



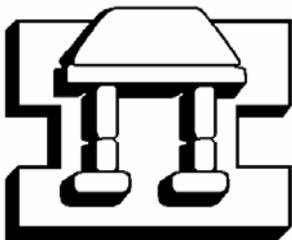
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Caracterización de una población de macrófagos supresores
inducidos en la cisticercosis experimental murina causada por
Taenia crassiceps

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
DANIEL MONTERO BARRERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDEZ



IZTACALA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

AGOSTO 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mis padres por apoyarme desde el día en que nací y haberme permitido llegar hasta este momento.

Papa: gracias por ser un ejemplo a seguir, no hay palabras para describir la admiración que siento por ti.

Mama: gracias por hacerme ver mis errores y guiarme por el buen camino.

Sin ustedes yo no hubiera logrado nada, los quiero mucho.

A mis hermanos Rocío, Federico y Rodrigo por echarme la mano en las buenas y en las malas.

A mi asesor Nacho por haberme permitido participar en el proyecto, y darme todas las facilidades para concluir este trabajo.

A mis amigos biólogos: Erika, Martín, Poot, Gustavo, Carlos, Lupe, Miriam, Elda, Laura, Chio y todos los que me faltaron... por acompañarme durante la carrera y hacerme pasar buenos momentos.

A la tribu de la preparatoria: Salvador, Cristian (bob), Nicolás, Pork (Jorge), Héctor (tilon), Maya, Rene (patillas), Yuriko y Laura por los buenos tiempos y por su apoyo incondicional

Agradecimientos especiales para la psicóloga Diana por su apoyo logístico en la realización de esta tesis.

Y para mis grandes amigos Omar e Iván (chabelo) por los años de amistad que llevamos y por que sean muchos más.

Este trabajo fue apoyado por DGAPA PAPIIT proyecto #IN223003 y por el CONACYT registro: 41584M

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Inmunidad innata.....	3
Inmunidad adaptativa.....	5
Las células T.....	8
Moléculas de Histocompatibilidad.....	9
Señales coestimuladoras.....	10
Respuesta Th1/Th2.....	12
Respuesta inmune ante helmintos.....	13
Activación de Macrófagos.....	14
Macrófagos clásicamente activados.....	15
Características y funciones de los aaMφ.....	17
aaMφ en infecciones por <i>Taenia</i>	19
ANTECEDENTES.....	20
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
METODOLOGÍA.....	24
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	47

Resumen

En este trabajo caracterizamos a una población de macrófagos potencialmente involucrados en la inmunoregulación inducida por la cisticercosis experimental. Se extrajeron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones infectados con *Taenia crassiceps* y se cultivaron con linfocitos T de ratones sanos previamente estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28; estos macrófagos inhibieron la proliferación de los linfocitos T. Este efecto supresor fue independiente de interferón gama (IFN- γ), interleucina 10 (IL-10) y óxido nítrico (NO). El contacto entre los macrófagos y los linfocitos T fue necesario para mantener la anergia de los linfocitos. El análisis de RT-PCR en estos macrófagos mostró elevados transcritos de IL-10, Fizz1, Ym1 y Arginasa-1 en comparación con macrófagos de ratones sanos; en contraste, no se encontraron transcritos de sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y no hubo diferencias en los transcritos de C-C quimiocina ligando 5 (CCL5). El análisis de las moléculas de membrana expresadas en los macrófagos inducidos por *Taenia* mostró un aumento en diversos marcadores, principalmente en las moléculas coestimuladoras PD-L1 y PD-L2. Al bloquear PD-L1, PD-L2 o su receptor PD-1 se eliminó la capacidad de los macrófagos para inhibir la proliferación de los linfocitos T. Experimentos similares utilizando péptido de ovoalbúmina (OVA) para estimular a los linfocitos T mostraron resultados similares. El mismo mecanismo parece funcionar *in vivo*, ya que al bloquear PD-1, PD-L1 o PD-L2 en células totales del bazo de ratones infectados con *T. crassiceps* se reestableció su capacidad de proliferar en respuesta a antígenos del parásito. Por lo tanto, la infección por *T. crassiceps* induce macrófagos alternativamente activados con una fuerte actividad supresora que involucra la vía PD-1/PD-L's.

Introducción

Inmunidad significa protección frente a las enfermedades y, más específicamente, frente a las enfermedades infecciosas. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y la respuesta global coordinada a la introducción de sustancias extrañas es la respuesta inmunitaria.

La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa frente a microorganismos infecciosos. No obstante, las sustancias extrañas de naturaleza no infecciosa también pueden provocar respuestas inmunitarias. Además, los mecanismos que normalmente protegen a los individuos de las infecciones y eliminan las sustancias extrañas son capaces, en ciertas circunstancias, de producir por sí mismos lesiones y enfermedades tisulares. Por lo tanto, una definición más completa de inmunidad es una reacción a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos así como macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, cualesquiera que sean las repercusiones fisiológicas o patológicas de esta reacción (Janeway 1999).

La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones precoces de la inmunidad innata y por las reacciones tardías de la inmunidad adaptativa.

Los macrófagos y neutrófilos del sistema inmunitario innato constituyen una primera línea de defensa contra numerosos microorganismos comunes, y son esenciales para el control de infecciones bacterianas. Sin embargo, no siempre pueden eliminar los agentes infecciosos, y existen algunos gérmenes patógenos que no son capaces de reconocer. Los linfocitos del sistema inmune adaptativo han evolucionado para dar origen a modos más versátiles de defensa que incrementan los niveles de protección frente a posibles reinfecciones por el mismo patógeno. Las células del sistema inmunitario innato desempeñan un papel esencial en la iniciación y posterior dirección

de las respuestas inmunitarias adaptativas, a la vez que eliminan los agentes patógenos blanco de la respuesta inmunitaria adaptativa. Además, dado que existe un retraso de 4 a 7 días antes de que la respuesta inmunitaria adaptativa sea ejecutada, la respuesta inmunitaria innata desempeña una función crucial para controlar la infección durante dicho período (Janeway 1999).

Inmunidad Innata

Los microorganismos, al penetrar en las superficies epiteliales del cuerpo por primera vez, se encuentran inmediatamente con células y moléculas que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria innata. Los macrófagos fagocíticos dirigen la defensa contra las bacterias mediante receptores de superficie que son capaces de reconocer y unirse a componentes comunes de muchas superficies bacterianas. Las moléculas bacterianas que se unen a dichos receptores activan los macrófagos para que engloben y destruyan la bacteria, e inducen la secreción de moléculas biológicamente activas. Los macrófagos activados secretan citocinas, que se definen como proteínas liberadas por células que activan o afectan al comportamiento de otras células portadoras de receptores para dichas citocinas. También secretan proteínas conocidas como quimiocinas, que atraen a células con receptores de quimiocinas, como neutrófilos y monocitos, del torrente sanguíneo. Las citocinas y quimiocinas secretadas por los macrófagos en respuesta a constituyentes bacterianos inician el proceso conocido como inflamación. La inflamación local y la fagocitosis de las bacterias invasoras se desencadena por la activación del complemento en la membrana celular de la bacteria. El complemento es un sistema de proteínas plasmáticas que activan una cascada de reacciones proteolíticas en las superficies microbianas, pero no en la célula del hospedero, envolviendo estas superficies con fragmentos que son reconocidos y unidos

por los receptores fagocíticos de los macrófagos. La cascada de reacciones también libera una serie de péptidos que contribuyen a la inflamación.

Las citocinas y otros mediadores inflamatorios producen ciertos efectos al actuar sobre los vasos sanguíneos locales. La dilatación y el aumento de permeabilidad sobre los vasos sanguíneos durante la inflamación conllevan aumento del flujo sanguíneo local y extravasación del líquido plasmático, lo cual trae como consecuencia calor, enrojecimiento e hinchazón. Las citocinas y los fragmentos de complemento también ejercen efectos importantes sobre las propiedades adhesivas del endotelio, provocando que los leucocitos circulantes se adhieran a las células endoteliales de la pared vascular y migren entre ellas hasta el foco de infección, hacia el cual son atraídas por las quimiocinas. La migración de las células en el interior de los tejidos y sus efectos locales ocasionan dolor. El tipo celular que se observa de forma predominante en las primeras fases de la respuesta inflamatoria son los neutrófilos, que son reclutados en el tejido inflamado e infectado en grandes números. Al igual que los macrófagos, los neutrófilos poseen receptores de membrana para los constituyentes bacterianos comunes y para el complemento, y son las principales células que cercan y destruyen los microorganismos invasores. El flujo de neutrófilos va seguido poco después por la infiltración de monocitos, que se diferencian rápidamente en macrófagos. Por lo tanto, los neutrófilos y macrófagos se conocen como células inflamatorias. Las respuestas inflamatorias tardías durante una infección también implican los linfocitos de la respuesta inmunitaria adaptativa, que se activa frente al antígeno durante la fase inicial de la inflamación, al ser dicho antígeno drenado desde el foco de infección a través de los linfáticos aferentes (Janeway 1999; Roitt, Brostoff et al. 2001).

La contribución de la respuesta inmunitaria innata es crucial para la inmunidad adaptativa. La respuesta inflamatoria aumenta el flujo de la linfa que contiene el

antígeno y de las células portadoras del antígeno hacia el tejido linfoide. A su vez, los fragmentos de complemento sobre las superficies microbianas y los cambios inducidos en las células que han capturado los microorganismos proporcionan señales que, sinergizan en la activación de linfocitos cuyos receptores se unen a antígenos microbianos específicos. Los macrófagos que han fagocitado bacterias y se han activado también pueden activar linfocitos T. Sin embargo, las células especializadas en la presentación de antígeno a las células T y en la iniciación de la inmunidad adaptativa son las células dendríticas.

Inmunidad Adaptativa

La inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa empieza cuando el agente patógeno es ingerido por una célula dendrítica inmadura en el tejido infectado. Estas células fagocíticas especializadas residen en la mayoría de los tejidos, tienen una vida relativamente larga y un ritmo de regeneración lento. Derivan de los mismos precursores de la médula ósea que los macrófagos y migran desde la médula ósea hacia sus posiciones periféricas, donde su papel consiste en proteger su entorno de agentes patógenos. Finalmente, todas las células dendríticas residentes de los tejidos migran a través de la linfa hacia los ganglios linfáticos periféricos, donde interaccionan con linfocitos vírgenes recirculantes. Si las células dendríticas no se activan, inducen tolerancia a los antígenos que portan.

Las células dendríticas inmaduras tienen receptores en su superficie que reconocen características comunes de muchos agentes patógenos, como proteoglicanos de la pared celular bacteriana. Al igual que sucede con los macrófagos y neutrófilos, la unión de una bacteria a esos receptores estimula la célula dendrítica para que englobe el patógeno y lo degrade en su interior. Las células dendríticas inmaduras continuamente toman

material extracelular, incluida cualquier partícula de virus o bacteria presente en el medio, por un mecanismo independiente de receptores denominado macropinocitosis. Sin embargo, la función de las células dendríticas no es primordialmente la destrucción de agentes patógenos, sino transportar los antígenos patógenos a los órganos linfáticos periféricos y, una vez ahí, presentarlos a los linfocitos T. Cuando una célula dendrítica captura un agente patógeno en el tejido infectado, se activa y viaja al ganglio linfático más próximo. Al activarse, la célula dendrítica madura y se convierte en una célula presentadora de antígeno (APC) muy eficiente, y experimenta una serie de cambios que la capacitan para activar los linfocitos que se encuentran en el ganglio linfático y que son específicos para dicho patógeno. Las células dendríticas activadas secretan citocinas que influyen tanto en las respuestas inmunitarias innatas como en las adaptativas, lo que las convierte en guardianes esenciales que determinan si el sistema inmunitario debe responder y cómo a la presencia de agentes infecciosos (Janeway 1999; Roitt, Brostoff et al. 2001; Abbas 2003).

A diferencia de la respuesta inmune innata, la respuesta adaptativa es altamente específica para el patógeno particular que la ha inducido. También puede proveer protección a largo plazo. Una persona que se recupera del sarampión, por ejemplo, queda protegida de por vida del virus del sarampión por el sistema inmune adaptativo, pero no contra otros virus comunes como el de las paperas o el de la varicela. Esta especificidad es una característica fundamental de la respuesta inmunitaria adaptativa.

