



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“Estudio de las células T reguladoras durante la
inmunosupresión en el modelo murino de la
Toxoplasmosis”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

LIBB. EDA PATRICIA TENORIO ZUMÁRRAGA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL SAAVEDRA DURÁN

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F. Noviembre 2011



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.

Este trabajo se realizo bajo la supervisión del Dr. Rafael Saavedra Durán en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad Universitaria, UNAM.

El Comité Tutorial estuvo integrado por:
Dr. Edgar Zenteno Galindo
Dr Enrique Ortega Soto

La beca de estudios de posgrado fue otorgada por CONACyT con el Número de Registro de Becario 199991

Este trabajo fue apoyado por los proyectos:

PAPIIT .(DGAPA UNAM) IN-200608

PAPIIT .(DGAPA UNAM) IN-209111

CONACyT 79775

CONACyT 102399

CONACyT 102984

Agradecimientos

A mi Tutor y al Comité Tutorial,

Por su apoyo, consejos y críticas indispensables para realizar este trabajo

Dr. Rafael Saavedra Durán

Dr. Edgar Zenteno Galindo

Dr. Enrique Ortega Soto

Al Subcomité de Candidatura al Grado de Doctor,

Por el ánimo, los comentarios y observaciones:

Dra. Ingeborg Becker Fauser

Dr. Enrique ortega Soto

Dr. Pascal Herión Scohy

Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez

Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

Dra. Patricia Tato Saldivar

Dr. César Raúl González Bonilla

Al Jurado para Examen de Grado

Por sus correcciones, consejos y ayuda

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Dr. Cesar Raúl González Bonilla

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

Dr. Rafael Saavedra Durán

A los Técnicos,

Por su apoyo, ayuda, consejos y su trabajo siempre profesional

Dra. Jacqueline Fernández Vargas

QFB. Carlos Castellanos Barba

Al personal del Bioterio

Por ser siempre de gran ayuda y su excelente manejo y cuidado de los animales

MVZ Georgina Díaz Herrera

MVZ Jorge Omar García

A la Dra. Katharine A. Muirhead

Por recordarme que, como dijo A. Einstein: "Locura es hacer la misma cosa una y otra vez esperando obtener diferentes resultados".

Agradezco también a los que con su compañía me han hecho mejor y definen la felicidad,

A mi familia,

A Patricia, Karla y Juan Carlos que están siempre junto a mí, ayudándome y recordándome que son la parte incondicional que me rodea. Por ayudarme a ser y a hacer

A Elisa y Héctor que siempre me cuidan, etéreos... siempre conmigo

A Hilda, Fabiola, Héctor y Liliana que me regalan siempre buenos momentos

A Héctor, Eréndira, Kikis, Ale y Alex que siempre están al pendiente de mí, por quererme

A mis amigos,

A Alejandro y Agustín, que siguen siendo mi roca de apoyo

A Karla y Estela, los años pasan y nosotras igual! Gracias por seguir siempre a mi lado

A Paco, Luis, Maritrini, Charis y Cristina, que compartimos risas, lágrimas y cuando estamos juntos aligeramos el mundo

A Erika, por sufrir conmigo, escuchar, hacerme reír, por volverse gran parte de mi vida

A Lorena, que sin saber cómo, hicimos una gran conexión, por escucharme siempre

A Margarita, que regresó para quedarse y ver que su trabajo rinde frutos

A Jacqueline, que hemos compartido tanto, y que sin su ayuda esto no sería lo mismo

A Rafael, por hacerme así como soy, porque después de tantos años sigue siendo la mejor persona para discutir y por ser tan parte de mí

A Edgar Z, por las horas de terapia, las pláticas, los consejos, por darme tanto, por permitirme considerarte mi amigo

A mis amigos con los que siempre puedo contar para un buen momento: Ángel, Omar, Nohemí, Gaby M, Gonzalo, David, Diego y Leslie.

A Mi Universidad, Mi casa, Mi hogar, Mi UNAM

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaciones	3
I. Introducción	4
1 <i>Toxoplasma gondii</i>	4
2 Células T reguladoras	16
II. Antecedentes Directos y Justificación	25
1 Inmunosupresión durante la infección con <i>T. gondii</i>	25
2 Justificación	26
III. Hipótesis y Objetivos	27
1 Hipótesis	27
2 Objetivos	27
IV. Material y Métodos	28
1 Animales y parásitos	28
2 Medios de Cultivo, Soluciones e Hibridomas	29
3 Obtención de Esplenocitos de Ratón	30
4 Citometría de Flujo	31
5 Detección de Moléculas Intracelulares	35
6 Aislamiento de Subpoblaciones Celulares	37
7 Ensayos de Supresión	38
8 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo	39
9 Cuantificación de NO ₂ ⁻ en sobrenadante de cultivo	40
10 Software de Análisis y Estadística	40
V. Resultados	42
1 Caracterización de la inmunosupresión observada durante la infección aguda con <i>T. gondii</i> .	43
2 Caracterización de las células T _{reg} y su papel durante la inmunosupresión	51
3 El mAb anti-CD25 como herramienta para el estudio de las células T _{reg} durante la infección con <i>T. gondii</i>	70
VI. Discusión	94
VII. Conclusiones	103
VIII. Perspectivas	104
IX. Referencias	105

