expresión en superficie de CD206, CD23, CD86 y HLA-DR por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de las distintas poblaciones determinadas de acuerdo al SSC vs. FSC.

A) Se muestran histogramas representativos de la expresión en membrana de cada antígeno en los M1 y M2. Los histogramas punteados representan los controles de isotipo.

B) Porcentaje de células positivas para los distintos antígenos en los MAC, M1 y M2. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 6-10 dadores diferentes. La significancia estadística fue calculada mediante el test Kruskal Wallis ($p < 0,05$) y post-test Mann Whitney U para comparar diferencias entre dos grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

1.8.3 Expresión de CX₃CR1 en los MAC polarizados a M1 y M2

... Ono @V @

#E#k O

U

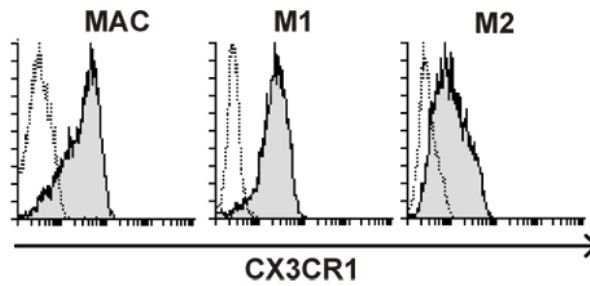
#E#k U #

U # U

#E#k

U # 7

A)



B)

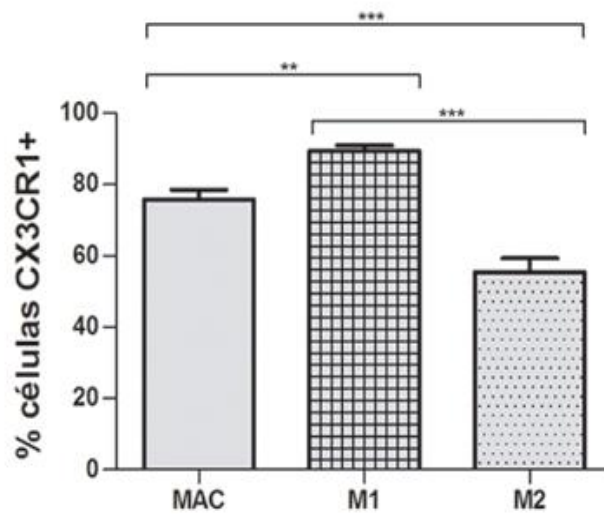


Figura 14: Expresión de CX₃CR1 durante la diferenciación y activación de los MAC.

Mo purificados fueron cultivados ($1 \cdot 10^6/ml$) durante 7 días en presencia de GM-CSF (30ng/ml), para generar MAC y por 3 días más en presencia de LPS (100 ng/ml)+ IFN- γ (400U/ml) para inducir fenotipo M1 ó en presencia de IL-4 (25 ng/ml) para inducir fenotipo M2. Los Mo frescos fueron marcados inmediatamente ó a los 7 ó 10 días de iniciado el cultivo con: mAb anti-CX₃CR1 conjugado a FITC. Los análisis de expresión en superficie de CX₃CR1 por citometría de flujo se llevaron a cabo en la región de las distintas poblaciones determinadas de acuerdo al SSC vs. FSC.

A) Se muestran histogramas representativos de la expresión en membrana de CX₃CR1 en los MAC, M1 y M2. Los histogramas grises y punteados representan los controles de isotipo.

B) Porcentaje de células positivas para CX₃CR1 en MAC, M1 y M2. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 6-10 dadores diferentes. La significancia estadística fue calculada mediante el test Kruskal Wallis ($p < 0,001$) y post-test Mann Whitney U para comparar diferencias entre dos grupos. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

#CE#k

U ° #

1.9 Expresión de CX₃CR1 a nivel RNA en Mo y poblaciones derivadas.

o ku h#k
 kV° #CE#k U U
)# @ 8U #o7 @ 8U #o7 @)U @)U
 U U° # 8U #o7 o primers
 h#k
 7 O kV°
 h#k
)V°
 8° h) = -

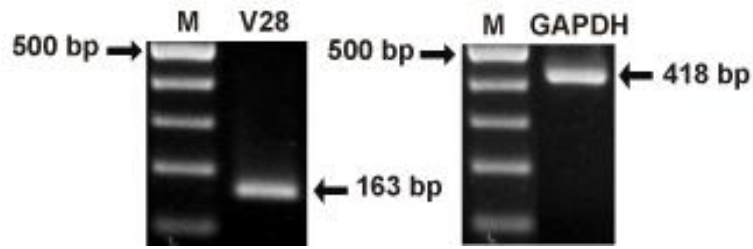
" U #CE#k kV° O
 kV° #CE#k U° #
)U # 7 " U° # 8U #o7
 kV° #CE#k
 U h)U @ @
 U U° # o kV° #CE#k
)U U

- #CE#k

. kV° #CE#k

h U° # #CE#k
 kV° - Ono @V
 #CE#k @
 kV° #CE#k 7 " O
 U° #
 @)U - kV°
 U @

A)



B)

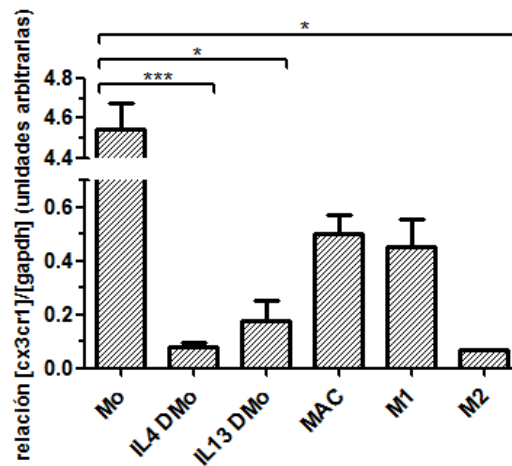


Figura 15: Expresión de mRNA para CX₃CR1 en Mo y durante la diferenciación de los MAC y DC.

Mo purificados fueron cultivados ($1 \cdot 10^6$ /ml) durante 7 días en presencia de GM-CSF (30ng/ml) para generar MAC ó por 3 días en presencia de GM-CSF (50ng/ml) + IL-4 ó IL-13 (20ng/ml) para generar DMo. Los MAC a su vez, fueron estimulados por 3 días más en presencia de LPS (100 ng/ml)+ IFN- γ (400U/ml) para inducir fenotipo M1 ó en presencia de IL-4 (25 ng/ml) para inducir fenotipo M2. El RNA total fue aislado de Mo frescos o luego del cultivo en los tiempos especificados.

A) Se muestra la especificidad de los primers. Los productos PCR obtenidos fueron corridos electroforéticamente en un gel de agarosa 2% y visualizados por tinción con Bromuro de Etidio. M es un marcador de peso molecular de DNA (Ladder 100).

B) Se analizó la expresión de mRNA para CX₃CR1 mediante RT-PCR en tiempo real. Para la normalización de los datos se utilizó GAPDH. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 3-5 muestras procedentes de donadores diferentes, cada uno medido por cuadruplicado. La significancia estadística fue calculada mediante el test Kruskal Wallis ($p < 0,001$) seguido por test de multicomparación de Dunn. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

u U
#k
#k h
#k U U #
) #

1.10 Significado biológico de las diferencias de expresión en las poblaciones monocíticas

7 #k
U #O U
) # U # #k #O
U U
overnight #O
7) O #O
..

y) V
h@ † 7
" h U †
h@ †
#O 7 " o
) # overnight #O 7 "
U # #O
7 " -
#O
U

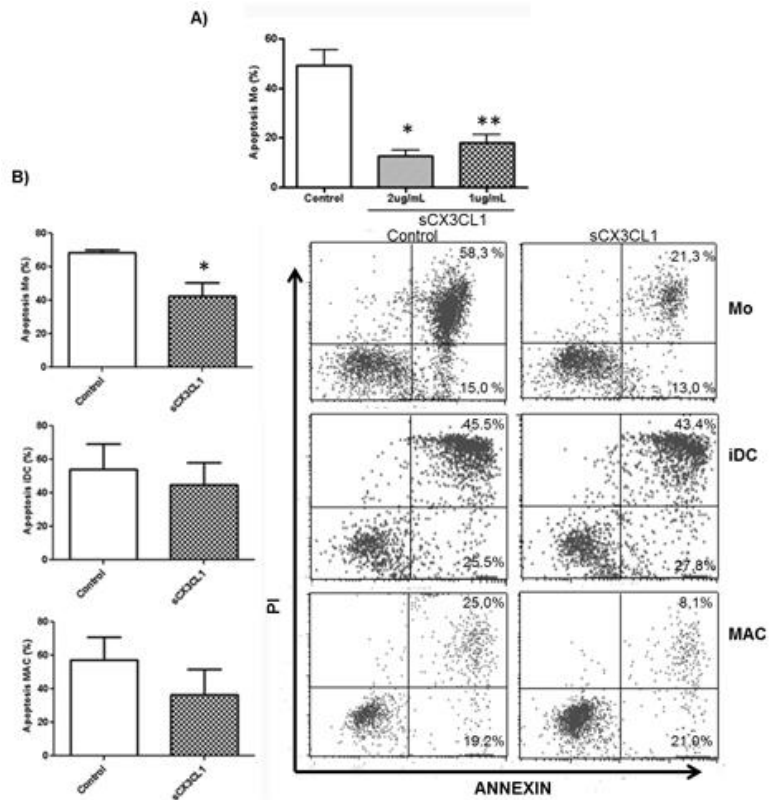


Figura 16: Efecto de CX₃CL1 soluble (sCX₃CL1) en la tasa de apoptosis de Mo, MAC y DC

A) Los Mo fueron cultivados en medio con o sin (control) sCX₃CL1, a la concentración indicada por 24hs a 37°C. La apoptosis fue mediada por microscopía de fluorescencia. Cada barra representa el promedio del porcentaje de células apoptóticas ± SEM de 3-5 dadores diferentes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, de acuerdo a Kruskal Wallis ($p < 0,005$) seguido por test Mann Whitney U, comparando sólo contra el control **B)** La apoptosis de Mo, iDC o MAC fue medida en paralelo por citometría de flujo. Se muestran gráficos de puntos representativos de PI vs Anexina-V de Mo, iDC y MAC incubados en medio con o sin (control) sCX₃CL1 (1 ug/mL), 24hs a 37°C. Cada barra representa el promedio ± SEM de células Anexina-V⁺ para cada población de 3 dadores diferentes. * $p < 0.05$, de acuerdo al test Mann Whitney U.

Capítulo II

**SEÑALES INTRACELULARES Y MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA MODULACION
DEL RECEPTOR CX3CR1 POR CITOQUINAS**

2. Señales intracelulares y mecanismos involucrados en la modulación del receptor CX₃CR1 por citoquinas

)
U U #) # #k
h) # @ @
8U #o7 #k @V Cho
o @V
h
U U # #k
U U # U @V Cho
#k U @
- @V
#k @ @
h #k
U
#k
kV @V @ @

2.1 Expresión de CX₃CR1 en Mo a las 18hs de cultivo en presencia de citoquinas.

o #k U
@V @ @
U
#k # U
@V U o
@ @
#k U
h U
@ @V @ @V

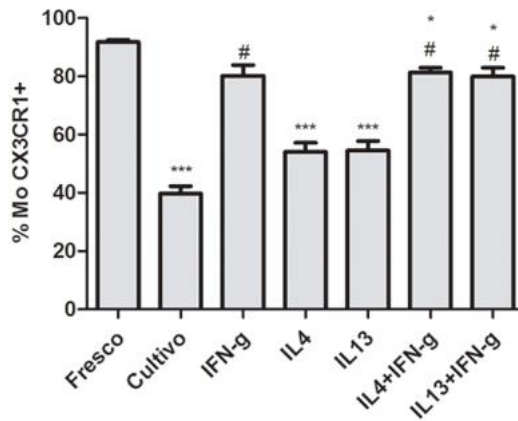


Figura 17: Efecto de distintas citoquinas sobre la pérdida de CX₃CR1 durante el cultivo.

Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 18hs con medio completo sólo o suplementado con IFN- γ (500U/ml); ó IL-4/IL-13 (50ng/ml) solas o en combinación con IFN- γ . Luego, se analizó la expresión de CX₃CR1 y CD14 mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de células CX₃CR1⁺ dentro de la región de células CD14⁺. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 10-17 dadores. La significancia estadística fue calculada por test de Kruskal Wallis ($p < 0,0001$), seguido por test para multi-comparaciones de Dunn. *** $P < 0,001$ significativo comparado con el Fresco; # $p < 0,001$ significativo comparado con el Cultivo; * $p < 0,05$ significativo comparado con IL-4.