La función de la respuesta inmune adaptativa es la destrucción y eliminación de los organismos invasores y de todas las moléculas tóxicas producidas por ellos. Estas reacciones inmunitarias son destructivas, por lo que es importante que únicamente se produzcan contra moléculas que son extrañas al organismo hospedero y no frente a

moléculas del propio hospedero. Esta capacidad de distinguir entre moléculas extrañas y moléculas propias es otro rasgo fundamental del sistema inmunitario.

La mayor parte de lo que se sabe sobre la inmunidad procede de estudios sobre las respuestas inmunitarias en los animales de laboratorio ante inyecciones de sustancias no infecciosas tales como proteínas y polisacáridos extraños. Casi cualquier molécula, siempre que sea extraña al receptor, puede inducir una respuesta inmunitaria; las sustancias capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria reciben el nombre de antígenos (generadores de anticuerpo). Es importante subrayar que el sistema inmunitario puede distinguir antígenos muy similares entre sí por ejemplo, dos proteínas que se diferencien en un solo aminoácido, o dos isómeros ópticos de la misma molécula.

La respuesta inmune adaptativa está dirigida por las células blancas sanguíneas llamadas linfocitos. Existen dos clases principales de dicha respuesta: (1) respuestas por anticuerpos y (2) respuestas mediadas por células, estas dos son dirigidas por diferentes clases de linfocitos, llamados células B y células T, respectivamente. Las respuestas por anticuerpos implican la producción de proteínas que reciben el nombre de inmunoglobulinas. Los anticuerpos circulan por la sangre y penetran en otros fluidos corporales donde se unen específicamente al antígeno extraño que los ha inducido. La unión del anticuerpo inactiva a virus y toxinas bacterianas (como la del tétanos o la botulínica) bloqueando su capacidad de unirse a los receptores de las células del hospedero. La unión de los anticuerpos también marca a los microorganismos invasores para su destrucción, facilitando su ingestión por una célula fagocítica o mediante la activación del sistema de proteínas sanguíneas, denominadas colectivamente complemento, que destruirá a los invasores.

La respuesta mediada por células, la segunda clase de respuestas inmunitarias, implica la producción de células especializadas que reaccionan con los antígenos extraños situados sobre la superficie de otras células del hospedero. La célula reactiva, por ejemplo, puede matar a las células del hospedero infectadas por virus, que presentan antígenos víricos en su superficie, eliminando así la célula infectada antes de que el virus se haya replicado. En otros casos, la célula reactiva segrega señales químicas que activan a los macrófagos para que destruyan a los microorganismos invasores que han fagocitado (Janeway 1999; Roitt, Brostoff et al. 2001; Abbas 2003).

Las células T

Las dos clases principales de células T poseen funciones muy diferentes. Las células T citotóxicas (CD8+) destruyen células que hospedan microorganismos nocivos, mientras que las células T colaboradoras (CD4+) contribuyen a activar las respuestas de otros glóbulos blancos, principalmente por la secreción de diversos mediadores locales, denominados en conjunto linfocinas, interleucinas o citocinas. Así, las células T citotóxicas proporcionan protección contra microorganismos patógenos, como virus y algunas bacterias intracelulares, que se multiplican en el citoplasma de la célula hospedero, donde quedan resguardadas del ataque de los anticuerpos. La forma más eficiente de prevenir que tales microorganismos invadan dichas células es destruyendo las células infectadas antes de que puedan proliferar los microorganismos. Por el contrario, las células T colaboradoras son cruciales en la estimulación de respuestas frente a los microorganismos extracelulares y a sus productos tóxicos. Existen dos tipos de células T colaboradoras: las células Th1, que activan a los macrófagos para que destruyan a los microorganismos que han ingerido, y las células Th2, que estimulan la

proliferación y la secreción de anticuerpos de las células B (Janeway 1999; Roitt, Brostoff et al. 2001; Abbas 2003).

Moléculas de Histocompatibilidad

Tanto las células T citotóxicas como las células T colaboradoras expresan receptores parecidos a anticuerpos en su superficie celular, que son codificados por genes que se ensamblan de múltiples segmentos de genes durante el desarrollo de las células T en el timo. Estos receptores reconocen al antígeno en forma de fragmentos peptídicos que se generan a partir de la degradación de proteínas antigénicas extrañas en el interior de la célula blanco, y ambos tipos, por tanto, dependen de la presencia de proteínas especiales de la célula blanco que se unan a dichos fragmentos, transportándolos hasta la superficie celular, donde los presentan a las células T. Estas proteínas especiales se denominan moléculas MHC debido a que están codificadas por un complejo de genes denominado el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por Major Histocompatibility Complex). Las células T se activan en los órganos linfoides periféricos por células presentadoras de antígeno, que expresan el complejo péptido-MHC, proteínas coestimuladoras y varias moléculas de adhesión celular en su superficie. Existen dos clases distintas de moléculas MHC que son estructural y funcionalmente diferentes: las moléculas de MHC de clase I, que presentan péptidos extraños a las células T citotóxicas y las moléculas MHC de clase II que presentan péptidos extraños a las células T colaboradoras.

Las proteínas MHC clase I y clase II tienen un papel crucial en la presentación de proteínas antigénicas extrañas a las células T. Mientras las proteínas de clase I se expresan en casi todas las células de vertebrados, las proteínas de clase II están normalmente restringidas a los tipos celulares que interaccionan con las células T

colaboradoras, como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Las dos clases de proteínas MHC tienen un canal de unión de péptido, al que se unen pequeños fragmentos peptídicos derivados de proteínas. Las moléculas MHC clase I generalmente se unen a fragmentos producidos en el citosol, mientras que las moléculas MHC de clase II se unen a fragmentos producidos en compartimientos endocíticos. Después de que se ha formado, dentro de la célula blanco, el complejo MHC-péptido es transportado a la superficie celular. Los complejos que contienen un péptido derivado de una proteína extraña son reconocidos por los receptores de las células T, los cuales interactúan con el péptido y las paredes del canal de unión del péptido. Las células T también expresan co-receptores CD4 o CD8, los cuales reconocen regiones no polimórficas de las moléculas MHC en la célula blanco: las células T auxiliaadoras expresan CD4, que reconoce moléculas MHC clase II, mientras que las células T citotóxicas expresan CD8 que reconoce moléculas MHC clase I

Las células T vírgenes requieren por lo menos de dos señales para su activación. Ambas son proporcionadas por una célula presentadora de antígeno, que es usualmente una célula dendrítica: la señal uno es proporcionada por los complejos péptido-MHC que se une a los receptores TCR de las células T, mientras que la señal 2 es principalmente proporcionada por las proteínas coestimuladoras de la familia B7 que se unen al receptor CD28 en la superficie de las células T. Si la célula T recibe solamente la señal 1, esta se elimina o inactiva (Alberts 2002; Janeway 1999).

Señales coestimuladoras

El sistema inmune ha desarrollado poderosos mecanismos para prevenir la activación innecesaria de las células T y por lo tanto de la autoinmunidad; uno de estos mecanismos es el intrincado balance entre señales coestimuladoras positivas y negativas

entregadas a las células T después del encuentro antigénico. Estas segundas señales son dependientes de la interacción de receptores de la superficie celular con sus ligandos, típicos en las células presentadoras de antígeno (APC), que proveen señales coestimuladoras esenciales complementarias a las que provee la señal TCR (señal 1). Las señales coestimuladoras positivas son cruciales en determinar si el reconocimiento del antígeno por las células T lleva a una completa activación de las células T o a la muerte/anergia. Recientes descubrimientos indican que la regulación de las respuestas inmunes puede estar conducida por la expresión de moléculas coestimuladoras inhibitorias en las APCs y en tejidos periféricos que median señales coestimuladoras negativas a las células T. Así el destino final de las células T y por lo tanto de la respuesta inmune parece estar mediado, al menos en parte, por el balance entre vías coestimuladoras positivas y negativas de las células T.

La vía coestimuladora mejor estudiada es la vía CD28/CTLA-4 – CD80/CD86. Esta vía compleja sirve como la vía coestimuladora prototipo en donde los ligandos B7 (CD80/B7-1 y CD86/B7-2) se unen ambos al receptor activador (CD28) y al inhibidor (CTLA-4) en las células T. Estos son miembros de la familia B7:CD28 (Carreno and Collins 2002), a la cual también pertenecen las vías PD-1:PD-L, ICOS-ICOSL, y B7H4. Los miembros de esta familia son proteínas transmembranales. Mientras CD28 se expresa en linfocitos T activados y vírgenes, CTLA-4 se expresa solamente en linfocitos T activados. Como CTLA-4 se une a las moléculas con mayor afinidad que CD28, su interacción inhibitoria predomina eventualmente, llevando a la terminación de la respuesta inmune. La importancia de CTLA-4 como una molécula coestimuladora reguladora negativa de las células T en la terminación fisiológica de la respuesta de las células T ha tomado mayor importancia por la observación de que ratones knockout deficientes en CTLA-4 desarrollan una linfoproliferación másiva y muerte prematura.

Incluso se ha sugerido que CTLA-4 puede funcionar como un switch maestro, que juega un papel clave en la tolerancia periférica. De hecho, en varios modelos animales el bloqueo de la señal CTLA-4 resulta en la exacerbación de las enfermedades autoinmunes. Los mecanismos moleculares exactos de la regulación de CTLA-4 son complejos y han sido revisados recientemente (Khoury y Sayegh 2004).

Respuesta Th1/Th2

Cuando una célula presentadora de antígeno activa a una célula T auxiliar virgen en tejidos linfoides periféricos, la célula T puede diferenciarse en una célula efectora Th1 o Th2. Estas dos subclases funcionalmente distintas de células T auxiliaoras efectoras pueden distinguirse por las citocinas que secretan. Si la célula se diferencia en una célula Th1, esta secretará *interferón- γ* (IFN- γ) y *factor de necrosis tumoral- α* (TNF- α) que activará a los macrófagos para matar microbios localizados dentro de los fagosomas de los macrófagos. También activará a las células T citotóxicas para eliminar células infectadas. Aunque las células Th1 defienden a un organismo principalmente contra patógenos intracelulares, también pueden estimular a las células B para secretar subclases específicas de anticuerpos IgG que puedan cubrir a microbios extracelulares y activar el complemento (Alberts 2002; Abbas 2003; Janeway 1999).

Si la célula T virgen se diferencia en una célula Th2, en contraste, secretará *interleucinas* 4, 5, 10 y 13 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) y principalmente defenderá al organismo contra patógenos extracelulares. Una célula Th2 puede estimular a las células B para hacer varias clases de anticuerpos, incluyendo IgE y algunas subclases de IgG, que se unen a células cebadas, basófilos y eosinófilos

Así, la decisión de las células T auxiliares vírgenes para diferenciarse en células efectoras Th1 o Th2 influye el tipo de respuesta inmune adaptativa que será montada contra el patógeno, ya sea si será dominada por la activación de macrófagos o por la producción de anticuerpos. Las citocinas específicas presentes durante el proceso de activación de células T auxiliares influyen en el tipo de célula efectora producida. Los microbios en el sitio de infección no solamente estimulan a las células dendríticas a producir proteínas coestimuladoras B7 de superficie celular, también las estimulan para producir citocinas. Las células dendríticas entonces migran a un órgano linfático periférico y activan a la célula T auxiliar virgen para diferenciarse en una célula efectora, Th1 o Th2 dependiendo de las citocinas que las células dendríticas producen.

Una vez que se han desarrollado las células efectoras Th1 o Th2, estas inhiben la diferenciación del otro tipo de célula T auxiliar. El IFN- γ producido por las células Th1 inhibe el desarrollo de las células Th2 mientras que las citocinas IL-4 e IL-10 producidas por las células Th2 inhiben el desarrollo de las células Th1, por lo tanto la elección inicial de la respuesta es reforzada conforme la respuesta avanza (Alberts 2002).