Resumen

Durante la infección con *Toxoplasma gondii* se ha reportado un periodo de inmunosupresión que se caracteriza por la incapacidad de los linfocitos T de responder a estímulos mitogénicos y antigénicos. Las células T reguladoras (T_{reg}) tienen la capacidad de modular la proliferación de diversas poblaciones celulares y debido a esta propiedad, propusimos la hipótesis de que las células T_{reg} participan en el proceso de inmunosupresión observado durante la infección aguda con el parásito *T. gondii*. En este trabajo demostramos que en una cepa de ratón susceptible a la infección (C57BL/6J) la supresión afecta a los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ pero no a los linfocitos B. El análisis de las células T_{reg} demostró que durante el periodo de supresión esta población se reduce pero las células T_{reg} restantes se activan e incrementan su capacidad supresora. La eliminación específica de células T_{reg} revierte la supresión en su totalidad demostrando que esta población celular es la responsable de dicho proceso. Análisis de los posibles mecanismos de supresión demuestran que las células T_{reg} inducen la inmunosupresión a través de un mecanismo independiente de IL-10, pero relacionado con la IL-2, probablemente por privación de esta última.

La depleción con el anticuerpo anti-CD25 es una herramienta comúnmente utilizada para la eliminación de las células T_{reg} a pesar de la posibilidad de eliminar también otras poblaciones de células activadas. En este trabajo evaluamos las poblaciones celulares eliminadas después de la depleción y la infección con *T. gondii* en una cepa resistente y en una susceptible a la infección, C57BL/6J y BALB/c, respectivamente. Encontramos que el tratamiento con el anticuerpo antes de la infección elimina principalmente células NK positivas para CD25 en ratones C57BL/6J y células T_{reg} en ratones BALB/c, por lo que el tratamiento con el mAb anti-CD25 en la cepa susceptible es inviable para el estudio de las T_{regs} . En los ratones BALB/c el tratamiento con el mAb reduce la sobrevivencia de los ratones a la infección debido a la reducción en la proporción de T_{regs} , lo cual sugiere que estas células son importantes para la resistencia a la infección. Los resultados presentados en este trabajo ofrecen un nuevo panorama de la inmunomodulación hasta ahora reportada durante la infección *T. gondii*.

Abstract

Acute infection with the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* comprises a period of immunosuppression characterized by a reduced T cell proliferative response to mitogens and antigens. T_{reg} cells modulate the proliferation of different cell subsets, due to this characteristic we aimed to determine if this population modulates the immunosuppression observed during acute *T. gondii* infection. We found that in the susceptible mouse strain C57BL/6J both CD4⁺ and CD8⁺ T cells but not B cells are suppressed. T_{reg} cells analysis showed that this population is reduced during immunosuppression; however the remaining cells displayed an activated phenotype and acquired a higher suppressive capacity. Specific T_{regs} elimination leads to a full recovery of T cell proliferation, demonstrating that T_{regs} mediate suppression. Analysis of different suppression mechanisms showed that T_{regs} induce immunosuppression independently of IL-10 but through an IL-2 related mechanism, probably IL-2 deprivation.

Depletion with anti-CD25 mAb is a tool commonly used to eliminate T_{reg} cells despite the possibility of eliminating other activated cell subsets. We evaluated herein which cell populations were eliminated after depletion and infection using the susceptible mouse strain C57BL/6J and the resistant strain BALB/c. We found that mAb treatment prior to infection eliminates mainly activated NK cells in the susceptible mouse strain and T_{regs} in the resistant mouse strain, demonstrating that in the C57BL/6J infection model depletion with the anti-CD25 mAb is useless for T_{reg} analysis. Anti-CD25 treatment in BALB/c mice reduces survival to infection due to a reduced proportion of T_{regs}, suggesting that these cells are important for the resistance to infection. Our results open a new insight in the immunomodulation previously reported for *T. gondii* infection.