2.1.1 Expresión de CX₃CR1 en Mo pre-incubados con IL-4 o IL-13 y estimulados con IFN- γ .

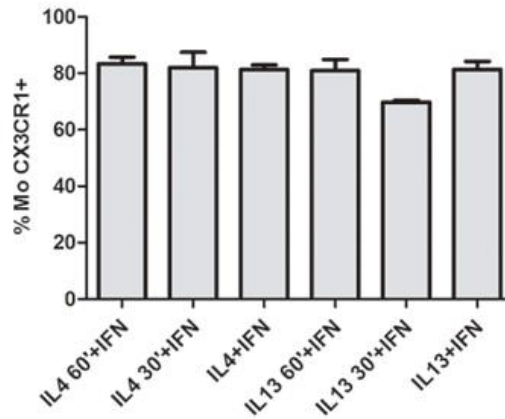


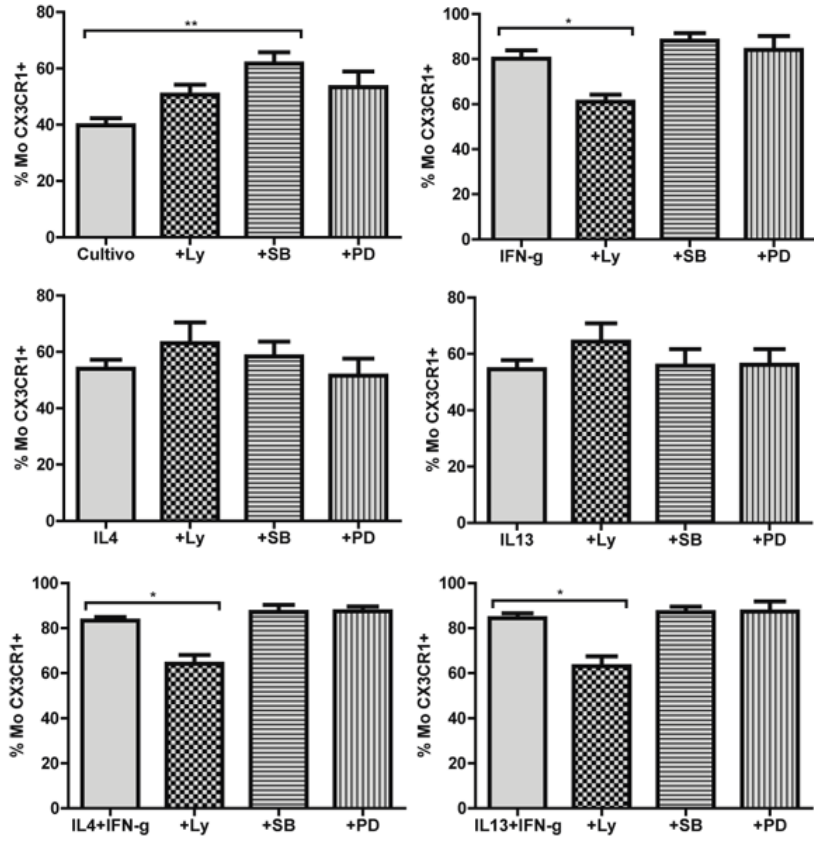
Figura 18: El pre-tratamiento con IL-4 o IL-13 no bloquea el efecto del IFN- γ sobre la expresión de CX₃CR1.

Mo purificados ($1 \cdot 10^6/ml$) fueron pre-incubados con IL-4/IL-13 (50ng/ml) durante 30-60 min y luego cultivados con IFN- γ (500U/ml) por 18hs. Luego, se analizó la expresión de CX₃CR1 y CD14 mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de células CX₃CR1⁺ dentro de la región de células CD14⁺. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 3-5 dadores. Las diferencias entre las barras resultaron ser ns con el test de Kruskal Wallis.

2.2 Estudio de las señales intracelulares involucradas en la modulación de CX₃CR1.

2.2.1 Efecto de los inhibidores de quinasas sobre la modulación del CX₃CR1 por citoquinas.

A)



B)

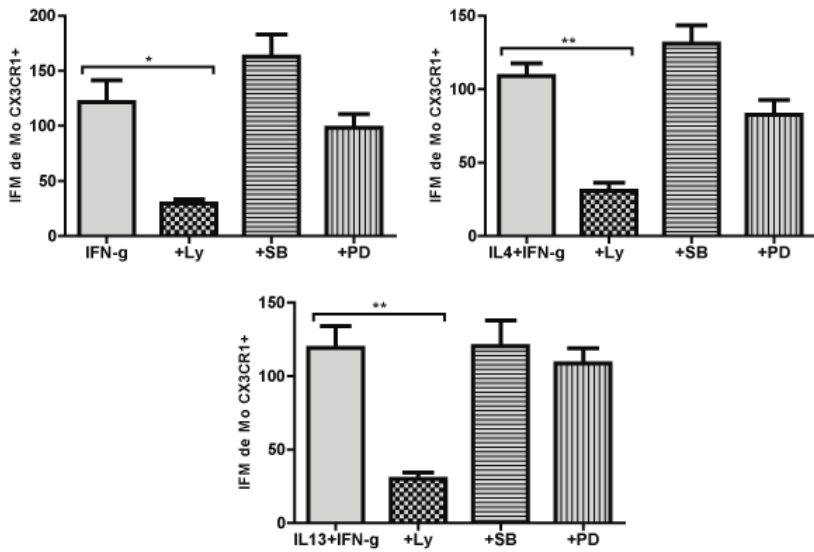


Figura 19: Efecto de inhibidores de PI3K y MAPKs (p38 y ERK) sobre la expresión de CX₃CR1 de Mo tratados o no con citoquinas.

Se preincubaron Mo ($1 \times 10^6/ml$) durante 1h con distintos inhibidores de quinasas: (LY294002, $25\mu M$; SB20358, $30\mu M$; PD98059, $20\mu M$) y luego se cultivaron durante 18hs en medio de cultivo ó en presencia de IFN- γ ($500U/ml$) ó IL-4/IL-13 ($50ng/ml$) solas o en combinación con IFN- γ . A continuación, se analizó la expresión de CX₃CR1 y CD14 mediante citometría de flujo. **A)** Los resultados se expresan como el porcentaje de células CX₃CR1⁺ dentro de la región de células CD14⁺. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 4-15 dadores. La significancia estadística fue calculadas mediante el test de Kruskal Wallis ($p < 0,05$ en todos menos en IL-4 e IL-13, que fue ns), seguido de test de Dunn. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, comparados con el respectivo control sin inhibidor. **B)** Cada barra representa el promedio \pm SEM, de la intensidad de fluorescencia de 4-15 dadores. La significancia estadística fue calculadas mediante el test de Kruskal Wallis ($p < 0,01$), seguido de test de Dunn. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con su respectivo control sin inhibidor.

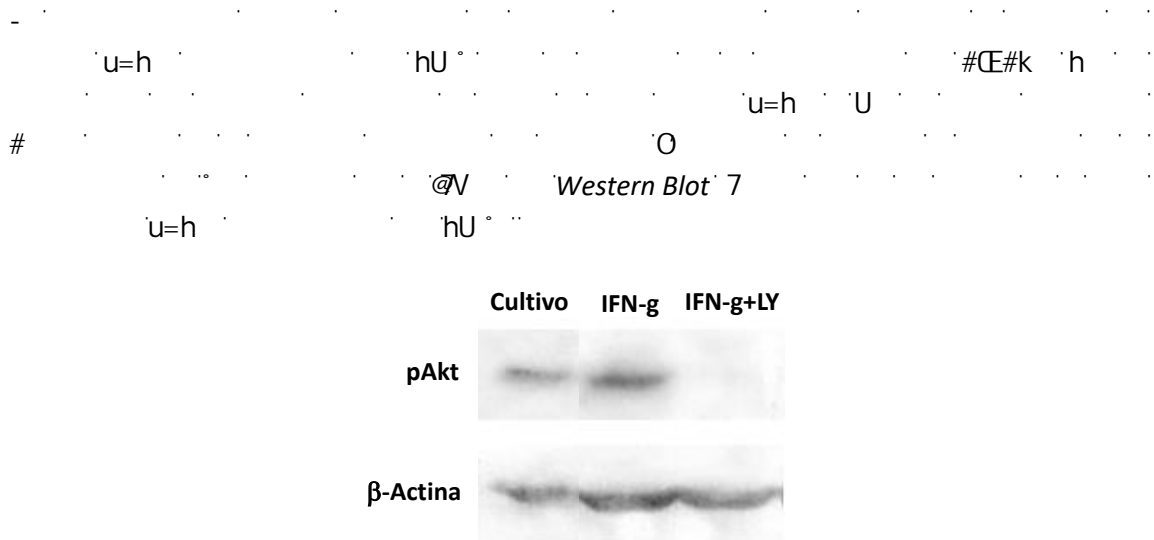
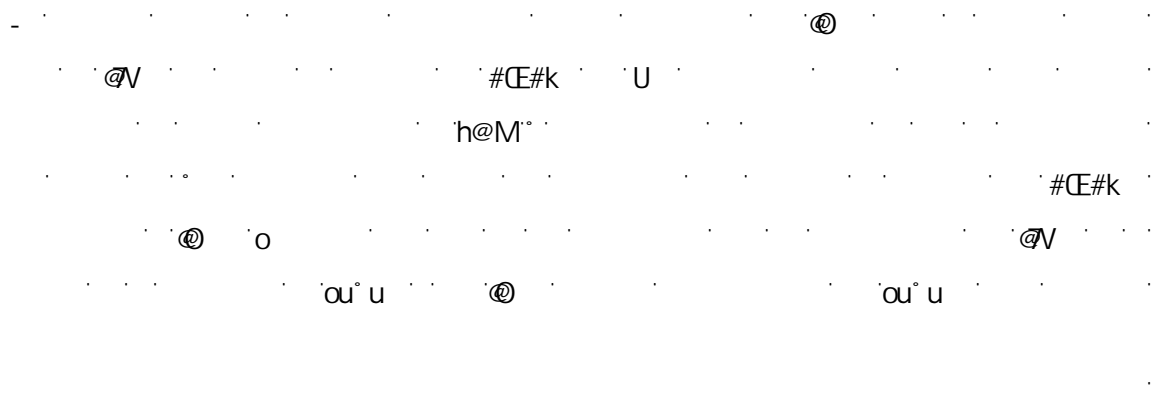


Figura 20: El IFN- γ es capaz de inducir la fosforilación de Akt y este efecto es bloqueado por el inhibidor de la PI3K, LY294002.

Las células monocíticas THP-1 ($1.10^6/ml$) fueron diferenciadas durante 48hs con PMA ($5 ng/ml$), luego se pre-incubaron con medio ó con LY294002 ($25uM$), y luego con IFN- γ ($500U/ml$) durante otros 60 min. Finalmente, se prepararon extractos proteicos para analizar la fosforilación de Akt, mediante inmunoblotting, según lo descrito en Materiales y Métodos.

2.2.2 Estudio de las señales río debajo de Akt asociadas con la modulación del CX₃CR1



Western Blot

7

u)

@V

#E#k h

ou° u u O 7

@V ou° u u

O

@V @ #E#k ou° u

u

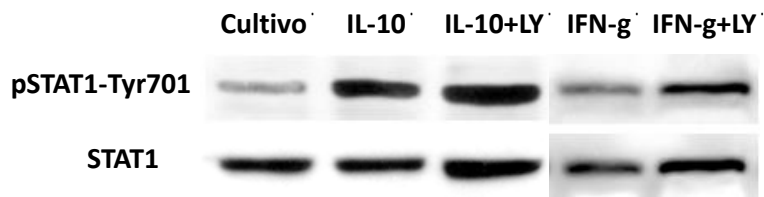


Figura 21: Análisis de fosforilación de STAT1 y STAT3 por citoquinas en Mo

Las células THP-1 ($1 \times 10^6/ml$) fueron diferenciadas durante 48h con PMA (5ng/ml) y luego se analizó la fosforilación de STAT1 en Tyr. Para ello se incubaron por 30 min con medio ó con LY294002 (25uM), y luego se estimularon con IFN- γ (500U/ml) ó IL-10 durante otros 30 min. Finalmente, se prepararon extractos proteicos para analizar la fosforilación de STAT1 en Tyr-701, mediante immunoblotting, según lo descrito en Materiales y Métodos.