Respuesta inmune ante helmintos

Los helmintos parásitos han desarrollado complejos mecanismos para evadir la respuesta de sus hospederos. Comúnmente, las infecciones por helmintos inducen una respuesta inmune tipo Th2 que ha sido asociada a una respuesta celular proliferativa disminuida a antígenos parasitarios o a antígenos no relacionados en sus hospederos. En estas infecciones se observan altos niveles de eosinófilos, mastocitos e inmunoglobulina E (Maizels y Yazdanbakhsh 2003). Además las infecciones por helmintos pueden alterar la inmunidad y susceptibilidad a otros parásitos o virus (Actor, Shirai *et al.* 1993;

Rodriguez, Terrazas *et al.* 1999). Los factores que pueden influir el establecimiento de una respuesta inmune tipo Th2, son las moléculas coestimuladoras de las células T, carbohidratos, proteínas y moléculas de membrana de los parásitos. En muchas infecciones por helmintos, la polarización hacia el tipo Th2 es tan potente que las células T vírgenes que expresan receptores para antígenos no relacionados al parásito se diferencian hacia el fenotipo Th2. Algunos tipos de respuesta que se desarrollan después de la infección de algunos helmintos como *T. muris*, *Schistosoma* o *filaria* es una combinación de los tipos Th1 y Th2. Estas infecciones se caracterizan por un incremento de IL-10, sugiriendo que esta citocina es inducida con el propósito de evitar respuestas inflamatorias dañinas tipo Th1 (Terrazas, Walsh *et al.* 2001; Gause, Urban *et al.* 2003; Maizels y Yazdanbakhsh 2003).

En la cisticercosis experimental causada por el helminto *Taenia crassiceps* se induce una producción de citocinas polarizada al tipo Th2, otra característica clave de la infección es el cambio gradual de una respuesta Th1 a una fuerte respuesta Th2 en el hospedero infectado (Terrazas, Bojalil *et al.* 1998). La infección crónica por el helminto induce un tipo de macrófagos llamados alternativamente activados, que juegan un papel en la inducción de una respuesta inmune tipo Th2 en el hospedero. Otra propiedad de estos macrófagos alternativamente activados es la supresión de la proliferación de linfocitos.

Activación de macrófagos

Los macrófagos están entre las células más pleiotrópicas del sistema inmune, exhibiendo una amplia gama de funciones biológicas, incluyendo fagocitosis, muerte celular y actividades pro y antiinflamatorias. Además señalizan respuestas adaptativas a través de una variedad de citocinas, moléculas coestimuladoras, y presentación de

antígeno. Es bien conocido que los antígenos microbianos junto con las células T efectoras, y las células T reguladoras y sus productos influyen la heterogeneidad y estado de activación de los macrófagos. En los últimos años se han identificado diferentes estados de activación de los macrófagos (Tabla 1) (Gordon 2003; Mantovani, Allavena *et al.* 2004; Mantovani, Sica *et al.* 2004).

Macrófagos clásicamente activados

Los mejor caracterizados son los macrófagos clásicamente activados (ca M ϕ), que son inducidos por moléculas microbianas proinflamatorias como lipopolisacárido (LPS) en un ambiente de citocinas Th1 [interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF α)] y por la liberación de productos microbicidas y/o inflamatorios. Estas células pueden ser identificadas por su habilidad para producir óxido nítrico (NO), por su incremento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y CD86 y por su elevada capacidad de presentar antígeno. Los caM ϕ juegan un papel esencial en la protección contra patógenos intracelulares, a través del estallido respiratorio y la liberación de NO. También ejercen una actividad citotóxica y antiproliferativa, resultado en parte por su habilidad de secretar NO y citocinas proinflamatorias [TNF α , interleucina 1 (IL-1), IL-6]. La persistencia de los procesos inflamatorios frecuentemente resulta en daño tisular, y el sistema inmune enfrenta un reto permanente: cómo controlar la infección sin dañar el tejido. Por lo tanto, el desarrollo de mecanismos antiinflamatorios es necesario para la supervivencia del hospedero.

En base a las observaciones de que el desarrollo de los caM ϕ es inhibido por las citocinas Th2, el desarrollo de macrófagos en un ambiente Th2 se ha vuelto un foco de atención. Dichos macrófagos presentan un programa diferente de activación y han sido nombrados macrófagos alternativamente activados (aaM ϕ).

Tabla 1. Principales tipos de activación en macrófagos

Tipo de activación	Estímulo	Receptores involucrados	Marcadores que se alteran
Activación innata	Componentes microbianos	TLR's, CD14, TREM	Moléculas coestimuladoras, citocinas pro y/o anti-inflamatorias, NO
Complejos inmunes	Activación del complemento y anticuerpos	Receptor de FC y receptores del complemento	Actividad citolítica, citocinas pro y/o anti-inflamatorias
Activación clásica	IFN- γ	Receptor de IFN- γ	MHC clase II, NO y estallido respiratorio, citocinas pro inflamatorias. Inmunidad celular
Activación alternativa	IL-4 y/o IL-13	Receptor de IL-4 ó IL-13	MHC clase 2, MR regulación. Inmunidad humoral
Desactivación innata / adquirida	Patógenos y citocinas	CD47, CD200R, Receptores de citocinas	Regulación de MHC clase II, citocinas anti-inflamatorias, TGF- β IL-10, PGE ₂ . inmuno supresión

Características y funciones de los aaMφ

El concepto de aaMφ fue introducido por Gordon en 1993, para distinguir específicamente entre el fenotipo de células activadas en presencia de IL-4 y células desactivadas en presencia de IL-10 (Stein, Keshav et al. 1992) Posteriormente Gordon incluyó los efectos de IL-13 en la definición de activación alternativa porque IL-13 comparte una cadena receptora común con IL-4 y ejerce efectos similares en los macrófagos. Los aaMφ en contraste con los caMφ no producen NO a partir de L-arginina y no limitan eficientemente el crecimiento de patógenos intracelulares. Una característica de los aaMφ es su elevada expresión de un patrón particular de proteínas de reconocimiento. Los aaMφ expresan específicamente el receptor antagonista IL-1 antiinflamatorio (IL-1Ra), el receptor IL-1, la quimiocina-1 CC asociada a activación alternativa de macrófagos (AMAC-1), la quimiocina derivada de macrófagos (MDC), y la quimiocina de timo y activación regulada (TARC) que reclutan preferencialmente células Th2 a través de la interacción con el receptor de quimiocina C-C 4 (CCR4). Recientes estudios han identificado Ym1 y Fizz1 como los genes más abundantemente expresados en los aaMφ de ratón. Ym1 es una citocina de quimiotaxis para eosinófilos y se ha reportado que tiene actividad quitinasa y Fizz1 inhibe la diferenciación de los adipocitos e inhibe *in vitro* la acción del factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés) (Loke, Nair et al. 2002; Raes, De Baetselier et al. 2002; Nair, Gallagher et al. 2005).

Los aaMφ expresan niveles similares a los de los caMφ de las moléculas coestimuladoras CD11a, CD40, CD54, CD58, CD80 y CD86. También exhiben un aumento en la habilidad endocítica y fagocítica, una elevada expresión de MHC-II y pueden presentar antígeno. Por lo tanto los aaMφ como los caMφ, poseen todas las

características requeridas para conducir una respuesta inmune, y su particular repertorio de expresión genética permite a los aaM ϕ cumplir funciones específicas.

En base a la observación de que son antagonísticamente regulados por las citocinas Th1, uno podría especular que los aaM ϕ regulan los procesos inflamatorios iniciados por los caM ϕ , secretando moléculas antiinflamatorias tales como IL-10 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Los aaM ϕ ejercen funciones inmunosupresivas selectivas e inhiben la proliferación de las células T. Su presencia en individuos sanos en placenta, pulmones y lugares de privilegio inmune así como en enfermedades inmunes crónicas, sugiere que los aaM ϕ protegen órganos y tejidos circundantes contra respuestas inmunes perjudiciales. Producen altos niveles de factores involucrados en la regeneración de tejido. Además incrementan la actividad fibrogénica de los fibroblastos humanos y promueve la angiogénesis y reparación de heridas durante la fase cicatrizante de enfermedades inflamatorias crónicas y agudas (Gordon 2003).

La regulación de la respuesta inmune inflamatoria por los aaM ϕ puede no ser un mecanismo general, pero podría ser cierto solamente para la inflamación dirigida por las citocinas Th1. En las enfermedades inflamatorias controladas por las citocinas Th2 (alergias, patología gástrica, infecciones parasitarias), evidencias acumuladas indican que los aaM ϕ pueden ser pro inflamatorios, apoyando el desarrollo de la patología. La evaluación del balance de sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS)-arginasa provee la principal evidencia de la presencia de aaM ϕ . Es tan sólo desde el 2001 que se han identificado genes que son fuertemente inducibles en los aaM ϕ en comparación con los caM ϕ . Un número limitado de estudios han incluido el balance iNOS-arginasa y la expresión de Fizz1 y/o Ym1 como marcadores de la presencia de aaM ϕ durante infecciones parasitarias. En modelos murinos de estas enfermedades, la investigación

indirecta acumulada sugiere que los aaM ϕ –considerados en base a la actividad arginasa inducida- son componentes clave en el control de la respuesta inmune inflamatoria.

aaM ϕ en infecciones por *Taenia*

En un modelo de cisticercosis humana causada por *Taenia solium*, ratones infectados con *Taenia crassiceps* generan una respuesta inmune tipo Th1 (IL-12, IFN- γ , NO, IgG2a) en la fase temprana de la infección (<4 semanas). Esta respuesta es reemplazada por una respuesta inmune tipo Th2 (IL-4, IL-13, IgG1, IgE) en la fase crónica de la infección (Terrazas, *et al* 1998). Paralelo al cambio del ambiente de citocinas, en el estado crónico de la infección se desarrolla una población de aaM ϕ , que producen niveles más altos de prostaglandina E₂ (PGE₂) e IL-6 y niveles más bajos de IL-12 y NO que en la fase temprana de la infección. Estos aaM ϕ exhiben actividad arginasa, y revelan una elevada expresión de las moléculas MHC-II, CD40, CD86, CD23 y el receptor de quimiocina C-C 5 (CCR5). Las células T estimuladas con aaM ϕ obtenidos con *T. crassiceps* son inducidas a producir IL-4. La actividad supresora de los aaM ϕ no se debe a la producción de IL-6 o PG y no es mediada a través de la señalización de CD86, de cualquier forma, la producción de IL-6 por estos macrófagos influencia la polarización de citocinas Th2, posiblemente dirigiendo la diferenciación de las células T CD4⁺ productoras de IL-4 (Rodríguez-Sosa, Satoskar *et al.* 2002).

Ratones tratados con IL-2 e IFN- γ en la fase temprana de la infección controlan el crecimiento de *Taenia crassiceps* más eficazmente que los controles, mientras que la neutralización de IFN- γ incrementa la susceptibilidad. Ratones STAT6^{-/-} (que carecen de la respuesta inmune Th2 mediada por IL-4/IL-13) restringen mejor el crecimiento de *T. crassiceps* que los ratones STAT6^{+/+}. La elevada resistencia de los ratones deficientes en STAT6 coincide con el mantenimiento de la respuesta inmune Th1 y de

los caM ϕ en el estado crónico de la enfermedad. Estas observaciones sugieren que la respuesta inmune Th2 dependiente de STAT6 favorece la susceptibilidad a la infección por *T. crassiceps*, lo que contradice el supuesto dogma de que las citocinas Th2 juegan un papel crucial en la resistencia contra los helmintos (Rodríguez-Sosa, David *et al.* 2002).

No se sabe si los aaM ϕ contribuyen directamente a la susceptibilidad a *T. crassiceps*. De cualquier forma, las células de los ratones STAT6^{+/+} generan una mayor respuesta proliferativa en la fase temprana de la infección, mientras que las células de ratones STAT6^{-/-} muestran una mayor respuesta proliferativa en el estado crónico de la infección. Así, los aaM ϕ obtenidos durante la infección crónica en ratones STAT6^{+/+} pueden impedir la inducción óptima de una respuesta inmune Th1 requerida para controlar la cisticercosis (Rodríguez-Sosa, David *et al.* 2002; Noel, Raes *et al.* 2004)

Antecedentes

Con el propósito de estudiar factores asociados a la susceptibilidad y/o resistencia a la cisticercosis, se ha desarrollado un modelo experimental de cisticercosis murina utilizando al céstodo *Taenia crassiceps*. El ciclo de vida de *T. crassiceps*, se desarrolla como gusano adulto en el intestino de perros y otros cánidos y como cisticerco en el ratón y otros roedores (fig 1). Se desvía del patrón usual de los taenidos debido a que el cisticerco no solamente crece, sino también se reproduce por gemación dentro de las cavidades corporales o subcutáneamente (Freeman 1962). En la infección experimental se inyectan de 10 a 20 cisticercos de *Taenia crassiceps* en la cavidad peritoneal de ratones, en donde se reproducen por gemación.



Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

Los macrófagos llamados alternativamente activados aaM ϕ han sido descritos al menos en una infección por helmintos (*Brugia malayi*), en donde parecen participar en la inducción de la respuesta tipo Th2 e inhiben la proliferación vía contacto dependiente observada en esta infección por el nematodo, (Allen, Lawrence *et al.* 1996; Loke, MacDonald *et al.* 2000).

Con respecto a la cisticercosis experimental Rodriguez-Sosa *et al* en el 2002, extrajeron macrófagos de ratones infectados con *T. crassiceps* en las fases tempranas de la infección así como en los estadios crónicos. Encontraron que los macrófagos obtenidos durante la infección crónica muestran una baja habilidad para inducir una respuesta proliferativa en células T CD4+, pero favorecen la producción de IL-4. Estos macrófagos expresaban altos niveles de CD23 y CCR5, que están asociados con una baja producción de IL-12 y óxido nítrico (NO), también expresan altos niveles de IL-6 y prostaglandina E₂. Esto contrasta con los macrófagos obtenidos en las primeras fases de la infección, los cuales inducen una fuerte proliferación de células T CD4+ y una elevada producción de IFN- γ en estas (Rodriguez-Sosa, Satoskar *et al.* 2002).

Por otro lado, recientemente, Loke *et al* en el 2003 demostraron que las células Th1 y Th2 regulan diferencialmente la expresión de PD-L1 y PD-L2 en macrófagos inflamatorios. Y sugieren que PD-L1 y PD-L2 pueden tener diferentes funciones en regular las respuestas Th1 y Th2 (Loke y Allison 2003).

En otra infección causada por un helminto (*Schistosoma mansoni*), Smith *et al* en el 2004 encontraron distintas formas en la supresión de la proliferación de células T que dependían de los diferentes estados de infección por *Schistosoma*, demostraron que los gusanos de *Schistosoma* pueden inducir anergia de células T CD4 y CD8 *in vivo* e *in vitro*, a través del incremento de PD-L1 en la superficie de los macrófagos, ya que bloqueando este ligando se recuperó la proliferación de las células T (Smith, Walsh *et al.* 2004).

Hipótesis

Los macrófagos inducidos durante la infección causada por *T. crassiceps* son macrófagos alternativamente activados, e inhiben la proliferación de los linfocitos T a través de moléculas coestimuladoras de membrana.

Objetivo General

Caracterizar el tipo de macrófagos que se desarrollan durante la infección intraperitoneal con el cisticerco de *T. crassiceps*.

Objetivos Particulares:

- 1.- Determinar la capacidad de los macrófagos de suprimir la respuesta proliferativa de linfocitos T previamente activados.
- 2.- Analizar si los macrófagos obtenidos de los animales infectados con *T. crassiceps* presentan la expresión de marcadores para el estado de activación alternativa.
- 3.- Determinar si la supresión de los macrófagos es contacto-dependiente o debida a factores solubles.
- 4.- Analizar las moléculas de membrana expresadas por dichos macrófagos.
- 5.- Explorar la posible participación de las moléculas PD-L1 y PD-L2 en la inhibición de la respuesta de linfocitos T.

Metodología

Parásitos e Infección.

Se extrajeron metacístodos de *Taenia crassiceps* de la cavidad peritoneal de ratones hembras Balb/c de 4-6 meses de infección, los parásitos se lavaron 3 veces con solución salina balanceada de Hank's estéril (Microlab, México). La infección se realizó en ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad, mediante una inyección intraperitoneal con 20 cisticercos de *T. crassiceps* suspendidos en solución salina.

Obtención de células peritoneales y macrófagos.

Los ratones se sacrificaron después de 1, 4 y 8 semanas de infección. Se inyectaron 5 ml de solución salina estéril y fría para que los macrófagos se despeguen de la cavidad peritoneal, posteriormente se extrajeron las células de exudado peritoneal de las cavidades peritoneales de los ratones infectados así como de ratones sanos usados como control.

Las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min., se resuspendieron en solución hemolizante (cloruro de amonio 0.16 M y Tris Base 0.17 M) durante 10 min; para lisar los eritrocitos mediante un shock hipotónico. Este lavado se hizo dos veces. Las células viables fueron contadas por exclusión de azul tripano (0.05% en agua estéril). Se ajustó la concentración celular a 1×10^6 células/ml en medio RPMI (Gibco-BRL) suplementado con 10% de FCS, 100 unidades de penicilina/streptomina, 2 mM de glutamina, 25mM de buffer HEPES, y 1% de aminoácidos esenciales (todo de GIBCO, BRL Grand Island, NY). Las células se cultivaron en placas de seis pozos durante 2 horas 37°C y 5% de CO₂ para que se adhieran los macrófagos a la placa.

Después de este tiempo se desecharon las células no adherentes con lavados de medio RPMI. Las células que quedaron adheridas a la placa (macrófagos) fueron tratadas con PBS-EDTA 5mM durante 20 min. para que se despegaran. Se registró la viabilidad nuevamente, el >90% de las células corresponde a macrófagos de acuerdo con el análisis de FACS (F4/80⁺). Se analizaron las moléculas de membrana de los macrófagos y se analizó la actividad supresora de estos en co-cultivos con células CD90⁺.

RT-PCR

Se extrajo el RNA total de macrófagos peritoneales obtenidos de ratones infectados de 4 y 8 semanas de infección y de ratones sanos. Los macrófagos se obtuvieron como ya se describió, se les agregó 1 ml de Trizol por cada 1×10^6 células en un tubo eppendorf de 1.8ml, se les agregó 200µl de cloroformo (J.T.Baker) por cada ml de Trizol y se incubaron por 15 min. Se centrifugaron a 13500 rpm durante 15 min., se extrajo la fase acuosa en donde está contenido el RNA con una micropipeta. Se depositó en otro tubo eppendorf con 500 µl de isopropanol frío, se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Se decantó y resuspendió la pastilla, se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 13500 rpm durante 5 min. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 30 min., finalmente se resuspendió en 20µl de agua grado molecular. El cDNA fue preparado utilizando el kit First strand synthesis superscript II (invitrogen) a partir de 5µg de RNA total. Las muestras de cDNA fueron estandarizadas basándose en el contenido de cDNA de β-actina. Los primers para b-actina fueron F-GTGGCCGCTCAGGCACCAA y R-CTCTTTGATTGCACGCACGATTTC (Kleinert, Euchenhofer *et al.* 1996). Los primers para la sintasa de oxido nítrico inducible (iNOS) fueron F-

CTGGAGGAACTCCTGCCTCATG y R-GCAGCATCCCCTCTGATGGTG (Yoshida, Maruyama *et al.* 2000). Los primers para IL-10 fueron F-ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA y R-CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAA. Los primers para la quimiocina C-C ligando 5 (CCL5) fueron F-GTGCCCACGTCAAGGAGTAT y R-GGGAACCGTATACAGGGTCA (Faunce y Stein-Streilein 2002). Para Fizz1 fueron F-GGTCCCAGTGCATATGGATGAGACCATAGA y R-CACCTCTTCACTCGAGGGACAGTTGGCAGC, para la cintasa Ym1 fueron F-TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG y R-TTTGTCCTTAGGAGGGCTTCCTCG y para arginasa-1 fueron F-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG y R-CAGATATGCAGGGAGTCACC (Nair, Gallagher *et al.* 2005).

El PCR se realizó en un volumen total de 50µl de buffer PCR en presencia de dNTP 0.2M, 0.2mM de cada primer y 2.5 U de Taq Polimerasa Platinum (invitrogen), utilizando un termociclador (Corvett Research, Australia). Después de 30 ciclos de amplificación, los productos del PCR fueron separados por electroforesis (100 volts) en un gel de agarosa al 1.5% y visualizado con tinción de bromuro de etidio (0.5µg/ml).

Caracterización de Macrófagos; análisis por citometría de flujo

Los macrófagos peritoneales se resuspendieron en buffer para FACS (PBS con 0.1% de Azida de sodio y 1% de suero fetal bovino) y se bloquearon con anticuerpo anti-CD16/CD32 (Biolegend, CA, USA) durante 20 min. Se centrifugaron y se resuspendieron en buffer para FACS y se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocinato fluoresceína (FITC) contra F4/80 (Caltag laboratorios, CA, USA), PD-L2 (eBioscience, CA, USA) ó con anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE) contra, SLAM (Biolegend), CCR5 (Pharmingem CA, USA), PD-L1 (eBioscience),

CD14 u OX40L (Bioegend) durante 30 min. Se utilizaron 0.5 μ g de anticuerpo por cada 1X10⁶ células. Las células marcadas fueron analizadas en un equipo FACsCalibur, utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson).

Co-cultivos de Macrófagos-células CD90⁺ (linfocitos T)

Se sensibilizaron placas de 96 pozos para estimular la proliferación de linfocitos T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 1 μ g/ml, 100 μ l/pozo. Los macrófagos de ratones sanos e infectados se extrajeron como se describió anteriormente y se ajustaron a 5X10⁵ células/ml.

Se extrajo el bazo de ratones sanos y se obtuvieron las células por perfusión. Se hizo el lavado para lisar eritrocitos, se resuspendieron en buffer de separación (PBS con 5% de BSA y EDTA 5mM) y se contaron en una cámara de newbawer. Se agregaron 10 μ l de perlas magnéticas MACs-anti-CD90+ (MACS, Militenyi Bistec, CA, USA) por cada 1x10⁷ células/ml, se incubaron durante 20 min. a 4°C. Se centrifugaron y se resuspendieron en 0.5 ml de buffer de separación. Se hizo fluir por una columna MS/RS vario Macs en campo magnético para aislar las células T CD90+, una vez terminado, se agregaron 500 μ l 2 veces. Después se quitó la columna del campo magnético y se recolectaron las células en un tubo estéril, agregando 2 ml de medio y empujando con el émbolo de la columna. Los linfocitos y los macrófagos se cultivaron en las placas previamente sensibilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 en relaciones de 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 (macrófagos:CD90+). El cultivo se mantuvo a 37°C y 5% de CO₂ durante 3-4 días. Dieciocho horas antes de finalizar el cultivo, se agregaron 0.5 μ Ci de [3H]-timidina a cada pozo, para evaluar la proliferación celular a través de la incorporación de este precursor al núcleo de las células. Las células se cosecharon usando un cosechador

automático (Tomtec) y fueron depositadas en un papel filtro. Este papel se dejó secar y se le agregó líquido de centelleo, para inmediatamente contar las muestras en un contador de centelleo líquido (Trilux 1450 microbeta) para determinar la cantidad de radiactividad incorporada a las células, representada como CPM (cuentas por minuto).

Co-cultivos con membranas y anticuerpos:

En algunos cultivos se utilizaron membranas en los pozos para separar a los macrófagos de los linfocitos, estas membranas (transwells) permiten el intercambio de productos de secreción de las células (0.4 μm de poro) pero impiden el contacto de las membranas celulares. Estos cultivos se hicieron en relación 1:8 macrófagos:linfocitos, los macrófagos fueron sembrados en la cámara superior, los linfocitos se sembraron en la cámara inferior con el estímulo antiCD3/CD28. El cultivo se mantuvo bajo las condiciones ya descritas, se agregó 3H-timidina para medir la proliferación celular. Terminado el cultivo se retiraron las membranas y se cosecharon los linfocitos como ya se describió.

Para evaluar el papel de moléculas solubles en la supresión, en cultivos con relación 1:8 se bloquearon las moléculas IL-10 e IFN- γ agregando anticuerpos $\alpha\text{IL-10}$ y $\alpha\text{IFN-}\gamma$. las células CD90+ se marcaron con CFSE, marcador fluorescente que se incorpora al citoplasma. Terminado el cultivo se midió la proliferación de linfocitos mediante citometría de flujo, analizando la pérdida del marcador fluorescente CFSE, usando un equipo FACScalibur.

Para evaluar el papel de las moléculas de membrana de las células en la supresión, en cultivos con relación 1:8 se bloquearon las células con anticuerpos $\alpha\text{PD-1}$, $\alpha\text{PD-L1}$, $\alpha\text{PD-L2}$ Y αOX40L , utilizando 2 $\mu\text{g/ml}$ por pozo, cada cultivo se hizo por triplicado y

con controles (isotipos), también se agregó 3H-timidina para medir la proliferación celular.