=

u o

#E#k h

@V @

ou° u)

ou° u o

U

ou° u

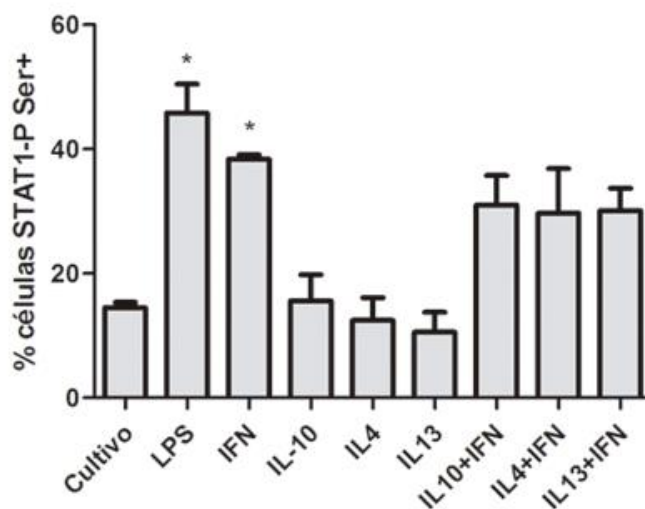


Figura 22: STAT1 es fosforilado en Ser-727 en respuesta al tratamiento con IFN- γ .

Los Mo purificados ($1 \cdot 10^6/ml$) fueron cultivados por 2hs en medio RPMI 5% SFB y luego estimulados en presencia de LPS ($1 \mu g/ml$); ó IFN- γ (500 U/ml); y/o IL-10 (10ng/ml); y/o IL-4/IL-13 (50ng/ml). A los 30 min post-estimulación las células fueron fijadas y permeabilizadas como se describe en Materiales y Métodos. Se analizó la fosforilación de STAT-1 en Ser-727 mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas dentro de la región de los Mo. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 3-4 dadores. La significancia estadística fue calculada mediante test de Kruskal Wallis ($p < 0,01$), seguido de test de Dunn comparando todos los tratamientos contra el cultivo. * $p < 0,05$.

2.2.3 Fosforilación de STAT1 Ser en Mo pre-incubados con el inhibidor de la PI3K

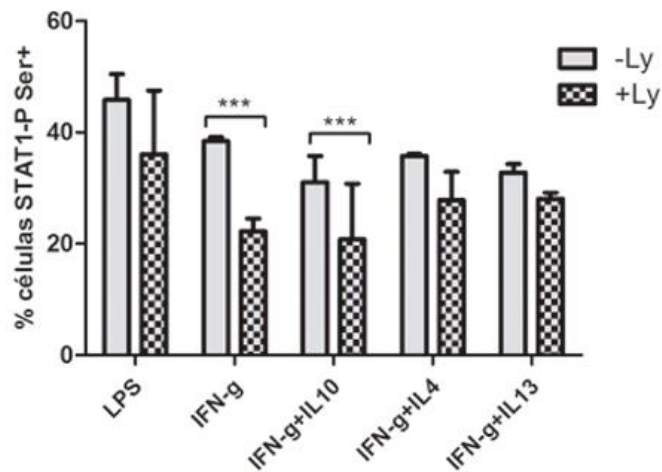


Figura 23: El pre-tratamiento con LY294002 inhibe la fosforilación de STAT1 en Ser-727 en respuesta al IFN- γ .

Los Mo purificados ($1 \cdot 10^6$ /ml) fueron cultivados por 1h en medio RPMI 5% SFB y luego fueron pre-incubados durante 1h con el inhibidor de la PI3K (LY294002; $25 \mu\text{M}$). Posteriormente fueron estimulados en presencia de LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$); ó IFN- γ (500 U/ml) sólo o en combinación con IL-10 ($10 \text{ng}/\text{ml}$); ó IL-4 ó IL-13 ($50 \text{ng}/\text{ml}$). A los 30 min post-estimulación las células fueron fijadas y permeabilizadas como se describe en Materiales y Métodos. Se analizó la fosforilación de STAT-1 en Ser-727 mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas dentro de la región de los Mo. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 3-4 dadores. La significancia estadística fue calculada por test Mann Whitney U. *** $p < 0,001$ comparado con su respectivo control sin inhibidor.

2.3 Estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de CX₃CR1 por las citoquinas

o y y U

U #h

#CE#k - #CE#k

-

kV°

- kV° #CE#k

h

) V° @

kV° h" U #

h @ @

@V #CE#k

2.3.1 Expresión del mRNA para CX₃CR1 en Mo estimulados con citoquinas

@

CX₃CR1

#

† # †

U #

kV° #CE#k

primers †

o @

@V #CE#k

U @ @ o

#

kV° #CE#k 'ku h#k

† U @V

@ @ @ @V #

kV° '8 h) = # 7

@ kV°

U V

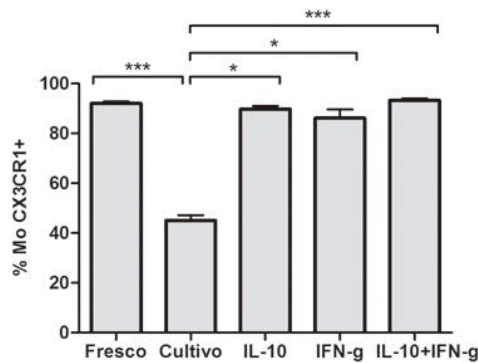
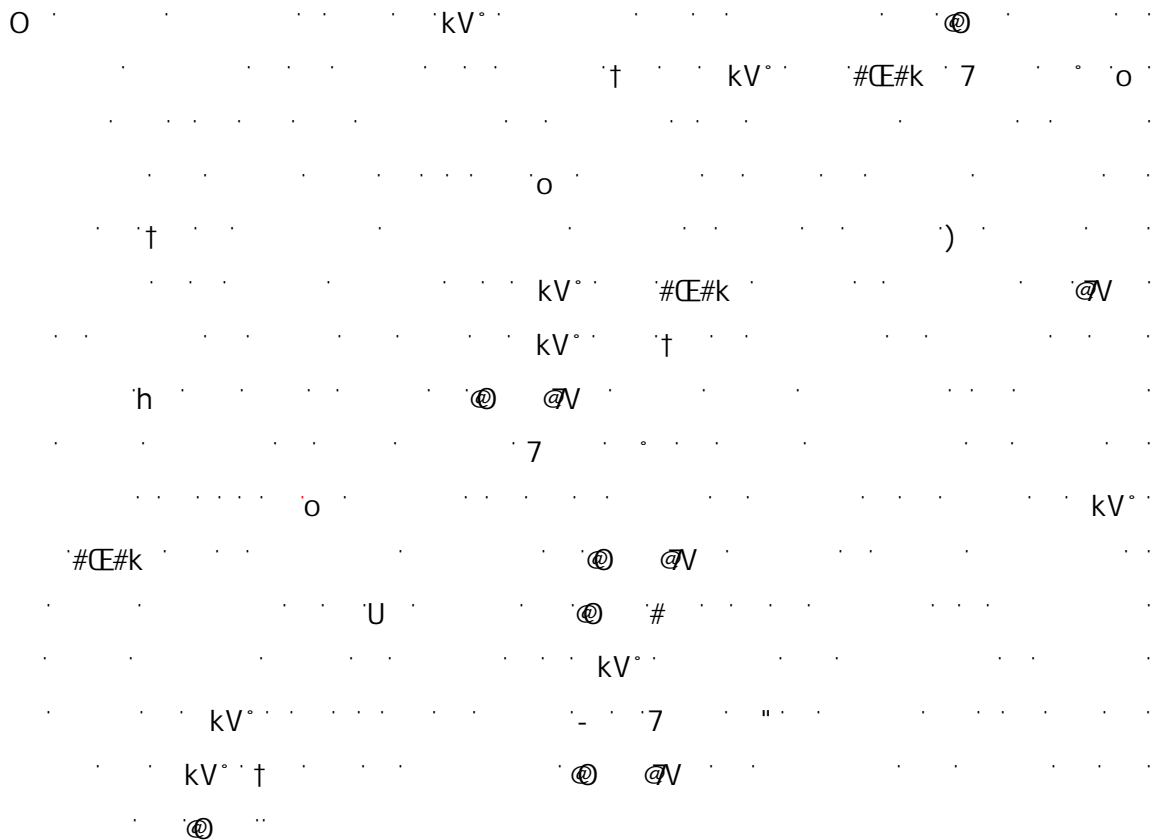
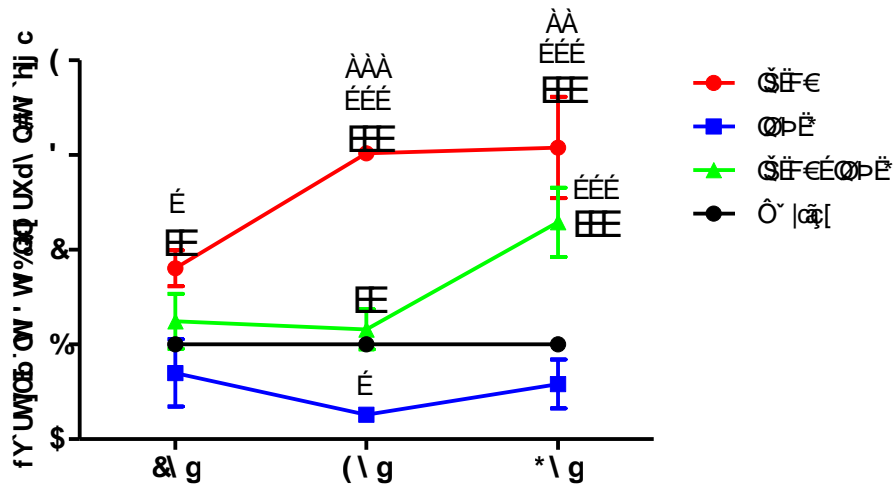


Figura 25: Expresión de CX₃CR1 en membrana a las 18hs de cultivo, en Mo tratados del IFN-γ y/o IL-10.

Mo purificados fueron cultivados ($1.10^6/ml$) durante 18hs con medio completo sólo o suplementado con IFN- γ (500 U/ml) y/o IL-10 (10 ng/ml). Luego, se analizó la expresión de CX₃CR1 y CD14 mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de células CX₃CR1⁺ dentro de la región de células CD14⁺. Cada barra representa el promedio \pm SEM de 6-8 dadores. La significancia estadística fue calculada mediante test de Kruskal Wallis ($p < 0,001$), seguido de test de Dunn. * $p < 0,05$ y *** $P < 0,001$ significativo comparado con el Cultivo.



A)



B)

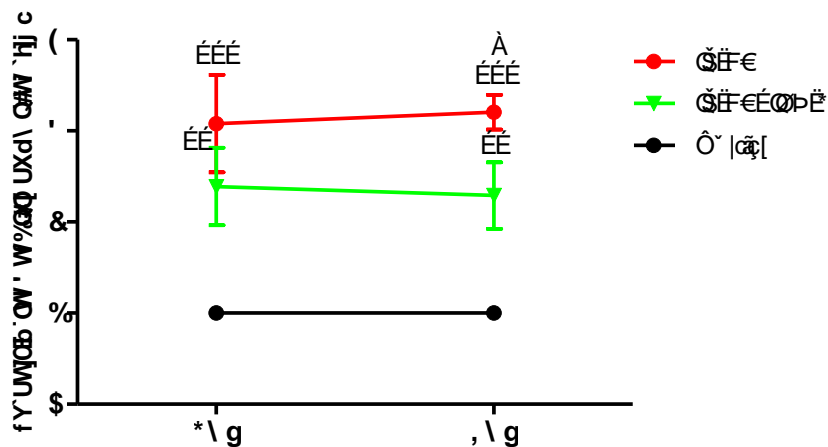


Figura 26: Expresión de la variante V28 del mRNA para CX₃CR1 en Mo estimulados con citoquinas.