Antígeno específico (Ovoalbúmina):

Se usaron linfocitos CD4 de animales transgénicos para OVA (es decir que responden directamente a este antígeno sin necesidad de una previa sensibilización), Se extrajo el bazo de ratones sanos y se obtuvieron las células CD4 utilizando perlas magnéticas MACS. Se hicieron 2 lavados con solución salina y se resuspendieron en 2 ml de solución salina + 2 μ l de CFSE (5mM), se incubaron durante 10 min, después se agregaron 5 ml de medio y se contaron por exclusión de azul tripano, se ajustaron a 1×10^6 células/ml. (Mannering, Morris *et al.* 2003).

Los macrófagos de ratones sanos y parasitados se obtuvieron como se mencionó anteriormente y se cultivaron junto con los linfocitos T marcados con CFSE en concentraciones de 1:8 macrófagos:linfocitos, los cuales se estimularon con 10 μ g/ml de péptido de Ovoalbúmina (323-339) para inducir la proliferación antígeno específica, en algunos cultivos se bloquearon las células con α PD-1. Terminado el cultivo se midió la proliferación de linfocitos mediante citometría de flujo, analizando la pérdida del marcador fluorescente CFSE, usando un equipo FACScalibur.

Linfocitos de ratones infectados

Se extrajo el bazo de ratones con 4 y 8 semanas de infección y se obtuvieron las células totales del bazo por perfusión. Estas células se cultivaron en placas de 96 pozos y se agregaron anticuerpos α PD-1, α PD-L1, α PD-L2 o α OX40L. Las células se estimularon con 25 μ g/ml de antígenos solubles de *T. crassiceps*, se agregó 3H-timidina para medir la proliferación celular.

Se realizó la citometría de flujo para detectar la molécula PD-1 en linfocitos T de ratones sanos y con 4 y 8 semanas de infección, las células se extrajeron como se describió anteriormente.

Resultados

Para demostrar el efecto de los macrófagos en la proliferación de los linfocitos T (CD90+) , se cultivaron linfocitos T de ratones sanos en presencia de macrófagos de ratones sanos y en presencia de macrófagos provenientes de ratones infectados con *T. crassiceps*.

Los linfocitos T en presencia de macrófagos de ratones sanos presentaron altos niveles de proliferación en respuesta a un estímulo por α CD3/CD28. En contraste, cuando los linfocitos fueron cocultivados con macrófagos de ratones infectados con *Taenia crassiceps* de 4 y 8 semanas de infección se observó una marcada supresión de la proliferación de las células CD90+, especialmente en los cultivos donde hubo mayor cantidad de macrófagos. En la figura 2 se observa una inhibición significativa de la respuesta proliferativa aún cuando la relación de macrófagos:linfocitos es de 1:16, aún así la mayor inhibición se obtuvo en los cultivos con una relación 1:4.

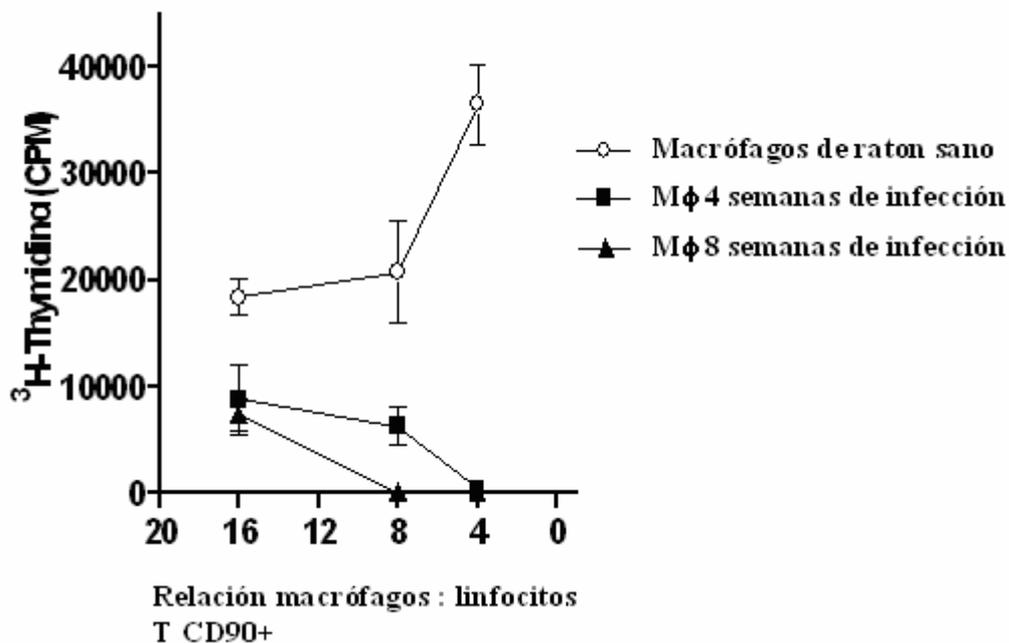


Figura 2. Los macrófagos extraídos de ratones infectados con *T. crassiceps* después de 4 y 8 semanas de infección inhiben la respuesta proliferativa de las células CD90+ estimuladas con α CD3/CD28, los cultivos se hicieron en

relaciones de macrófagos:linfocitos – 1:4, 1:8, y 1:16. Las células se incubaron 18 horas con ³H- Timidita para medir la proliferación celular, a mayor radioactividad mayor proliferación.

Para demostrar que los macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de los ratones infectados con *T. crassiceps* presentaban las características de aaMφ, realizamos ensayos de RT-PCR en macrófagos obtenidos de ratones sanos e infectados, buscando los marcadores que indican la presencia de aaMφ (Raes, De Baetselier *et al.* 2002). En la figura 3 se observan los resultados del RT-PCR. Los macrófagos obtenidos de ratones infectados muestran altos niveles de transcritos de mRNA de los genes Ym1, Arginasa-1, Fizz1 e IL-10 en relación con los macrófagos obtenidos de ratones sanos. No se encontraron transcritos de iNOS en los macrófagos de ratones infectados ni de ratones sanos y no se observaron diferencias en los transcritos de CCL5 en ambos grupos de macrófagos.

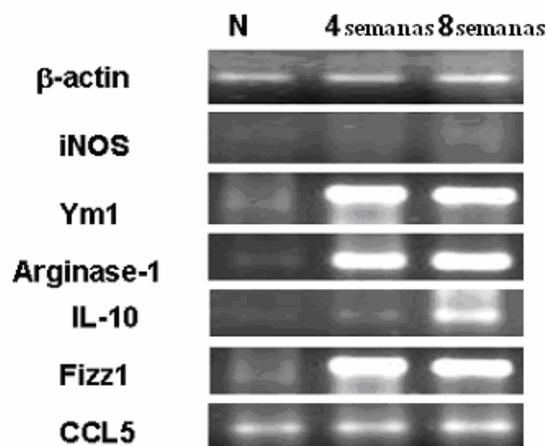


Figura 3. Los transcritos para β -actina, Fizz1, Ym1, IL-10, arginasa-1, CCL5 e iNOS fueron analizados por RT-PCR en macrófagos obtenidos de ratones sanos e infectados de 4 y 8 semanas de infección.

Para determinar si la supresión de los macrófagos estaba relacionada con la secreción de IL-10 ó IFN- γ , se bloquearon estas moléculas con anticuerpos en los co-cultivos de

macrófagos y linfocitos CD90+. Como se muestra en la tabla 2 la neutralización de IL-10 e IFN- γ no reestableció la respuesta proliferativa de las células CD90+ ante un estímulo CD3/CD28.

Tabla 2.- Co-cultivos de macrófagos con células CD90+ donde se bloqueó IL-10 e IFN- γ

Fuente de los macrófagos	Tratamiento		
	Isotipo	α IFN- γ	α IL-10
Ratones sanos	70 ± 16	68 ± 17	76 ± 17
Ratones infectados	13.8 ± 3^c	12.8 ± 4.7^c	11.9 ± 3.5^c

P % de proliferación en respuesta a un estímulo α CD3/CD28, +/- SD, medido con CFSE, siendo el 100% células CD90+ sin presencia de macrófagos.

c $p < 0.05$ en comparación con macrófagos de ratones sanos

Para determinar si la supresión mediada por los macrófagos era dependiente de factores solubles o del contacto de moléculas de las membranas celulares se hicieron co-cultivos en donde se impidió el contacto celular de los macrófagos supresores con los linfocitos. La figura 4 muestra que en ausencia de contacto celular entre los macrófagos de animales infectados y los linfocitos no hubo una inhibición significativa de la proliferación de las células CD90+ ante un estímulo α CD3/CD28. Esto sugiere que la actividad supresora de los macrófagos podría estar mediada por moléculas de membrana.

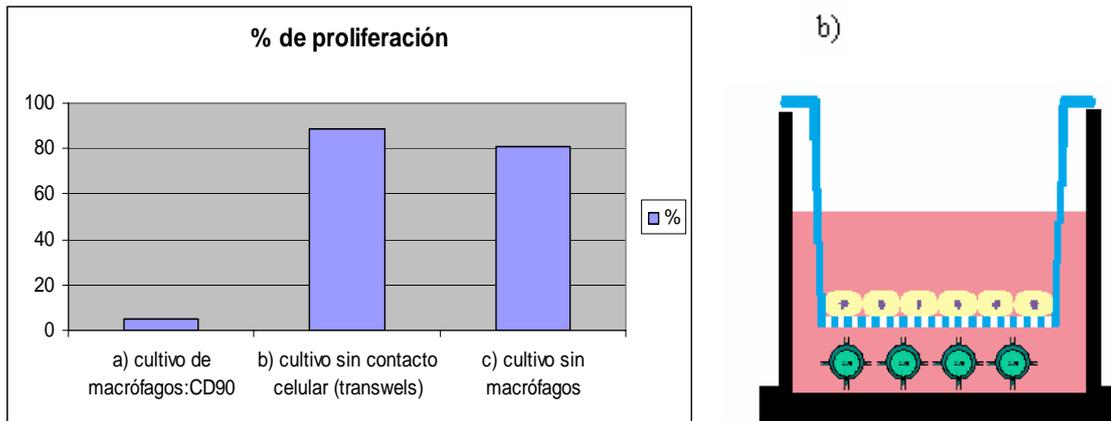


Figura 4. Se muestra la proliferación de los linfocitos cuando son co-cultivados con a) macrófagos supresores, b) cuando el co-cultivo se hace impidiendo el contacto celular con membranas y c) cuando no hay presencia de macrófagos.

Dado que la supresión de los macrófagos puede estar mediada por moléculas de membrana, se realizó el análisis de marcadores de membrana en los macrófagos a través de citometría de flujo de dos colores, para determinar si había algún cambio en la expresión de algunas de estas moléculas que pudieran estar involucradas en la supresión. Las figuras 5 y 6 muestran algunos de los marcadores detectados en los macrófagos. Los macrófagos de ratones sanos expresaron PD-L1 y bajos niveles de PD-L2. Sin embargo conforme avanzó la infección los macrófagos incrementaron la expresión de las dos moléculas. En la figura 6 se observa que los macrófagos de ratones sanos expresaron bajos niveles de (a) SLAM, (b) CCR5 y (c) OX40L, en contraste en los macrófagos de ratones infectados se observó un incremento considerable en la expresión de estas moléculas.

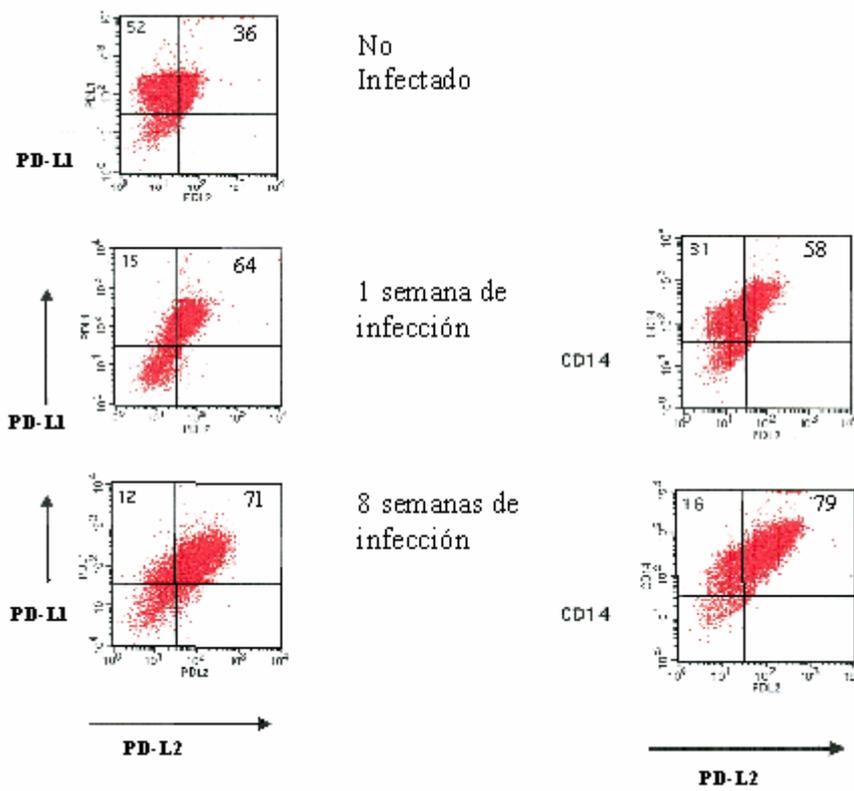


Figura 5. Citometría de flujo de macrófagos para PD-L1, y PD-L2. La expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 aumenta conforme avanza la infección. Cada punto representa una célula marcada con anticuerpos, los anticuerpos están marcados con ficoeritrina (PE) para PD-L1 Y CD 14, y con fluoresceína (FITC) para PD-L2. CD14 es un marcador de presencia de macrófagos. El número en los cuadrantes indican el porcentaje de macrófagos que expresan estos marcadores.