Los Mo purificados ($1 \cdot 10^6$ /ml) fueron cultivados por: **A)** 2, 4 o 6hs en medio RPMI 10% SFB sólo o suplementado con IFN- γ (500U/ml) y/o IL-10 (10ng/ml); **B)** 6 u 8hs en medio RPMI 10% SFB sólo o suplementado con IL-10 (10ng/ml) sola o en combinación con IFN- γ (500 U/ml). A los distintos tiempos, las células fueron lavadas y se les extrajo el RNA total como se describe en Materiales y Métodos. Se analizó la expresión de mRNA para V28 y GAPDH por RT-PCR en tiempo real. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias, en donde la cuantificación del mRNA para CX₃CR1 fue corregida con GAPDH, y luego los resultados fueron relativizados al control sin estimular (cultivo). Cada símbolo representa el promedio \pm SD de 3-

4 experimentos realizados por cuadruplicado. ** $p < 0,01$ comparado con IFN- γ ; *** $p < 0,001$ comparado con IFN- γ ; + $p < 0,05$ comparado con el Cultivo; ++ $p < 0,01$ comparado con el cultivo; +++ $p < 0,001$ comparado con el cultivo; # $p < 0,05$ comparado con IL-10+IFN- γ ; ## $p < 0,01$ comparado con IL-10+IFN- γ ; ### $p < 0,001$ comparado con IL-10+IFN- γ .

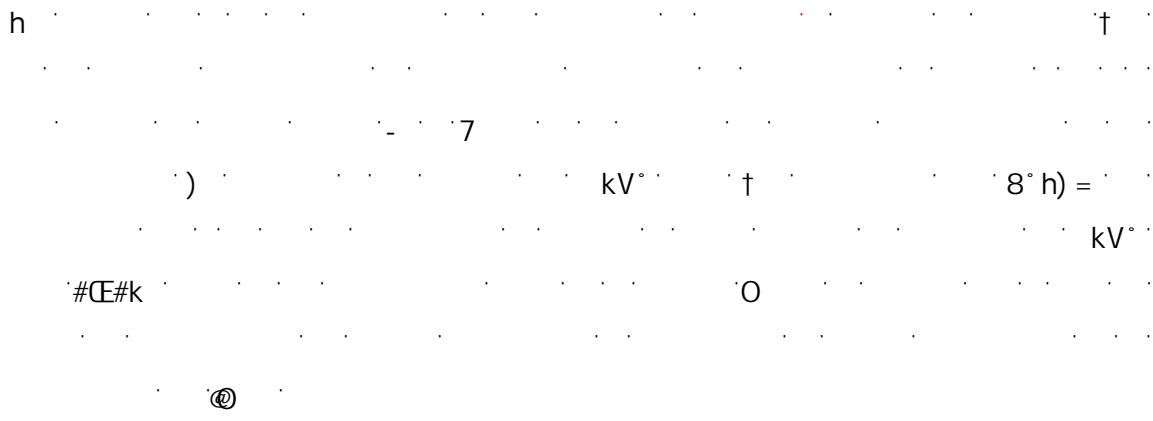
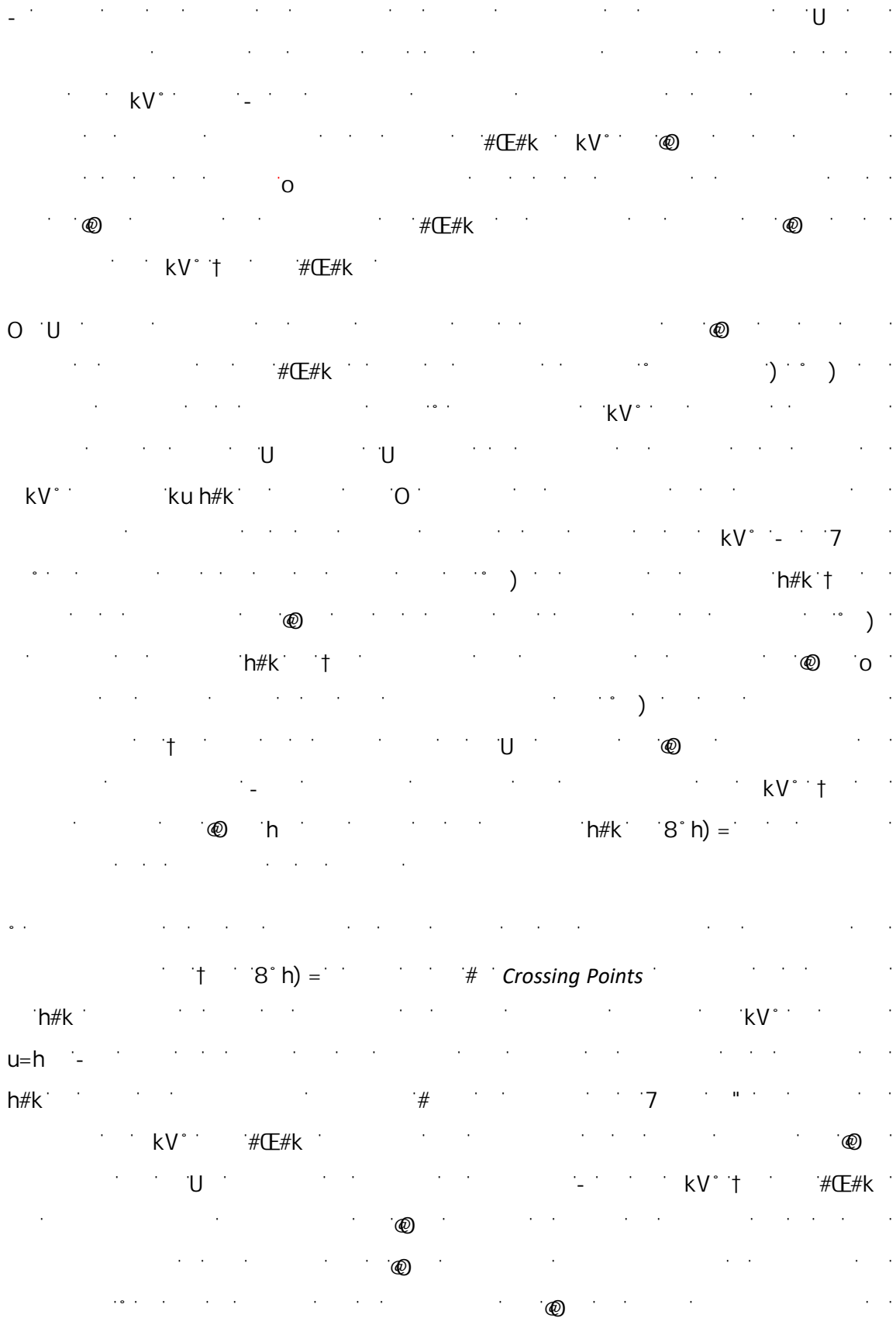


Figura 27: Determinación del máximo en la expresión de la variante V28 del mRNA para CX₃CR1 en Mo estimulados con citoquinas.

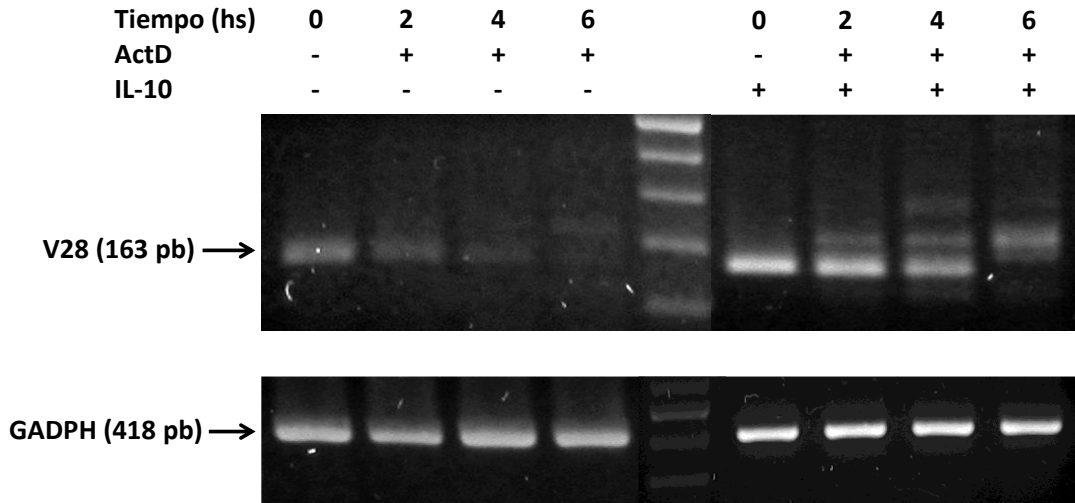
Los Mo purificados ($1 \cdot 10^6$ /ml) fueron cultivados por 2 o 4hs en medio RPMI 10% SFB sólo o suplementado con IFN- γ (500 U/ml) y/o IL-10 (10ng/ml). A los distintos tiempos, las células fueron lavadas y se les extrajo el RNA total como se describe en Materiales y Métodos. Se analizó la expresión de mRNA para V28 y GAPDH por RT-PCR en tiempo real. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias, en donde la cuantificación del mRNA para V28 fue corregida con GAPDH. Experimento representativo: cada símbolo representa el promedio \pm SD de 1 experimento realizado por cuadruplicado.

2.3.3 Mecanismo a través del cual la IL-10 induce aumento del mRNA para CX₃CR1

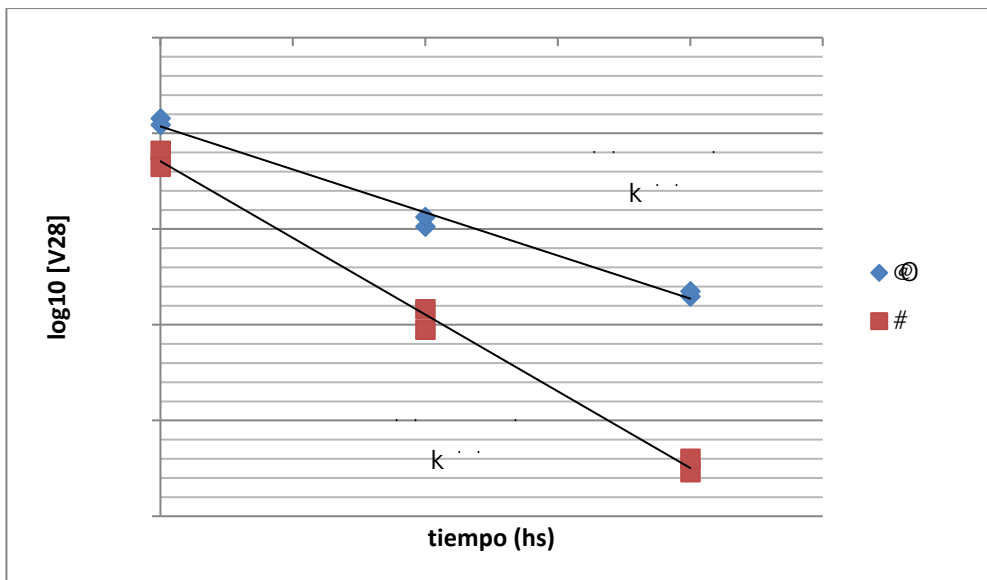


kV° 8° h) =
 #
 #CE#k
 #CE#k

A)



B)



c)

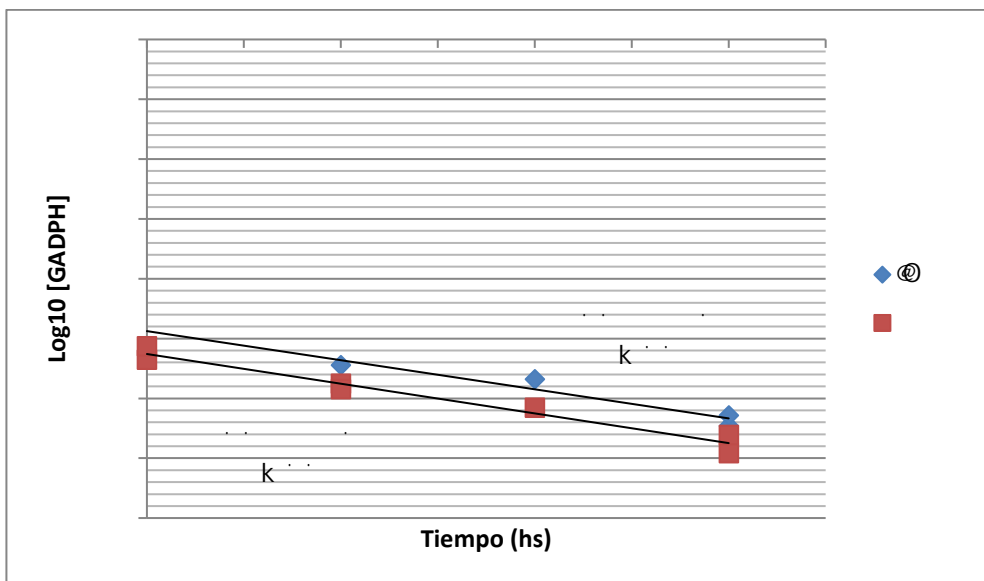


Figura 28: Cálculo de la vida media de los transcritos V28 y GAPDH en células en cultivo o tratadas con IL-10.