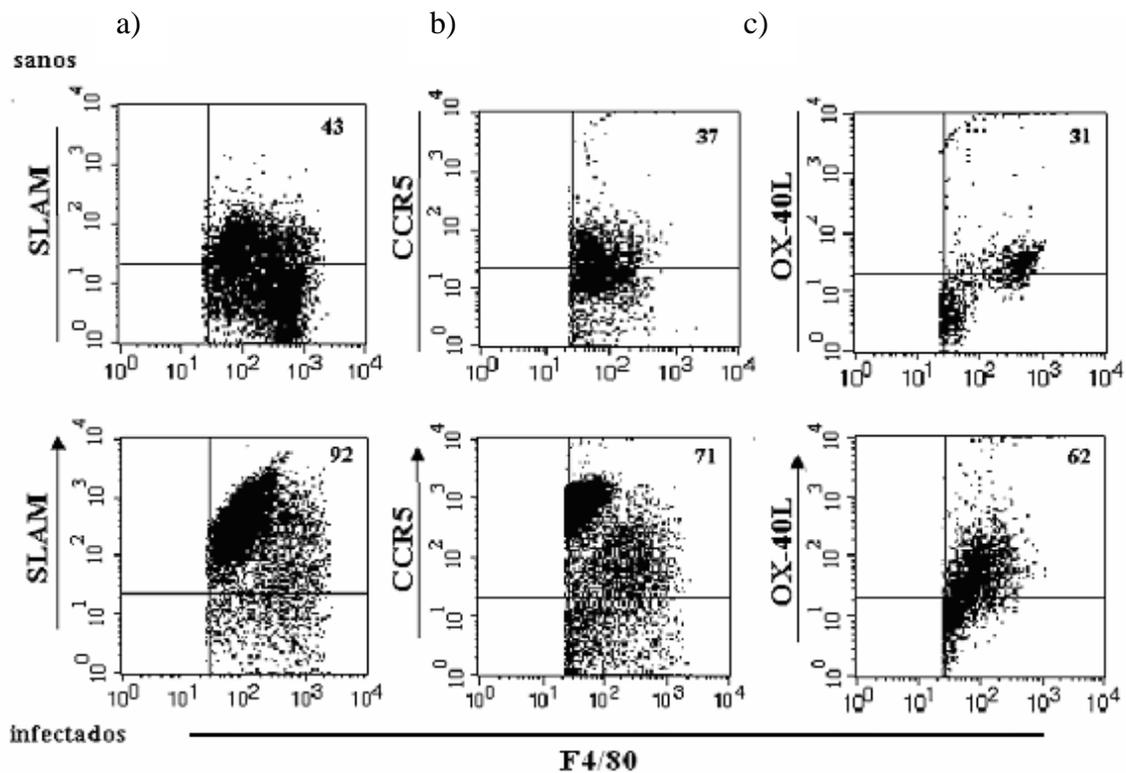


Figura 6. Citometría de flujo de los macrófagos para SLAM, CCR5 y OX40L. F4/80 es un marcador de presencia de macrófagos. El número en el cuadrante de la derecha indica el porcentaje de macrófagos que expresan SLAM, CCR5 u OX40L. La expresión de estas moléculas de membrana se incrementa en los macrófagos supresores y va en aumento conforme transcurre la infección

Para determinar si los macrófagos también suprimen la proliferación de los linfocitos ante un estímulo antígeno-específico, se realizaron los cultivos de macrófagos con linfocitos que responden ante estímulos de ovoalbúmina. Como se observa en la figura 7, el 77% de los linfocitos CD4⁺ OVA-TCR cultivados con macrófagos de ratones sanos se dividieron por lo menos una vez. Al cultivar los linfocitos con macrófagos de ratones infectados se inhibió la proliferación puesto que solamente el 11% de los linfocitos se dividieron. En el cultivo de linfocitos con macrófagos de ratones sanos e infectados se observa que se sigue inhibiendo la proliferación de los linfocitos

Al realizar el cultivo de linfocitos con macrófagos de ratones infectados bloqueando el receptor PD1 se observa una recuperación en la proliferación, el 34% se dividió por lo menos una vez. La proliferación también se recupera al bloquear PD-1 en los cultivos de linfocitos con macrófagos de ratones sanos e infectados.

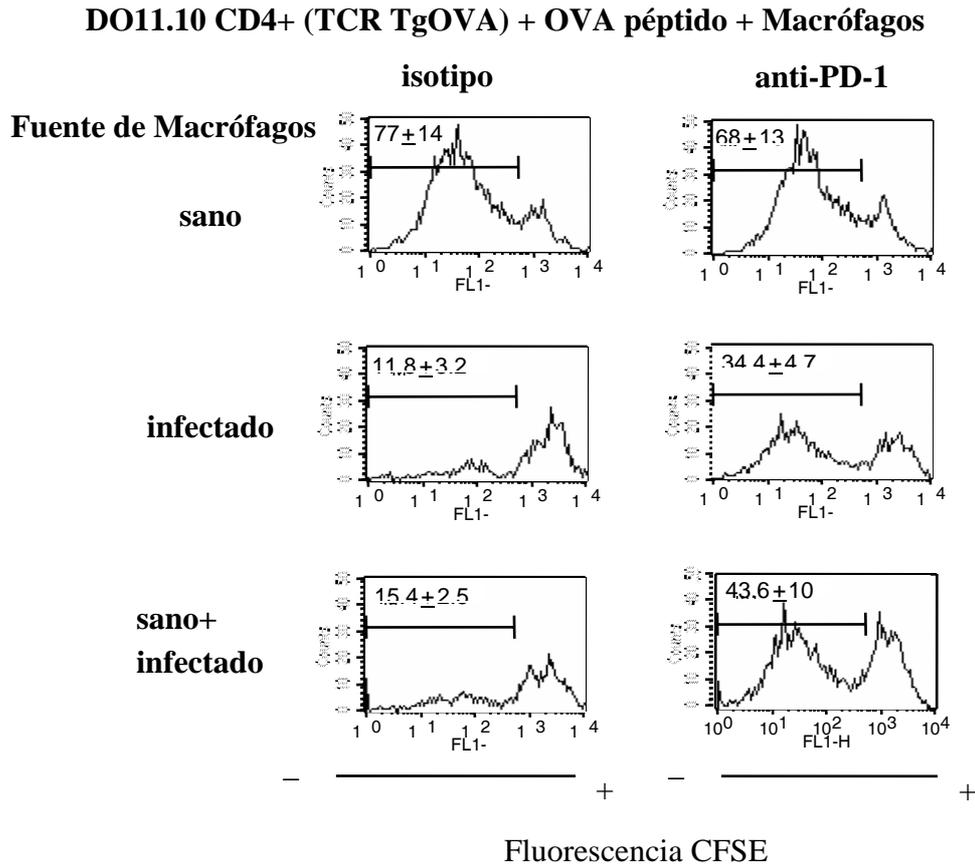


Figura 7. Ensayo de proliferación con CFSE, la pérdida del marcador indica proliferación. Los macrófagos de ratones infectados suprimen la proliferación de los linfocitos, al bloquear el receptor PD-1 se recupera parcialmente la proliferación.

Para determinar si la interacción del receptor PD-1 en los linfocitos con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 en los macrófagos podría estar involucrada en la actividad supresora de

los macrófagos inducidos por *Taenia crassiceps* se realizaron los co-cultivos bloqueando estas moléculas con anticuerpos monoclonales contra PD-L1, PD-L2 o PD-1. Como se observa en la figura 8, al bloquear los cultivos aaMφ:CD90⁺ con αPD-L1 y αPD-L2 se recuperó parcialmente la respuesta proliferativa de las células CD90⁺, mientras que en los co-cultivos en donde se bloqueó PD-1 la proliferación celular se reestableció casi completamente. Al bloquear la molécula OX40L o utilizar un anticuerpo irrelevante (isotipo IgG_{2a}) no se observó un efecto significativo en la proliferación celular.

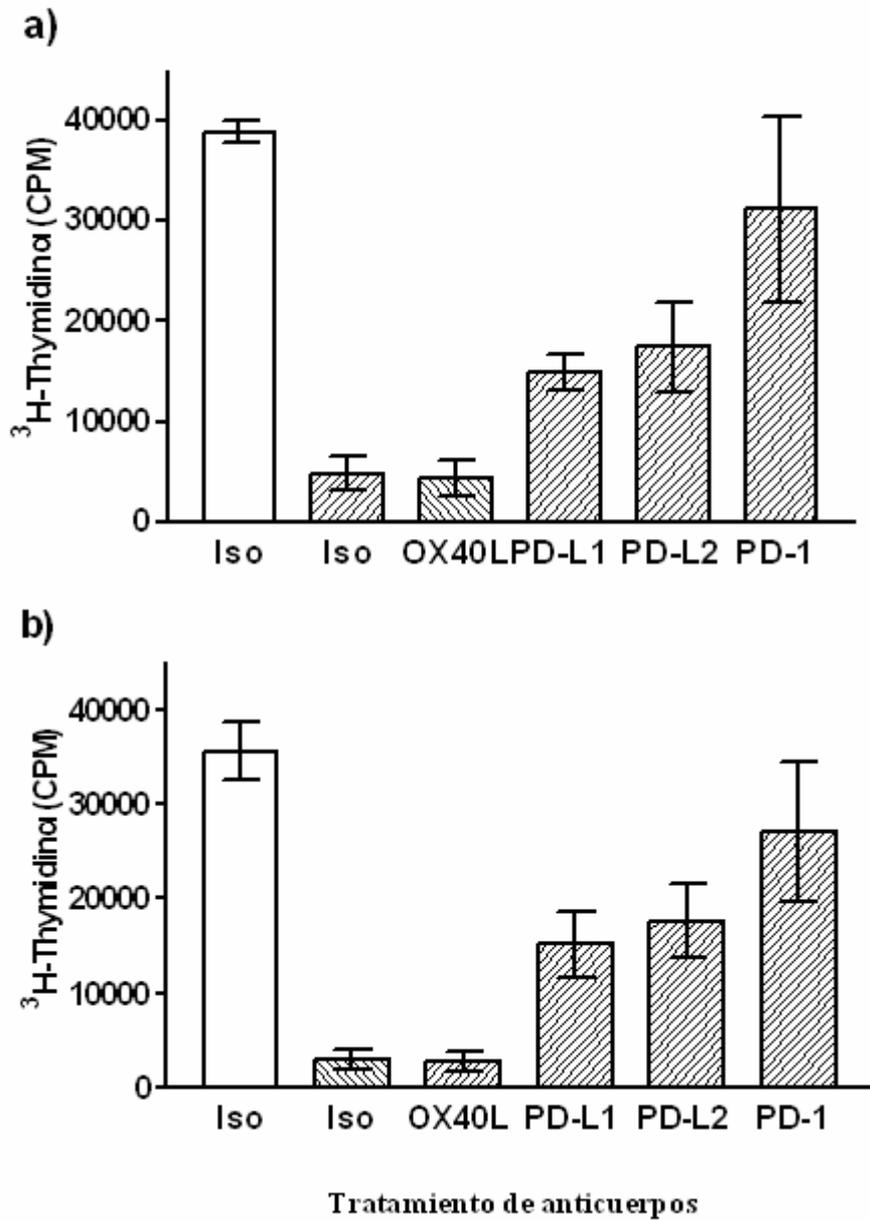


Figura 8. El histograma muestra la respuesta proliferativa de células CD90^+ ante un estímulo CD3/CD28 en presencia de macrófagos de 4 (a) y 8 (b) semanas de infección y en presencia de anticuerpos bloqueadores o isotipo. La barra blanca representa linfocitos en presencia de macrófagos de ratones sanos, las barras con líneas transversales representan linfocitos en presencia de macrófagos de ratones infectados.