Los Mo purificados ($1 \cdot 10^6$ /ml) fueron cultivados por 2hs en medio RPMI 10% SFB sólo o suplementado con IL-10 (10ng/ml). Transcurrido ese tiempo o bien se extrajo el RNA o se las trató con ActD (1ug/ml). A los tiempos indicados (2, 4 o 6hs), las células fueron lavadas y se les extrajo el RNA total como se describe en Materiales y Métodos. Se analizó la expresión de mRNA para V28 y GAPDH por RT-PCR en tiempo real.

A) Los productos PCR fueron revelados en un gel de agarosa 2,5% con Bromuro de Etidio. Para determinar la especificidad de las bandas se corrió junto con las muestras, un marcador de peso molecular para DNA (ladder 100), cuya banda más intensa representa 500pb.

B y C) Se representaron los \log_{10} de las concentraciones de mRNA V28 (**B**) y GAPDH (**C**) en función del tiempo, en presencia de ActD. Las concentraciones fueron expresadas en unidades arbitrarias, en donde la cuantificación del mRNA para V28 y GAPDH se realizó mediante la curva de calibración obtenida para calcular la eficiencia de la reacción de PCR. Experimento representativo: cada símbolo representa el valor obtenido en un experimento realizado por duplicado.

Capítulo III

**DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN CX₃CR1 EN LA POBLACIÓN
PEDÍATRICA ARGENTINA Y PACIENTES CON SUH**

3. Determinación de polimorfismos del gen CX₃CR1 en la población pediátrica argentina y pacientes con SUH.

h
#CE#k U VM #CE#k
#CE#k

oy=

h
#CE#k t @ u U

h

#CE#k
oy= ou-# h
#CE#k

oy= #CE#k # oy=

oy= ou-# oy= @
ou-#

3.1 Criterios de selección de pacientes y obtención de las muestras biológicas

O = V o K
= V # " h - /
o

oy= --# ou-#
oy=

o U
7

Grupo SUH: O

oy=
oy=

ou-# o o o o
cho \ o

Grupo I-STEC: o

--# ou-# ou-#
o o o o
cho \ o oy =

Grupo control: V

)
) V° o) V°
u u

u # 7 8 "
o - #
oy =
- @ou-#

3.2 Obtención de los polimorfismos.

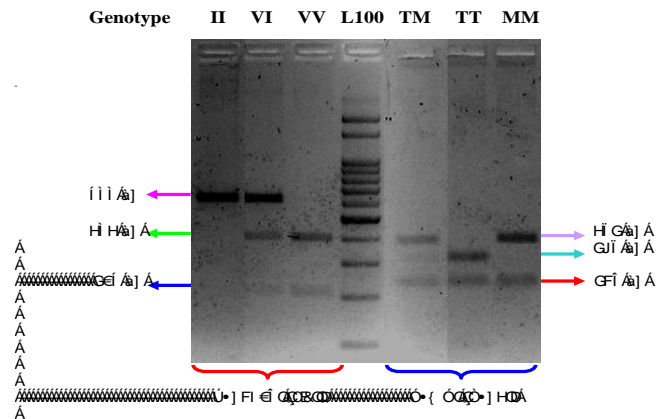
-
#E#k h#k

k70h Restriction Fragment Length Polymorphisms O

h#k
" "@ h

7 #
" # 7

A)



B)

	Digestión con Psp1406I		
Genotipo V249I	VV	VI	II
Bandas	205 y 383 pb	205, 383 y 588 pb	588

C)

	Digestión con BsmBI		
Genotipo T280M	TT	TM	MM
Bandas	75, 216 y 297 pb	75, 216, 297 y 372 pb	216 y 372 pb

Figura 29: PCR-RFLP representativo y descripción de los fragmentos de descripción

Se aislaron muestras de DNA de los diferentes grupos a partir de orina y luego se amplificó por PCR un fragmento de 588 pb que abarca los dos sitios polimórficos descritos. A continuación, los productos PCR fueron digeridos con enzimas de restricción cuyos sitios de restricción contienen los sitios polimórficos. Cuando aparece la mutación puntual que origina el polimorfismo por un cambio en la secuencia aminoacídica, se modifica el patrón de restricción normal de la enzima en el fragmento elegido. Los patrones de restricción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 2,5% teñido con Bromuro de Etidio (A). Con la enzima Psp1406I (AclI) se determinó el polimorfismo V249I. El fragmento de 588 pb con secuencia normal (V249) contiene un solo sitio de restricción para esta enzima y en una digestión completa, produce 2 fragmentos de 205 y 383 pb. Cuando el amplicón contiene la mutación (I249), el sitio de corte desaparece y el fragmento permanece sin digerir (A y B). Paralelamente, se determinó el polimorfismo T280M con la enzima BsmBI (Esp3I). Cuando el amplicón contiene la secuencia normal (T280), al ser digerido con esta enzima genera 3 fragmentos de 75, 216 y 297 pb. Sin embargo, cuando contiene la mutación (M280), uno de los sitios de corte desaparece y sólo se generan 2 fragmentos, de 216 y 372 pb (A y C). Cuando los genotipos son heterocigotas se observa la combinación de los patrones de restricción detallados para cada enzima tal como se describe en las partes B) y C).

3.3 Análisis general de los genotipos de la muestra estudiada

O

= † # o

† @ oy=

u U † @

† u @ u @ U - U

@ @

u

y

†† †@@ uu'uU 'UU †† uu†@u†@U '@u@

uU '@UU † u @ u @ U

3.4 Análisis individual de las frecuencias de los polimorfismos del CX₃CR1.

h

u V

oy= # O \k @ †@@ ††

U uU UU uu @ @

O

o

†@ oy= #

@

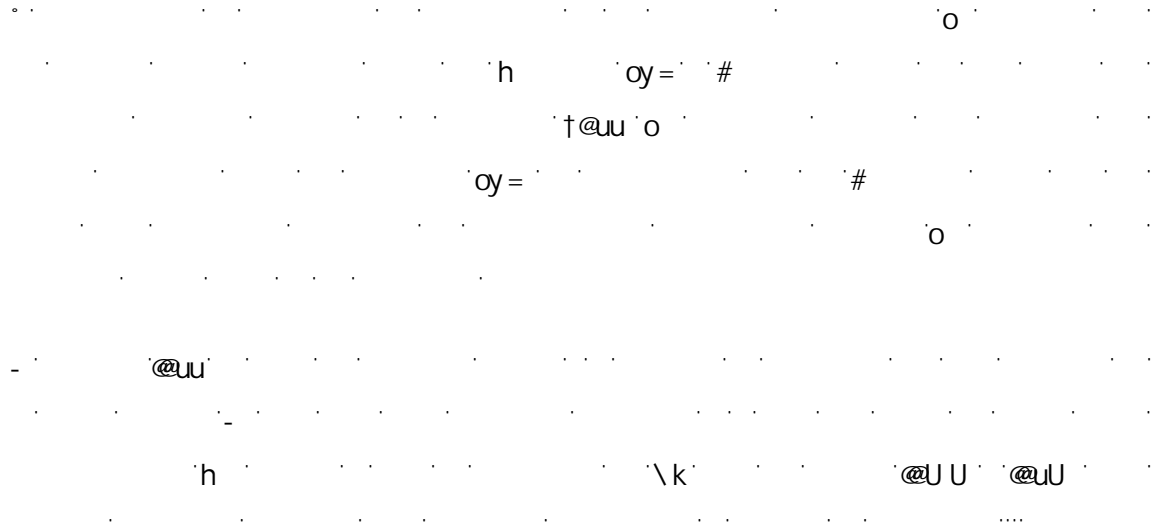
O

Dc`ja cfZga c' AA	; Ybcljdc' AA	7' fb1% &L'	GI < fb1- *L'	±GH97' fb1% L'	cXX'fUjcg' ..	d' ..	7' -) ..
XXJÁ AA	XXÁ XA CA	IFÁIÁDÁ IIÁHÉÁDÁ FIÁFÉÁDÁ	IÍÁJÉÁDÁ GÁGÁDÁ FGÁFGÉÁDÁ	FHÁIÁDÁ GAFÍÁDÁ EÁ	FÁ EHÁ FEEÁ	EÁ EHÁ FÁ	EÁ EHÁEHÁ EHÁIÁEHÁ
AA	Ú[cœ[^• ÁÁ Q^&^) &Á	IFÁIÁDÁ EHÁ	HUÁEHÁDÁ EHÁ	GAFÍÁDÁ EHÁ	EHÁ AA	EHÁ AA	EHÁEHÁEHÁ AA
VGÉÁ AA	VVÁ VTÁ TTÁ	JÍÁGÁDÁ HFÁGHÉÁDÁ IÁGÉÁDÁ	IÁJÁGÁDÁ GHÁGÁDÁ IÁGÁDÁ	FIÁGHÁDÁ FÁGÁDÁ EÁ	FÁ FEEGÁ EHÁ	EÁ FÁ FÁ	EÁ EHÁEHÁEHÁ EHÁEHÁEHÁ
AA	Ú[cœ[^• ÁÁ Q^&^) &Á	HÍÁGÁDÁ EHÁ	GÁGÁDÁ EHÁ	FÁGÁDÁ EHÁ	FÁ AA	FÁ AA	EHÁEHÁEHÁ AA

Tabla 1: Distribución de los genotipos en las poblaciones analizadas

Se muestran el número de individuos y los porcentajes. Los análisis se basaron en la determinación de los Odd Ratios (ORs) respecto al genotipo normal (VV y TT), como una medida asociación entre los genotipos CX₃CR1 y el SUH. La significancia de las asociaciones se evaluó con el test de Fischer.

3.5 Análisis de las frecuencias de los polimorfismos en genotipos combinados del CX₃CR1.

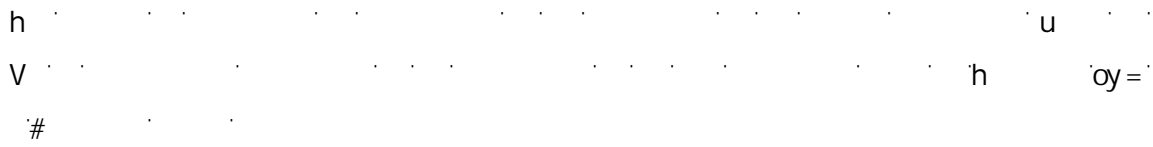


Genotipo	n (%)	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI	p-value
XX/VV	1 (100%)	1			1		
XG/VV	1 (100%)	1			1		
XG/TV	1 (100%)	1			1		
CG/TV	1 (100%)	1			1		
CG/VV	1 (100%)	1			1		
CG/TV	1 (100%)	1			1		
XG/TV	1 (100%)	1			1		
VT/TT	1 (100%)	1			1		

Tabla 2: Distribución de los genotipos combinados en las poblaciones analizadas

En esta tabla se muestran el número de individuos y los porcentajes. Los análisis se basaron en la determinación de los Odd Ratios (ORs) respecto al genotipo normal (VV-TT), como una medida asociación entre los genotipos CX₃CR1 y el SUH. La significancia de las asociaciones se evaluó con el test de Fischer.

3.6 Análisis de las frecuencias de los polimorfismos en haplotipos del CX₃CR1.



<Ud'chdc'	7'	Gl <'	≠GH97'	cXX'fUjcg'	d'	≠'-') i'
ÁÁ	fb1% &L'	fb1- *L'	fb1% L'
XG JÉV G €Á	FI Í ÁÇ FÁ DÁ	FI FÁÇ HÉ Á DÁ	G Í Ç HÁ DÁ	FÁ	ÉÁ	ÉÁ
ÁÇ JÉV G €Á	HÇ F GÁ DÁ	GÇ FÉÍ Á DÁ	FÁÇ HÉ Á DÁ	ÉÍ GÁ	ÉÍ Í Á	ÉÍ Í FÉÍ JÁ
Ç JÉÍ G €Á	I HÇ FÍ Á DÁ	H FÁÇ FÍ Á DÁ	FÁÇ HÉ Á DÁ	ÉÍ Í Á	ÉÍ Á	ÉÍ Í FÉÍ Í Á

Tabla 3: Frecuencias de los haplotipos en las poblaciones analizadas

En esta tabla se muestran el haplotipos y los porcentajes. Los análisis se basaron en la determinación de los Odd Ratios (ORs) respecto al haplotipo normal (V249-T280), como una medida asociación entre los genotipos CX₃CR1 y el SUH. La significancia de las asociaciones se evaluó con el test de Fischer.