Para demostrar que la interacción PD-1/PD-Ls funcionaba también *in vivo* se analizó la expresión de PD-1 en células CD4^+ de ratones infectados con *T. crassiceps*. Como se

observa en la figura 9, las células $CD4^+$ de ratones infectados expresaron significativamente más PD-1 en comparación con células $CD4^+$ de ratones sanos, la expresión de PD-1 también aumenta conforme avanza la infección.

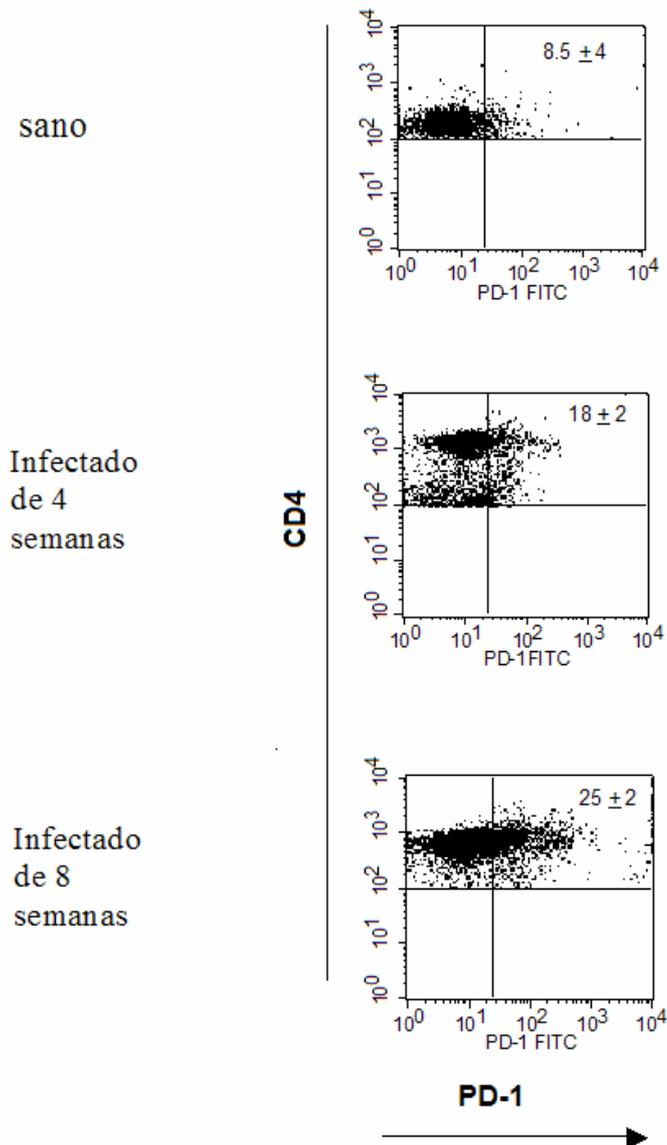


Figura 9. Citometría de flujo en donde se muestra la expresión de PD-1 en células $CD4^+$ de ratones sanos y ratones con 4 y 8 semanas de infección, las células de ratones infectados expresan más PD-1.

Para investigar si hay participación del sistema PD-I/PD-L's en este proceso de anérgia, se obtuvieron células del bazo de ratones infectados con *T. crassiceps*, y se estimularon *in vitro* con antígenos solubles de *Taenia*. Como se esperaba, las células del bazo de

ratones con 4 y 8 semanas de infección presentaron una limitada respuesta proliferativa a antígenos específicos (fig 10). En contraste, cuando se bloqueó con anticuerpos α PD-1 o α PD-L1/PD-L2, la proliferación celular se incrementó significativamente, este efecto fue específico para la interacción PD-1/PD-L's ya que al agregar anticuerpos α OX40L a los cultivos no aumentó la proliferación celular.

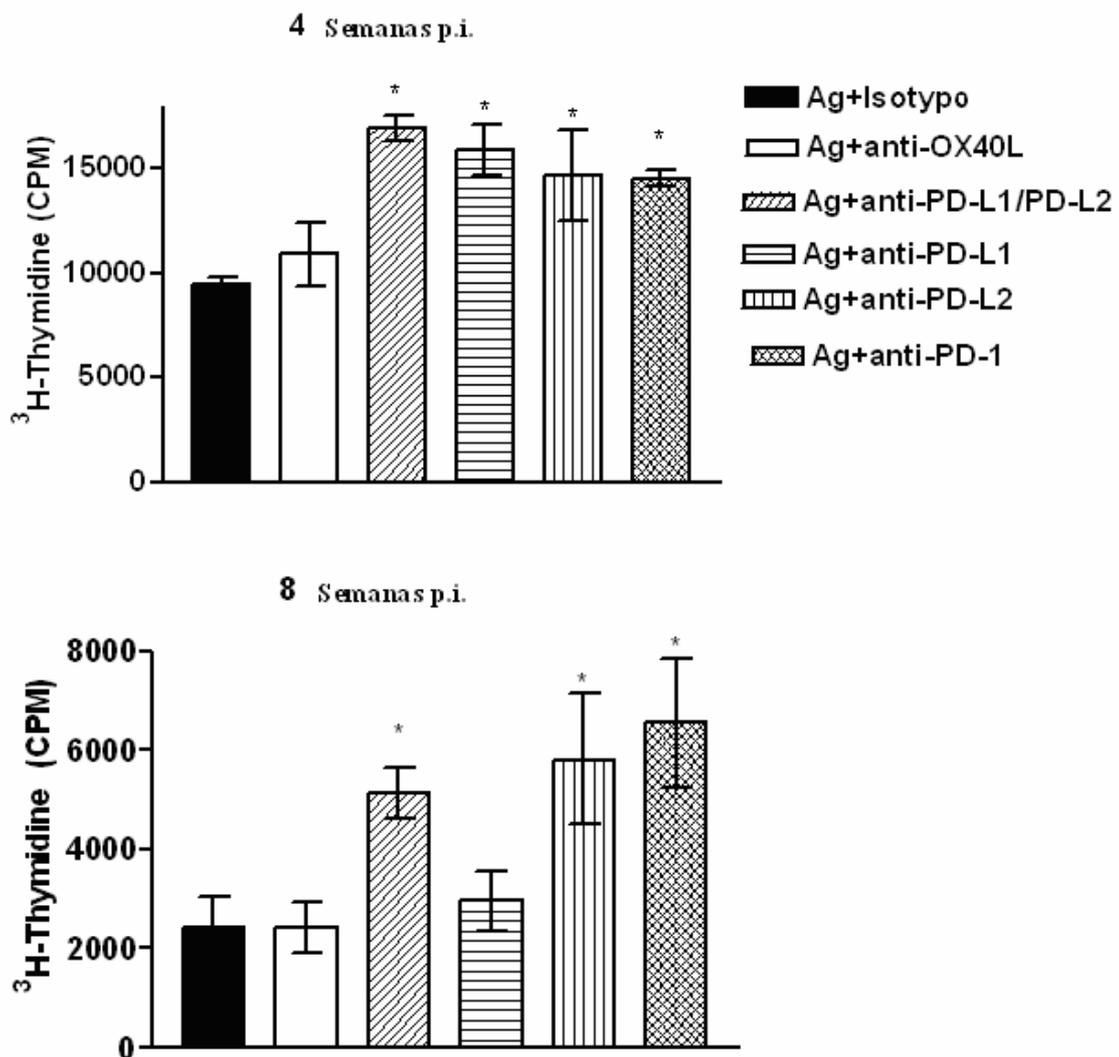


Figura 10. Respuesta proliferativa antígeno-específica de los linfocitos del bazo de ratones con 4 y 8 semanas de infección con *T. crassiceps*. Se evaluó la proliferación de estas células después de 96 hrs. de estimulación *in vitro* con 25 μ g/ml. de antígeno de *Taenia*. Se agregaron anticuerpos anti-PD-1, PD-L1, PD-L2, o OX40L 5 μ g/ml. * $P < 0.05$ comparando los tratamientos con anticuerpos anti PD-1, antiPD-L1/L2 contra isotipo y anti OX40L.

Discusión

Se sabe que los helmintos inducen anergia inmune, respuestas antiinflamatorias así como una respuesta adaptativa polarizada hacia el tipo Th2. Se ha demostrado que productos de secreción/excreción de los helmintos así como moléculas de membrana, proteínas y carbohidratos son responsables de algunos de estos eventos (Gause, Urban *et al.* 2003; Maizels y Yazdanbakhsh 2003).

Estudios previos sugieren que los macrófagos pueden sufrir alteraciones cuando los hospederos son expuestos a enfermedades crónicas causadas por helmintos parásitos o sus productos. Por ejemplo, inyecciones intraperitoneales del nemátodo *Brugia Malayi* (Allen, Lawrence *et al.* 1996; Allen y Loke 2001) o de antígenos de tremátodos como *S. mansoni* y *Fasciola hepatica* (Atochina, Daly-Engel *et al.* 2001; Donnelly, O'Neill *et al.* 2005) provocan el reclutamiento de una población diferente de macrófagos con una variedad de actividades, que han sido identificados como macrófagos alternativamente activados (Gordon, S., 2003). Específicamente en la cisticercosis experimental Rodríguez –Sosa *et al* (2002) demostraron que macrófagos con estas características surgen durante las primeras semanas después de la infección (Rodríguez –Sosa *et al* 2002). Recientemente Raes *et al* (2005) confirmaron el fenotipo de estos macrófagos en la cisticercosis experimental demostrando que estos expresan genes típicamente asociados a la activación alternativa como lo son Fizz1 y Ym1 (Raes *et al* 2005). En el presente estudio se confirmó la presencia y la actividad supresora de estos macrófagos a través de los ensayos de proliferación, y de la presencia de los marcadores de aaMφ en el RT-PCR que son Fizz1 y Ym1 de los cuales se encontró una elevada transcripción en los macrófagos de ratones infectados, así como también se encontró una elevada transcripción de arginasa-1 y de IL-10 mientras que los transcritos de otros genes

(iNOS, CCL5) no se detectaron o no hubo diferencia en su expresión comparados con M ϕ de ratones sanos.

En el presente estudio, caracterizamos con más detalle las propiedades inmunomodulatorias de estos macrófagos alternativamente activados inducidos durante la cisticercosis causada por *Taenia crassiceps*. Encontramos que la infección con la larva de *Taenia crassiceps* provoca que los macrófagos expresen las moléculas de membrana CCR5 y la molécula de señalización de activación de linfocitos (SLAM), y que sobre expresen PD-L1, PD-L2 y OX40L conforme avanza la infección.

La interacción OX40/OX40L co-estimula la activación, proliferación y producción de citocinas de las células T. La interacción de la molécula OX40L con su receptor en linfocitos T se ve involucrada en la polarización de estas células hacia un tipo Th2 (Rogers y Croft 2000). El encontrar un aumento en la expresión de esta molécula nos ayuda a conocer parte de los mecanismos por los cuales los macrófagos alternativamente activados favorecen la respuesta inmune tipo Th2.

Esta población de macrófagos suprimió la respuesta proliferativa de las células CD90+ o CD4+ vírgenes ante estímulos con anticuerpos anti CD3/CD28 o ante estímulos con antígeno específico (péptido -OVA) respectivamente. Demostramos que la actividad supresora de los macrófagos funciona vía contacto célula-célula, y que no actúa a través de la liberación de factores solubles, ya que al bloquear IFN- γ e IL-10, que están involucrados en la supresión de las células Th2 y de las células Th1 respectivamente, no se modificó la actividad supresora de los aaM ϕ . Descartamos la participación del NO porque los macrófagos que surgen durante la infección por *T. crassiceps* no liberan NO en cultivo. Además, tampoco se detectaron transcritos de mRNA de iNOS, enzima responsable de la producción de NO (MacMicking, Xie *et al.* 1997). Los resultados de los cultivos con transwells nos demuestran que con bloquear o impedir el contacto

celular es suficiente para bloquear el efecto supresor de los aaM ϕ , estos resultados indicaron que las moléculas asociadas a la membrana de los macrófagos eran las responsables o estaban asociadas a la supresión. Es probable que estas moléculas no se encuentren en los macrófagos de ratones sanos o no están lo suficientemente expresadas para inducir supresión.

Las moléculas de membrana PD-L1 y PD-L2 regulan la proliferación mediada por TCR y la secreción de citocinas de las células T uniéndose al receptor PD-1 en estas células. Se conoce que la unión de PD-1 con sus ligandos dirige a las células T a un arresto del ciclo celular en G0/G1 (Latchman, Wood *et al.* 2001). Dada la elevada expresión de PD-L1 y PD-L2 en los macrófagos obtenidos de ratones infectados con *T. crassiceps*, probamos su participación en la actividad supresora de estos macrófagos. Al principio se pensó que podría ser PD-L2 puesto que es solamente inducible en macrófagos y células dendríticas (DCs) estimulados con citocinas (Yamazaki, Akiba *et al.* 2002). La expresión de PD-L1 y PD-L2 está diferencialmente regulada por la expresión de citocinas Th1 y Th2, PD-L1 se expresa altamente en macrófagos inflamatorios y puede ser regulado posteriormente por exposición a lipopolisacárido e IFN- γ . PD-L2 no se expresa en macrófagos inflamatorios pero puede ser inducido por activación alternativa vía IL-4 (Yamazaki *et al.* 2002; Loke y Allison, 2003).

Al bloquear los ligandos PD-L1 y PD-L2 y el receptor PD-1 con los anticuerpos en los cultivos, se redujo significativamente la actividad supresora de los aaM ϕ , además las células T proliferaron igual que en los cultivos con macrófagos de ratones sanos. Estos datos indican que los dos ligandos PD-L1 y PD-L2 están directamente involucrados en la actividad supresora contacto dependiente de los aaM ϕ . En concordancia con nuestros resultados, una participación similar de la interacción PD-1/PD-L's se observó en la esquistosomiasis murina experimental (Smith *et al.*, 2004). Todos estos datos sugieren

que la vía PD-1/PD-Ls juega un papel regulatorio en las enfermedades parasitarias y en la tolerancia inmune (Liang, Latchman *et al.* 2003; Salama, Chitnis *et al.* 2003). Smith en el 2004, atribuyó la actividad supresora de las APC en esquistosomiasis directamente a PD-L1; aún cuando PD-L2 fue detectado (Smith *et al.*, 2004).

En nuestro trabajo, no podemos decir que sólo uno de los ligandos para PD-1 es el responsable de la actividad supresora, ya que los resultados del FACS nos demuestran que tanto PD-L1 como PD-L2 se encuentran sobre expresados en los aaM ϕ y al bloquear tanto PD-L1 como PD-L2 la actividad supresora disminuyó significativamente, en ambos casos la proliferación se recupera hasta un 70%. Además al bloquear el receptor PD-1 hubo mayor efecto en la proliferación de las células T que al bloquear PD-L1 o PD-L2 por separado, en este caso la proliferación se recuperó casi totalmente. Algo interesante es que los macrófagos de ratones sanos también expresan PD-L1 en sus membranas, sin embargo no se detectó actividad supresora cuando fueron co-cultivados con células CD4+ y CD90+, con estos resultados surge la pregunta de si la intensidad de expresión de esta molécula es importante para inducir la señal negativa (Greenwald, Freeman *et al.* 2005) o si es necesaria la co-expresión de ambos PD-L1 y PD-L2 para dirigir señales reguladoras en las células T activadas.

También demostramos que los aaM ϕ son capaces de suprimir la proliferación de las células T ante una interacción APC:CD4 antígeno-específica, en donde al bloquear PD-1 se reestablece la respuesta específica de las células CD4+ DO11.10 a una estimulación con el péptido-OVA.

Los aaM ϕ también suprimen la respuesta proliferativa de células T en interacción con APC normales (Terrazas, Montero *et al.* 2005). Por lo tanto los aaM ϕ suprimen eventos inmunológicos mediados a través de distintos mecanismos moleculares que pueden inducir fuertes respuestas pro inflamatorias. Posteriores estudios son necesarios para

explorar esta posibilidad transfiriendo este tipo de macrófagos en animales con enfermedades inflamatorias.

Estudios previos han demostrado que las células T del bazo de ratones infectados con *T. crassiceps* tienen una baja respuesta proliferativa después de estimularlos con anti CD3, Con-A o antígeno específico (Sciutto, Fragoso *et al.* 1995; Toenjes, Spolski *et al.* 1999; Rodriguez-Sosa, Satoskar *et al.* 2003), pero los mecanismos involucrados en estos fenómenos eran desconocidos. Aquí nosotros demostramos que la vía PD-1/PD-Ls participa en la modulación de la respuesta proliferativa específica contra *Taenia crassiceps*.

Todos los experimentos los hicimos con linfocitos de ratón sano, pero para demostrar que en los ratones infectados funciona el mismo sistema, se realizaron cultivos con células totales del bazo de ratones infectados estimulados con antígeno de *Taenia crassiceps*. También se observó una inhibición de la proliferación celular, la cual se recuperó al bloquear los ligandos PD-L's y el receptor PD-1. Se realizó la citometría de flujo para detectar la molécula PD-1 en células T del bazo de ratones infectados, y encontramos altos porcentajes de células CD4+ que expresan PD-1 (CD4+ PD-1+) en comparación con las células de ratones sanos, lo que nos indica que sí existe interacción de PD-1 /PD-Ls *in vivo* durante la infección con *T. crassiceps*, y que es a través de esta interacción que se ejerce la supresión de los aaMφ hacia los linfocitos T. Sin embargo, son necesarias investigaciones posteriores para definir si estas células se vuelven anérgicas o pueden ser rescatadas.

En años recientes, nuestro grupo (Rodriguez-Sosa, David *et al.* 2002) demostró que los ratones deficientes en la vía de señalización STAT 6 y que por lo tanto son incapaces de producir IL-4 para activar a los macrófagos supresores por la vía alternativa, son resistentes a la infección por *T. crassiceps*. Considerando el balance

inmune, es posible que la presencia de los macrófagos alternativamente activados con su capacidad supresora sean necesarios para apagar respuestas inflamatorias posiblemente peligrosas, en concordancia con esto, un reporte sugiere que una respuesta inflamatoria activa en neurocisticercosis provoca síntomas patológicos (Chavarria, Roger *et al.* 2003).

Conclusiones

La infección con *Taenia crassiceps* induce cambios funcionales en los Macrófagos de la Cavidad Peritoneal.

Los macrófagos que surgen durante la infección causada por *Taenia crassiceps* son macrófagos alternativamente activados.

Los aaM ϕ inducidos por *T. crassiceps* tienen actividad supresora.

La supresión de los aaM ϕ es contacto-dependiente y es principalmente causada por la interacción PD-1/PD-L's.

Bibliografía:

- Abbas, A. K. (2003). Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Saunders: pp 562.
- Actor, J. K., M. Shirai, *et al.* (1993). "Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 948-52.
- Alberts, B. (2002). Molecular biology of the cell. New York, Garland Science: 1363-1468.
- Allen, J. E., R. A. Lawrence, *et al.* (1996). "APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production." Int Immunol **8**(1): 143-51.
- Allen, J. E. and P. Loke (2001). "Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis." Parasite Immunol **23**(7): 345-52.
- Atochina, O., T. Daly-Engel, *et al.* (2001). "A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism." J Immunol **167**(8): 4293-302.
- Carreno, B. M. and M. Collins (2002). "The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses." Annu Rev Immunol **20**: 29-53.
- Chavarria, A., B. Roger, *et al.* (2003). "TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis." Microbes Infect **5**(12): 1109-15.

- Donnelly, S., S. M. O'Neill, *et al.* (2005). "Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages." Infect Immun **73**(1): 166-73.
- Faunce, D. E. and J. Stein-Streilein (2002). "NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8+ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance." J Immunol **169**(1): 31-8.
- Freeman, R. S 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). Canadian Journal of zoology 40: 969-990.
- Gause, W. C., J. F. Urban, Jr., *et al.* (2003). "The immune response to parasitic helminths: insights from murine models." Trends Immunol **24**(5): 269-77.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, *et al.* (2005). "The B7 family revisited." Annu Rev Immunol **23**: 515-48.
- Janeway, C. (1999). Immunobiology : the immune system in health and disease. London New York, NY, US, Current Biology Publications ; Garland Pub: pp 635
- Khoury, S. J. and M. H. Sayegh (2004). "The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity." Immunity **20**(5): 529-38.
- Kleinert, H., C. Euchenhofer, *et al.* (1996). "In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB." J Biol Chem **271**(11): 6039-44.

- Latchman, Y., C. R. Wood, *et al.* (2001). "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." Nat Immunol **2**(3): 261-8.
- Liang, S. C., Y. E. Latchman, *et al.* (2003). "Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses." Eur J Immunol **33**(10): 2706-16.
- Loke, P. and J. P. Allison (2003). "PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5336-41.
- Loke, P., A. S. MacDonald, *et al.* (2000). "Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact." Eur J Immunol **30**(9): 2669-78.
- Loke, P., M. G. Nair, *et al.* (2002). "IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype." BMC Immunol **3**: 7.
- MacMicking, J., Q. W. Xie, *et al.* (1997). "Nitric oxide and macrophage function." Annu Rev Immunol **15**: 323-50.
- Maizels, R. M. and M. Yazdanbakhsh (2003). "Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms." Nat Rev Immunol **3**(9): 733-44.
- Mannering, S. I., J. S. Morris, *et al.* (2003). "A sensitive method for detecting proliferation of rare autoantigen-specific human T cells." J Immunol Methods **283**(1-2): 173-83.
- Mantovani, A., P. Allavena, *et al.* (2004). "Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression." Eur J Cancer **40**(11): 1660-7.
- Mantovani, A., A. Sica, *et al.* (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-86.

- Nair, M. G., I. J. Gallagher, *et al.* (2005). "Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells." Infect Immun **73**(1): 385-94.
- Noel, W., G. Raes, *et al.* (2004). "Alternatively activated macrophages during parasite infections." Trends Parasitol **20**(3): 126-33.
- Raes, G., P. De Baetselier, *et al.* (2002). "Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages." J Leukoc Biol **71**(4): 597-602.
- Rodriguez-Sosa, M., J. R. David, *et al.* (2002). "Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling." J Immunol **168**(7): 3135-9.
- Rodriguez-Sosa, M., A. R. Satoskar, *et al.* (2002). "Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability." Infect Immun **70**(7): 3656-64.
- Rodriguez-Sosa, M., A. R. Satoskar, *et al.* (2003). "Altered T helper responses in CD40 and interleukin-12 deficient mice reveal a critical role for Th1 responses in eliminating the helminth parasite *Taenia crassiceps*." Int J Parasitol **33**(7): 703-11.
- Rodriguez, M., L. I. Terrazas, *et al.* (1999). "Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection." Parasite Immunol **21**(4): 177-85.
- Rogers, P. R. and M. Croft (2000). "CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen." J Immunol **164**(6): 2955-63.
- Roitt, I. M., J. Brostoff, *et al.* (2001). Immunology. Edinburgh ; New York, Mosby: pp 423

- Salama, A. D., T. Chitnis, *et al.* (2003). "Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **198**(1): 71-8.
- Sciutto, E., G. Fragoso, *et al.* (1995). "Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection." Infect Immun **63**(6): 2277-81.
- Smith, P., C. M. Walsh, *et al.* (2004). "*Schistosoma mansoni* worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages." J Immunol **173**(2): 1240-8.
- Stein, M., S. Keshav, *et al.* (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1): 287-92.
- Terrazas, L. I., R. Bojalil, *et al.* (1998). "Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)." J Parasitol **84**(1): 74-81.
- Terrazas, L. I., D. Montero, *et al.* (2005). "Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis." Int J Parasitol **35**(13): 1349-58.
- Terrazas, L. I., K. L. Walsh, *et al.* (2001). "The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections." J Immunol **167**(9): 5294-303.

- Toenjes, S. A., R. J. Spolski, *et al.* (1999). "The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response." Parasitology **118** (Pt 6): 623-33.
- Yamazaki, T., H. Akiba, *et al.* (2002). "Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC." J Immunol **169**(10): 5538-45.
- Yoshida, A., H. Maruyama, *et al.* (2000). "*Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice." Int Immunol **12**(8): 1117-25.