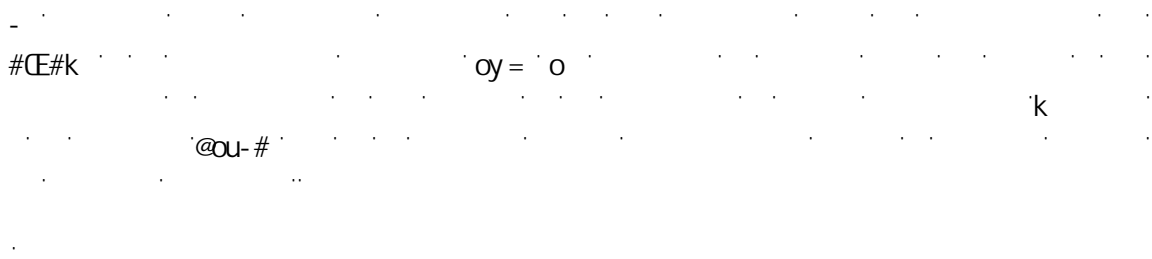


Figura 30. Modelo de consentimiento informado

≠B: CFA57-é B' D5 F5' 9@ D57-9BH9' M AC89@C' 89' 7CBG9BH-A-9BHC'
≠B: CFA58C'

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO EN EL RECEPTOR PARA FRACTALQUINA Y LA ASOCIACIÓN CON EL RIESGO DE DESARROLLAR EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) POSTERIORMENTE A LA INFECCIÓN CON BACTERIAS STEC

Á
 Á
 @ ; 5F9G'89'F95 @N57-é B'
 Á
 W P O O O O O A P O Z U U S U O C E P U U U U Q C S A O O P O U O C S A O O A P Q U U A U O O O U U A O S Q C E S O O A Á
 S O U U C E U U O W A O O A T W P U S U O C E A O O O O T O A P O O W P O C S A O O A T O O O O C E M A

C6>9HJC'
 O|Á q á i[{ ^Á |. { æ| Á@ { [|üæ| Á•Á } æÁ } -{ ^áæÁ |æ^Á ~ ^Áæ^ &ææÁ |æÁ } &æ) Áá^Á
 [| •Á á i[] ^• ÉÁ | | ç[&ææç | æá } ^• Á } ÁæÁ æ * ^Á | ~ áæ } á[Á | ^• ^ } æÁ (æ á • æá } ^• Á
 } ^ | | 5* ææ Éæ æá æææ Á Á^ Á d[• Á | * æ [• ÉÁ
 Á
 O) ÁæÁ | æ) Á æ [| üæÁ | • Áæ [• Á • á Á | | ç[&æ| Á | | Á } æáæç | æÁ | æ ææ Escherichia
 coliÁ ~ ^Á | | á &^Á } æç çá æ | æ æææç çá æÁ @ æ Q V O O D A S æá * ^ • çæ) Áá^Á æá ^ } ç • Á
 &| } æ ç æá [• Áç } Á • æáæç | æÁ Áææææ) Áá^Á ~ Áç çá æ | | ç[&æÁ } Á | • Á á i[• Á } æÁ
 áæ | ^ ææ [• æ æ * ç [| ^ } ææ) Á } Á É Á Áá^Á • ç • Á á i[• ÉÁ æá ~ ^ &æ) Á æ d[ç • ç á æÁ
 ^ ç [| &á } ææÁ | | æ Á • á c. { ææ ÉÁ | • Á • ^ ç | æ Á Áç { | | æ Á ~ ^ Áæ &æ) Áá^Á æ | • Á
 5 | * æ [• ÉÁ ~ } áæ ^ } æç ^ } ç Á | Á á i 5) ÉÁ } [&ææ& { [Á U q á i[{ ^Á V .. { æ| Á P ^ { [|üæ| Á
 Q J W P D A
 Á Á Á
 O|Á | à b ç [Áá^Á • ç Á • ç áá Á • Á &| } [& | Á æç | ^• Á * ^ } .. çæ | Á ~ ^ Á • ^ Áæ [&æ) Á &| } Á | Á
 á • æ | | | Áá^Á U W P É Á ~ ^ Á | | { ææ) Á | ^ á ^ &á ÁæÁ ç [| &æ) Áá^Á á i[Áæ) æ çá Áá^Á æá æ | ^ æá

Discusión y Conclusiones

O · · · · · #CE#k #CE#O · · · · ·
· · · · · U · · · · ·)
· · · · · #CE#O · · · · ·
· · · · · #CE#O · · · · · U ·
· · · · · #CE#O #CE#k ·
· · · · ·
· · · · · #CE#k #CE#O · · · · ·
· · · · · U · o · · · · · #CE#k ·
· · · · · # · · · · ·
· · · · · #CE#O · · · · · #CE#k ·
· · · · · kV° U · U° #) # · U ·

O U · · · · ·
· · · · · U° #) # -
· · · · · U ·
· · · · · O · U ·
· · · · · o ·
· · · · · U · #) #) · U · #) #)
· · · · · #CE#k · #) #)
· · · · · o ·
· · · · · U · #) #)
· · · · ·
· · · · · U · #CE#k ·

· · · · ·
· · · · · U · #CE#k O U ·
· · · · ·) # · © 8U #o7 · © 8U #o7 ·
· · · · · #CE#k ·
· · · · · #CE#k ·
· · · · · #CE#k · U ·
· · · · · U) # ·) U -
· · · · · #CE#k ·) U ·

U
#k) #
#) #)
#)) #
#) U = # @ = O) k -
) # o #k
U
O) # @V
Ono #k O
= O) k #)
#) @V
#k) #
) #
=) #
- #k) #) #
) #
overnight U y @V
#k U o #k
@V
#) O'uV7 @ # 8\) V
uV7 α @ @ β h8- o
#k) #
o kV° #k) #
#kO
) #
#kO
#) O #k

##k

)#

##k

U @ β ##k

)#

O

#CE#k)#

kV° #CE#k

)#

)#

@

#CE#k

V

)#

#CE#O #CE#k O

#CE#k)#

U

k

#CE#k

)#

U°#

#CE#k

U

)# -

U

kV° o

U U°#

#)

#)

##k

U U°#

8U #o7

O

U°#

@V

Ⓢ Ⓢ

U°#

8U #o7

U°#

U U #o7

U

U°#

8U #o7

#) #) #)

U #07 U ° # #) #) #)
o U ° # @V @ @

U U

8U #07 U #07 U
U 8U #07 U #07
U #07 U ° #

U ° #
#CE#k o #CE#k
@V Ono U
@ U

U #CE#k
#) =0) k o
U
kV° #CE#k -

kV° U
@V Ono h
kV°

U
#CE#k
@ O #CE#k
U #)
@- #) U
#) =0) k
#) #)

u U
@V @ #CE#k

" @V @ @
#CE#k kV° @

u u k u u #CE#k

u u #CE#O @
u

u #CE#O U
VM u - @V #CE#k

#CE#O
#CE#O

u h u @ @
U U° #

u @ 7
u87β @ @ k

u
U #CE#k

#CE#k o
U° #) #

U° #
U° # 8U #07

) # @ U° #
@ #CE#k

kV° - U° #) #
@

V @
kV° #CE#k

o kV°
O

#CE#k @
#CE#k

7

#CE#k

O et al

#CE#k

#CE#k #CE#O

o

#CE#O

U

U° #) #

U

U

#CE#O

U

h

#CE#k

) #

#CE#O

) #

U° #

#CE#k

#CE#O

U in vivo

#CE#k #CE#O

#CE#k

U

#CE#k

U

#CE#O

O

8

u U

h

#CE#k #CE#O

oy =

)

#

U U° #) #

#CE#k h

@V

#CE#k

@ @

@V

u

@ @

u

h"U#

Oh @ uV7

##

##k ##k ##k

##O ##O #CE#O @

u o

u @

u

@ @ @

U

@V

@V

o

@

u

@V

#CE#k

@

8#

##

##k

h

@V @ @

#CE#k U

#

#CE#k

@V

h

@

@

@ @

#CE#k

U

@V @ @V @

#CE#k
@V h O
@ @V U @
@ @V -
U @ @
@V #CE#k -
@ @
@V h #CE#k
U)# 8U #o7 @ @
U°# U @
@)
##k U U°#

#CE#k
@V @ @
#CE#k # U°hM
-kM
h
h) o" O
#CE#k U
@V @ @ #CE#k
h U°hM
#CE#k U -
@ - @ @
U°# U
@
#CE#k U
o h
@

h h@M #CE#k @V @ @ h@M

0 @V #CE#k

@V #CE#k h@Mh h@M h@M @

@ h @ @ @V O h@M

@V h@M @V

u @V #CE#k U h@M U hM

h U hM h@M @ @ #CE#k

- @ #CE#k U h@M

h@M @V) ‡ " U

u=h hU

#CE#k) @V h@M -

h@M @V @ #CE#k - @

0 #

=

ou° u @V
o ou° u @V
ou° u @V)
ou° u @V ou° u
@V
ou° u
ou° u
ou° u
KM o ou° u
h
KMou° u h h@M
KM -
KM @ @
@ @V o
@o u h@M
o= u 7
h@M @
-
@ @V h
@V @ ou° u u
‡ " o ou° u u @ @V o
h@M O
@ @V O
ou° u u -
ou° u u
#CE#k
h @ @ U=# @
switch @- u @

@ @ au u
_ au u
@ @ U #) -
au u
@ @ #E#k h
@ @ au u
O U # au u ol#o @
@V uOk ol#o ol#o
au u au u
- au u au u au u
U # y V7 " au u
U # U -
au u au u U # U
@ U
V7 " U au u o
au u au u @
au u au u
#E#k U
t o o @V @ h
U au u o
- @ @ @V
o @V au u o
@ @ @ U h@M
O @V
#E#k au u o U
au u o
@V @V
- au u
o)

kk ou CE
h O -
O ou u o
ou u o
ou u u\k 7k h
h #CE#k
kV° h kV° h
kV° h#k U
@V @ @ @ @V
V #CE#k
kV° -
#CE#k kV° @ O @ @
@V
kV° #CE#k U)
@V @
@ @V h
#CE#k - @V
kV° U
h
@V @ kV°
o @ kV°
#CE#k U U - @
O kV°
h @V
##k kV° o
##k Ono

kV° k

U

kV° u

Ⓢ

##k

7

Ⓢ

kV° #CE#k h

kV° O

U

)

h

Ⓢ

)

Ⓢ

#CE#k

V

Ⓢ

kV°

#CE#k

U #CE#k

kV° O

Ⓢ

#CE#k U

kV°

O

#CE#k

U

O

U

h

#CE#k

t @ u U -

0 #CE#O) oy= oy=

#CE#k

U #CE#k

VM

- et al U

#CE#k) oy= - o

E. coli \ = #CE#O

#CE#k

O

) oy= #CE#k

- o

) oy= h

#CE#O o

8 #)

) oy=

- #CE#k #CE#O

O

#CE#O

#CE#k

h

#CE#k #CE#O -

#CE#O

#CE#O

o

#CE#k @

· · · · · †@u
#CE#k · · · · · †† uu
· · · · · #CE#k · · · · · h"U# · · · · · #CE#k †@u
· · · · · h"U# · · · · · #CE#k †† uu · -
@ · · · · · @ · · · · · @ · · · · · O
· · · · · #CE#k
· · · · · - · · · · · #CE#O
· · · · ·
h · · · · · #CE#k
· · · · · -
· · · · · y
· · · · · U
· · · · · O
· · · · · #CE#O
· · · · · #CE#O
· · · · · U
· · · · ·
· · · · · #CE#k · · · · · oy=
· · · · · E. coli\ =
· · · · · #CE#k
) oy=
oy=
· · · · · oy=
· · · · · #CE#k † @
u U o · · · · · †@u
· · · · ·) oy=

h

#E#O

oy=

#E#k

) oy=

o

o

h

oy=

@u @U @U U

oy=

-

h

ou-#

oy= U

oy=)

oy=

oy=

Referencias

- h Innate immunity and the etiology of late-onset Alzheimer's disease. V) 10
) † Links between autophagy, innate immunity, inflammation and Crohn's disease.)) 27
 u K' 8 Inmunidad innata: barreras naturales, mecanismos de reconocimiento y sistema del complemento. Introducción a la inmunología humana - U h
 M O † " U k) The innate immune response. @
 O 162 h"
 ' V The origins of phagocytosis and eukaryogenesis.") 4
 V # Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. V ' k @
 6
 7 uU Granulocytopoiesis. II. Emergence and Pattern of Labeling of Neutrophilic Granulocytes in Humans." 24
) Ku Neutrophil kinetics in man. K# @ 58
 U = Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells." 121
 u # U ° # Neutrophil-derived cytokines involved in physiological and pathological angiogenesis. # @ 99
 O K = k Eosinophils in health and disease. † U
 h
 U V M u 8 Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. K- U 195 7
 7 h hu Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. Kk # # U 167
 k U - Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. K # @ 81
 # KO Mu V) h = Emerging role of human basophil biology in health and disease. # k 14
 U # V Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. " 123
 u k O o) U Molecular control of monocyte development. # @ 291
 7 k - ° # The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. K- U 128
 k 8 K Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. @ 11
 7) M A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. O 311
 8 o h k u Monocyte and macrophage heterogeneity. V ' k @ 5
 = 7 O'M Oh O Intramedullary nailing of the femur and the systemic activation of monocytes and neutrophils. † K- o 6
 †) U Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. # u M 5
 7 k Origin and turnover of monocytes and macrophages. # u h 79

- Definition of human blood monocytes. KO 67
- Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. V k @ 4
- Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. # 76
- Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. o 287
- Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. " 74
- Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. KO " 69
- The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. K@ 168
- Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. K- U 189
- Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. K @ 175
- Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. # - @ 142
- The CD16(+) (FcγR3(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. K- U 196
- CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. u = 92
- Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. ° k 43
- CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. " 85
- Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. K- U 197
- Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. K- U 198
- Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. V @ 7
- Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. K- U 193
- Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. K- U 187
- Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. @ 19

h O † V = # CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. - K@ 30

8 ok The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK. K @ 176

h Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets." U # 8 10

o # Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. K@ 172

o k U Dendritic cells: understanding immunogenicity. - K@ 37 Suppl 1 o

o k U The dendritic cell system and its role in immunogenicity. ° k @ 9

- = O Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. " 116

h # Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. V @ 2

- O# Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIA+ macrophages. K# @ 117

- Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. K@ 176

- Distinctive localization of antigen-presenting cells in human lymph nodes." 113

h O7 Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. K- U 207

= U Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. @ 37

U) Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. K @ 186

U - CD4+ T cell responses elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells. K@ 175

) BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. K@ 165

o - Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. K- U 209

" Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. K- U 207

U V U 8 U = Human dendritic cell subsets. @ 140

= U Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. K- U 206

M - Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. @ 29

U M Potent induction of antibody-secreting B cells by human dermal-derived CD14+ dendritic cells triggered by dual TLR ligation. K@ 189

M Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes. KO 78

O k Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. V 449

" O Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. h V " o y o" 109

U Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. K @ 173

8 U ‡ # K O Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. V k @ 8

k V Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. K@) 93

8 7 Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. K- U 196

k o= Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. 8 " 9 k

O M Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models--unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability. hO o\ 8

- o Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. K@ 166

@ M Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. K- U 178

O uh " U # Endocytosis by antigen presenting cells: dendritic cells are as endocytically active as other antigen presenting cells. h V " o y o" 89

o 7 Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. K- U 182

O) Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. - u U 4

=) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. K- U 194

M u o" Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. \ o 59

K = Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. - K@ 27

U Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. K - U 184

U U Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. " 113

o M Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. "

93

8 h Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells.

o k @ 20

U @ k U o Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. # 106

7 U Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. @ @ 11

V " Dendritic cells and MPIF-1: chemotactic activity and inhibition of endogenous chemokine production by IFN-gamma and CD40 ligation. K O "

65

) U # Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. K- U 188

k U # Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation.

o 283

O k Toll-like receptor 4 engagement drives differentiation of human and murine dendritic cells from a pro- into an anti-inflammatory mode. hO o \

8

o M Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. K@

159

" K Dendritic cells as vectors for therapy. # 106

GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. V 360

CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. K- U 184

o 7 O Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. K- U 179

U U = MO " O The role of IL-13 in the generation of dendritic cells in vitro. K@ 22

o M Interleukin-13 is involved in functional maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. - = 27

M U Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor down-regulates CD14 expression on monocytes. @ 89

k K IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency. @ 182

k V Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. K@ U 196

" h Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. " 92

k K Down-regulation and release of CD14 on human monocytes by IL-4 depends on the presence of serum or GM-CSF. " - U " 329

8 7 Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. o 327

- o k U K@ Features of the dendritic cell lineage. @ k
234
- 8 o 7\ U Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. @ 32
- o V † Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. k @ 26
- † 7 k U #)) = U Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. K- U 138
- U 7\ O= o 8 Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. k @ 27
- h 7 Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. # - @ 142
- 8 o Alternative activation of macrophages. V k @ 3
- o k) K o T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. 7 " 2
- U uk k O# TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. k @ 7
- U M V Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. h V o y o 90
- " oM U Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. V @ 11
- U u o 8 Human macrophage activation. Modulation of mannosyl, fucosyl receptor activity in vitro by lymphokines, gamma and alpha interferons, and dexamethasone. K# @ 75
- o U Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. K- U 176
- U OK Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10. K @ 162
- h E Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. K@ 141
- u Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. o 270
- o k Production of interleukin-4 and other cytokines following stimulation of mast cell lines and in vivo mast cells/basophils. @ @ 94
- o k Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. h V o y o 88
- U k Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. K@ 155
- o O K@ 8 IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. K@ 144
-) 8 Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. - K@ 24

- U 7\ Macrophage activation and polarization. 7 13
- U The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. u @ 25
- o k) K'o Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. KO 76
- o U Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. K# @ 122
- o k) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. K@ 175
- o p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. # k 66
- o † Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. K# @ 117
- M u IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. V @ 12
- h O Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. K@ 172
- U Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. u @ 23
- ‡ # o Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. KO 90
- \ K@ Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. V 447
- \ o KK ‡ - h Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. o 327
- o STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARgamma-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. @ 33
- # - Role of Kruppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. 116
- U 8 = The myeloid transcription factor KLF2 regulates the host response to polymicrobial infection and endotoxic shock. @ 34
- h \ U Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. 119
- " 8 U M The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. u @ 25
- O u) ‡ 8 Chronic inflammation: a failure of resolution? @ K-h 88
- = u "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. K- U 205
- h # Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. h V o y o 106
- u V Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. 8) 24

) - O IL-4-dependent CD86 expression requires JAK/STAT6 activation and is negatively regulated by PKCdelta. # o 16

" Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. 7" O- " K 26

U o Suppression of HIV replication in human monocyte-derived macrophages induced by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. ° @ok = k 11

8 U 7) o † uO'8 Stimulation of human monocytes via CD45, CD44, and LFA-3 triggers macrophage-colony-stimulating factor production. Synergism with lipopolysaccharide and IL-1 beta. K@ 148

O u 8 V Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. V k @ 11

U uk o'o The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. @ u 17

oO "M" Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. ° k @ 15

o M Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. KO " 75

o 8 k How cells respond to interferons. ° k " 67

" y Cellular responses to interferon-gamma. ° k @ 15

= E IFN-gamma-primed macrophages exhibit increased CCR2-dependent migration and altered IFN-gamma responses mediated by Stat1. K@ 175

) K- K @ M 8 k o Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. o 264

) u h M Serine phosphorylation of STATs. \ 19

" K Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. -U "\ K 15

U O K-) h k Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. # 8 7 k 20

M h Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. h V ° o y o° 96

- E Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. U # " 17

8 M# oK= " k † p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. -U "\ K 18

k # † Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. -U "\ K 19

V = Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. K " # 276

U M‡ Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. ° k @

- K U Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. K@ 34
-) hU IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. K@ 157
- † U k Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. K- U 174
- † U k Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. K- U 174
- # † K# U 7 = † - = Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. K@ 46
- † IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. K@ 149
- " # Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. K O " 67
-) Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. K- U 178
- h o Interleukin-10 and related cytokines and receptors. k @ 22
- † V k U Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. K" # 271
- k KM Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. K " # 274
-) Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. K@ 170
- 8 O Analysis of SOCS-3 promoter responses to interferon gamma. K" # 279
- K= IL-10 inhibits apoptosis of promyeloid cells by activating insulin receptor substrate-2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. K@ 167
- # K" Interleukin-10 stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and p70 S6 kinase is required for the proliferative but not the antiinflammatory effects of the cytokine. K" # 271
- h M U M @ o Interleukin-10 and interleukin-13 inhibit proinflammatory cytokine-induced ceramide production through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. KV 75
- 8 M Differential regulation of CD44 expression by lipopolysaccharide (LPS) and TNF-alpha in human monocytic cells: distinct involvement of c-Jun N-terminal kinase in LPS-induced CD44 expression. K@ 169
- h † - Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. " 77
- h U Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. V 339

-) u Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. K- U 165
- †) Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon R2/CD23 on normal human monocytes. K- U 167
- h K# Allergen-directed expression of Fc receptors for IgE (CD23) on human T lymphocytes is modulated by interleukin 4 and interferon-gamma. - K@ 20
- U K K- 7 u = IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. K@ 168
- ‡ U K IL4/PGE2 induction of an enlarged early endosomal compartment in mouse macrophages is Rab5-dependent. - # k 312
- = \ Synthesis of IL-13 by human B lymphocytes: regulation and role in IgE production. K° # @ 114
- O = u# o k IL-13 released by and localized in human basophils. K @ 156
- " hk Activated mast cells produce interleukin 13. K- U 181
- o † " The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. K@ 160
-) u Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. K- U 179
- U Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. V 362
- u A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4- and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness. K@ 166
- # ‡ O Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. K† 78
- # h K" Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. @ k @ 17
- k U The influence of interleukin (IL)-4, IL-13, and Flt3 ligand on human dendritic cell differentiation from cord blood CD34+ progenitor cells. - = 26
- O U " Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. K@ 169
- O ‡ K KK \ o Jaks and STATs: biological implications. ° k @ 16
- k # Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling. KO " 81
- U hU International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. h k 52
- U " M ‡ Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. ° k) 63 Suppl 2
- " K7 A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. V 385

Chemokines: a new classification system and their role in immunity. @ **12**

Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. K **409**

Conformational rearrangements and signaling cascades involved in ligand-biased mitogen-activated protein kinase signaling through the beta1-adrenergic receptor. U h **74**

Agonists and inverse agonists for the herpesvirus 8-encoded constitutively active seven-transmembrane oncogene product, ORF-74. K" # **274**

The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. K" # **276**

Broad spectrum chemokine antagonistic activity of a human poxvirus chemokine homolog. h V o y o **95**

Chemokines in atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology. u † " **28**

Chemokines and disease. V @ **2**

Lymphocyte traffic control by chemokines. V @ **2**

Kidney diseases and chemokines. #) u **7**

Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. K- U **184**

Granulocyte-colony stimulating factor and lipopolysaccharide regulate the expression of interleukin 8 receptors on polymorphonuclear leukocytes. K" # **270**

Progress in Drug Research † " " †
Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. K- U **185**

Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. K" # **273**

Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. K@ **166**

Ultrastructure and function of the fractalkine mucin domain in CX(3)C chemokine domain presentation. K" # **275**

Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. K@ **168**

Cloning and functional characterization of the human fractalkine receptor promoter regions. K **368 h**

The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. Kh **158**

Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. u † " **24**

Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. - K@ **29**

8) k Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. u † " 21

= # ° U) # @7 # Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. K" # 274

- # Fractalkine and CX3CR1 mediate leukocyte capture by endothelium in response to Shiga toxin. K@ 181

U TNF-alpha and IL-4 regulate expression of fractalkine (CX3CL1) as a membrane-anchored proadhesive protein and soluble chemotactic peptide on human fibroblasts. 7- " oO 561

= # The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. " 102

U Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. K @ 164

K o Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. U # " 20

= KM Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. h V ° o y o° 95

h \ Contribution of platelet CX(3)CR1 to platelet-monocyte complex formation and vascular recruitment during hyperlipidemia. u † " 32

@ u Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. # 91

) # V KM= Proline 326 in the C terminus of murine CX3CR1 prevents G-protein and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of Akt and extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells. Kh u 316

y = Fractalkine and vascular injury. u @ 22

" o The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. K@ 165

- V Analysis of the CC chemokine receptor 3 gene reveals a complex 5' exon organization, a functional role for untranslated exon 1, and a broadly active promoter with eosinophil-selective elements. " 96

M Cloning and functional characterization of the 5'-flanking region of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) gene. Essential role of 5'-untranslated region in tissue-specific expression. K" # 274

‡ 8 k A CX3CR1 genotype associated with retinal vasculitis in patients in the United Kingdom. @ \ † o 47

U)) = Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. K# @ 111

-) U Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1. K" # 279
- U) Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease." 97
- K # Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations. K@ 180
- u 7 Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. K# @ 117
- ° # Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. O 317
- O O CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival." 113
- # o In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. K- U 188
- # h Fractalkine expression in human renal inflammation. Kh 196
- # oK Fractalkine expression on human renal tubular epithelial cells: potential role in mononuclear cell adhesion. # - @ 129
- 7 O Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1 rapid communication. M @ 56
- V hK U M Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. @ 14
- k O A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. K@ 165
- = 8M h O The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. V k @ 6
- " K Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. # 91
- # Kh The intracellular signaling pathways involved in MCP-1-stimulated T cell migration across microvascular endothelium. # @ 167
- O K Atherosclerosis. V 407
- M @ The expression of vascular dendritic cells in human atherosclerotic carotid plaques. = h 38
- # # Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. # 107
- u V Neuronal fractalkine expression in HIV-1 encephalitis: roles for macrophage recruitment and neuroprotection in the central nervous system. K @ 164
- 7 o Deleterious genetic influence of CX3CR1 genotypes on HIV-1 disease progression. K° @) o 32
- = = Validation of genetic case-control studies in AIDS and application to the CX3CR1 polymorphism. K° @) o 26
- " - O Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response. ° @ o 17
- # " The chemokine receptor CX3CR1 controls homing and anti-viral potencies of CD8 effector-memory T lymphocytes in HIV-infected patients. ° @ o 17
- \ u Correlation of CX3CL1 and CX3CR1 levels with response to infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. Kk 36

- " M CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. Kk # # U 165
- 7 M Interferon-gamma stimulates fractalkine expression in human bronchial epithelial cells and regulates mononuclear cell adherence. Kk # U " 25
- - Up-regulated expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 during liver injury in humans. K= 37
- # M IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice.) 46
- 8 # The hemolytic-uremic syndrome. V 11
- h K# ° ‡ h Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. # U k 11
- k Síndrome Urémico Hemolítico. ° O V h 1
- k U Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. 7 h) 3
- k 8 h k The hemolytic uremic syndrome. M @ 48
- k = Epidemic hemolytic-uremic syndrome in children. M @ 52
- M U The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. K@) 151
- O - O Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. Kh 127
- h ° ‡ K# h Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. K# U 36
- # K An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. V - KU 347
- °) ‡ Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. @ @ 64
- o h Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. " 88
- M) Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. " 97
- u hO Flow cytometry detection of Shiga toxins in the blood from children with hemolytic uremic syndrome. # " # # 61
- ° Erythrocyte P1 group antigen expression in VTEC-associated hemolytic uremic syndrome. # V 51
- 7 u Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. U " # 12
- M M Apoptosis of renal tubular cells in Shiga-toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. V 87
- 8 U V U LPS induction of gene expression in human monocytes. # 13
- o

- † U - *Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function.* k @)
7
- k [Hemolytic uremic syndrome]. U " " 56
- = K° Ku) *Isolation of human monocytes on re-orienting gradients of Percoll.* K@ U 40
- u O *Genome-wide promoter analysis of histone modifications in human monocyte-derived antigen presenting cells.* U #8 11
- † o† *Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques.* Kh 172
- # 7 *Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro.* - K@ 27
- h † 7 *Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes.* K@ 157
- =) V *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response.* 90
- ° Ko " " *IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells.* @ @ 17
- h O *IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF.* - # V 6
- k) k M *IFN-gamma generates maturation-arrested dendritic cells that induce T cell hyporesponsiveness independent of Foxp3+ T-regulatory cell generation.* @ O 132
- k U † *Interleukin-10 and interferon-gamma modulate surface expression of fractalkine-receptor (CX3CR1) via PI3K in monocytes.* @ 129
- M V *Cytokine induced phenotypic and epigenetic signatures are key to establishing specific macrophage phenotypes.* hO o\ 8
- h k K U O " h *Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation.* K@ O 2
- " o - 8) *Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production.* # @ 129
- # k U *B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens.* K@ 139
- † o 8 *Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology.* @ 214
- k 8 7 U = # = k *In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions.* hO o\ 7
- o # *Interleukin-25 fails to activate STAT6 and induce alternatively activated macrophages.* @ 132
- O " KK\ KU † *Pleiotropic roles of formyl peptide receptors.* # 8 7 k 12
- Æ O *Regulation of CCR2 chemokine receptor mRNA stability.* KO " 62
- h k 8 *Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma.* K@ 160

-) U # K' K" Interleukin 4 and interferons alpha and gamma regulate Fc epsilon R2/CD23 mRNA expression on normal human B cells. U @ 27
- k U † Involvement of the fractalkine pathway in the pathogenesis of childhood hemolytic uremic syndrome." 109
-) - High glucose conditions induce upregulation of fractalkine and monocyte chemotactic protein-1 in human smooth muscle cells. u = 100
- # k Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells." 102
- u 7 8 K'k Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. @ 211
- o M# Dendritic cells: activation and maturation--applications for cancer immunotherapy. # U # 12
- O E 8 O K'o Silencing CX3CR1 production modulates the interaction between dendritic and endothelial cells. U " k 38
-) o Fractalkine induces chemotaxis and actin polymerization in human dendritic cells. @ k 50
- o o Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. K- U 187
-)) Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. o 315
- # U 8 u K'O Plasmacytoid dendritic cells in immunity. V @ 5
- " - ° U ° k) o The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. ° k @ 15
- V M The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. ° k @ 17
- h M Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. # k 69
- ° # Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. K@ U 375
- o K Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. K@ 187
- = K U M†) M Expression of the macrophage-specific colony-stimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." 69
- ° V U u K K° o A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. K# " 135
- M u Relevance of the CX3CL1/fractalkine-CX3CR1 pathway in vasculitis and vasculopathy. u k 155
- 7 h Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. K# @ 107
- u u Chemokines in tumor progression and metastasis. # o 96
- O M In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. o 324

340. Imaizumi, T., H. Yoshida, and K. Satoh, *Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells*. *J Atheroscler Thromb*, 2004. **11**(1): p. 15-21.
341. Barlic, J., Y. Zhang, and P.M. Murphy, *Atherogenic lipids induce adhesion of human coronary artery smooth muscle cells to macrophages by up-regulating chemokine CX3CL1 on smooth muscle cells in a TNFalpha-NFkappaB-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(26): p. 19167-76.
342. Hatori, K., et al., *Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells*. *J Neurosci Res*, 2002. **69**(3): p. 418-26.
343. Maciejewski-Lenoir, D., et al., *Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia*. *J Immunol*, 1999. **163**(3): p. 1628-35.
344. Tangirala, R.K., K. Murao, and O. Quehenberger, *Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(12): p. 8050-6.
345. Juffermans, N.P., et al., *Expression of human immunodeficiency virus coreceptors CXC chemokine receptor 4 and CC chemokine receptor 5 on monocytes is down-regulated during human endotoxemia*. *J Infect Dis*, 2002. **185**(7): p. 986-9.
346. Ohmori, Y. and T.A. Hamilton, *Requirement for STAT1 in LPS-induced gene expression in macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(4): p. 598-604.
347. Lang, R., et al., *Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10*. *J Immunol*, 2002. **169**(5): p. 2253-63.
348. Caruso, R., et al., *Inhibition of monocyte-derived inflammatory cytokines by IL-25 occurs via p38 Map kinase-dependent induction of Socs-3*. *Blood*, 2009. **113**(15): p. 3512-9.
349. Caruso, R., et al., *Interleukin-25 inhibits interleukin-12 production and Th1 cell-driven inflammation in the gut*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(7): p. 2270-9.
350. Kleinschek, M.A., et al., *IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation*. *J Exp Med*, 2007. **204**(1): p. 161-70.
351. Hunt, A.E., et al., *IL-4 regulation of p38 MAPK signalling is dependent on cell type*. *Cytokine*, 2002. **18**(6): p. 295-303.
352. Kamimura, D., K. Ishihara, and T. Hirano, *IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2003. **149**: p. 1-38.
353. O'Farrell, A.M., et al., *Stat3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage proliferation*. *J Immunol*, 2000. **164**(9): p. 4607-15.
354. Larner, A.C. and D.S. Finbloom, *Protein tyrosine phosphorylation as a mechanism which regulates cytokine activation of early response genes*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1266**(3): p. 278-87.
355. Gil, M.P., et al., *Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(12): p. 6680-5.
356. Ramana, C.V., et al., *Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(12): p. 6674-9.
357. Qing, Y. and G.R. Stark, *Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(40): p. 41679-85.
358. Finbloom, D.S. and K.D. Winestock, *IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1079-90.
359. Burfoot, M.S., et al., *Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(39): p. 24183-90.
360. Deane, J.A. and D.A. Fruman, *Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 563-98.

361. Hasegawa, M., et al., *Up regulated expression of fractalkine/CX3CL1 and CX3CR1 in patients with systemic sclerosis*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(1): p. 21-8.
362. Wynn, T.A., *IL-13 effector functions*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 425-56.
363. Zimmermann, N., et al., *Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(2): p. 227-42; quiz 243.
364. Hirst, S.J., et al., *Selective induction of eotaxin release by interleukin-13 or interleukin-4 in human airway smooth muscle cells is synergistic with interleukin-1beta and is mediated by the interleukin-4 receptor alpha-chain*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(8): p. 1161-71.
365. Reibman, J., et al., *Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. **28**(6): p. 648-54.
366. Kagami, S., et al., *Interleukin-4 and interleukin-13 enhance CCL26 production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **141**(3): p. 459-66.
367. Chatila, T.A., *Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis*. *Trends Mol Med*, 2004. **10**(10): p. 493-9.
368. Kelly-Welch, A.E., et al., *Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps*. *Science*, 2003. **300**(5625): p. 1527-8.
369. Jiang, H., M.B. Harris, and P. Rothman, *IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT*. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **105**(6 Pt 1): p. 1063-70.
370. Wang, I.M., et al., *STAT-1 is activated by IL-4 and IL-13 in multiple cell types*. *Mol Immunol*, 2004. **41**(9): p. 873-84.
371. Liu, Y., et al., *Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo*. *J Immunol*, 2008. **180**(9): p. 6270-8.
372. Alessi, D.R., et al., *Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase*. *FEBS Lett*, 1996. **399**(3): p. 333-8.
373. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. *Biochem J*, 2000. **346 Pt 3**: p. 561-76.
374. Scott, P.H., et al., *Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(13): p. 7772-7.
375. Nave, B.T., et al., *Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation*. *Biochem J*, 1999. **344 Pt 2**: p. 427-31.
376. Sozzani, S., et al., *Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties*. *J Immunol*, 1998. **161**(3): p. 1083-6.
377. Polentarutti, N., et al., *IL-2-regulated expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor (CCR2) in human NK cells: characterization of a predominant 3.4-kilobase transcript containing CCR2B and CCR2A sequences*. *J Immunol*, 1997. **158**(6): p. 2689-94.
378. Mosmann, T.R., *Properties and functions of interleukin-10*. *Adv Immunol*, 1994. **56**: p. 1-26.
379. de Vries, J.E., *Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10*. *Ann Med*, 1995. **27**(5): p. 537-41.
380. Geissler, K., *Current status of clinical development of interleukin-10*. *Curr Opin Hematol*, 1996. **3**(3): p. 203-8.
381. McDermott, D.H., et al., *Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis*. *Circ Res*, 2001. **89**(5): p. 401-7.

382. Gugl, A., et al., *Two polymorphisms in the fractalkine receptor CX3CR1 are not associated with peripheral arterial disease*. *Atherosclerosis*, 2003. **166**(2): p. 339-43.
383. O'Loughlin, E.V. and R.M. Robins-Browne, *Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells*. *Microbes Infect*, 2001. **3**(6): p. 493-507.
384. Ray, P.E. and X.H. Liu, *Pathogenesis of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome*. *Pediatr Nephrol*, 2001. **16**(10): p. 823-39.
385. Siegler, R.L., *Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic-uremic syndrome*. *J Pediatr*, 1994. **125**(4): p. 511-8.
386. Haskell, C.A., et al., *Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(5): p. 679-88.
387. Cybulsky, M.I. and R.A. Hegele, *The fractalkine receptor CX3CR1 is a key mediator of atherogenesis*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(8): p. 1118-20.
388. Fong, A.M., et al., *Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow*. *J Exp Med*, 1998. **188**(8): p. 1413-9.
389. Garton, K.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(41): p. 37993-8001.
390. Lesnik, P., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(3): p. 333-40.
391. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 503-16.
392. Reape, T.J. and P.H. Groot, *Chemokines and atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 1999. **147**(2): p. 213-25.
393. Umehara, H. and T. Imai, *Role of fractalkine in leukocyte adhesion and migration and in vascular injury*. *Drug News Perspect*, 2001. **14**(8): p. 460-4.