Abreviaciones

APC	Células presentadoras de antígeno
CFSE	5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
ConA	Concanavalina A
DC	Células Dendríticas
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dpi	Días post infección
FSC	Forward Scatter (tamaño)
i.p.	Vía Intraperitoneal
KO	Knock Out
mAb	Anticuerpo monoclonal
NRI	Intermediarios reactivos de nitrógeno
PBS	Phosphate Buffered Saline
SFB	Suero Fetal Bovino
SN	Sobrenadante
SSC	Side Scatter (granularidad)
T _{conv}	T convencionales (linfocitos CD4 ⁺ Foxp3 ⁻)
T _{reg}	T reguladoras (linfocitos CD4 ⁺ Foxp3 ⁺)
T.A.	Temperatura ambiente
7-AAD	7-aminoactinomicina D

I. Introducción

1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligatorio del *phylum* Apicomplexa capaz de infectar cualquier animal de sangre caliente, fue descubierto hace poco más de cien años por Nicolle y Manceaux en el roedor gundi (*Ctenodactylus gundi*) en Túnez [1] y al mismo tiempo fue descrito por Splendor en conejos en Brasil [2]. El nombre de *Toxoplasma* viene del griego *toxos*, que quiere decir "Forma de arco", lo cual deriva de la forma del parásito observada por los descubridores, mientras que *gondii* viene del nombre del roedor en el que fue descubierto por Nicolle y Manceaux (Tabla 1) [3, 4]. Durante años el parásito fue encontrado en diferentes animales y la especie era nombrada de acuerdo al animal donde se había encontrado, hasta que se descubrió que todos pertenecían a la misma y única especie: *Toxoplasma gondii* [4, 5]. Sin embargo, fue hasta 20-25 años después de su descubrimiento que se estableció como un patógeno causante de infecciones en humanos (Tabla 1) y fue hasta la década de los ochenta que adquirió una gran importancia como enfermedad oportunista en los pacientes con VIH (Tabla 1) [3, 5].

La toxoplasmosis se ha descrito como una enfermedad asintomática en individuos inmunocompetentes debido a la gran cantidad de personas seropositivas al parásito que no presentan signos de la enfermedad. Sin embargo, análisis recientes de brotes de toxoplasmosis sugieren que únicamente el 25% de los casos son realmente asintomáticos. La característica asintomática de esta enfermedad parece ser en realidad un problema de diagnóstico, ya que los síntomas que se presentan son demasiado generales, por ejemplo: pirexia, linfadenopatía, dolor muscular y malestar general [6]. Sin embargo, los sujetos inmunocompetentes son capaces de responder a la infección y controlarla (Tabla 2).

Perspectiva histórica de la Toxoplasmosis	
1908	Nicholle & Manceaux – Observan el organismo en el roedor africano <i>Ctenodactylus gundi</i> y le dan el nombre de <i>Toxoplasma gondii</i> .
1908	Splendore - Encontró al parásito en conejos
1923	Janku – Reportó el primer caso de coriorretinitis en un niño, encontró parásitos en el ojo y los llamó “esporozoa”
1928	Levaditi – Identificó este “esporozoa” como <i>Toxoplasma gondii</i>
1938	Wolf & Cowan – Identificaron a <i>T. gondii</i> como el agente causal de la encefalitis neonatal: primer reporte de la transmisión congénita de <i>T. gondii</i>
1940	Pinkerton & Weinman – Reportaron un caso fatal de toxoplasmosis diseminada en un adulto
1941	Sabin – Describió una triada de signos en un niño con toxoplasmosis congénita (retinocoroiditis, hidrocefalea y calcificación cerebral)
1948	Sabin & Feldman – Desarrollan la prueba diagnóstica que aún se usa como estándar
1952	Slim – Describe una forma “glandular” durante la infección con toxoplasma
1954	Jacobs et al. – Aíslan <i>T. gondii</i> del ojo de un paciente con coriorretinitis
1954	Weinman & Chandler – Sugieren que la transmisión de toxoplasma se relaciona con la ingestión de carne de cerdo mal cocida
1960	Jacobs, Remington et al. – demuestran que los quistes obtenidos de tejidos son resistentes a enzimas proteolíticas
1965, 1969	Hutchinson – Descubre <i>T. gondii</i> en heces felinas y reconoce al gato como el huésped definitivo
1969	Wallace – Hace un estudio epidemiológico en algunas islas de Pacífico indicando la importancia del gato en la transmisión de la infección a humanos
1970	Dubey, Millar & Frenkel – El descubrimiento de la fase sexual y los ooquistes en el intestino delgado de los gatos clarificó el ciclo de vida de <i>T. gondii</i> e indicó que era un parásito coccidio
1970s	Incrementa la conciencia de los riesgos para el feto como consecuencia de una infección aguda de toxoplasmosis durante el embarazo
1980s	La toxoplasmosis emerge como una infección que amenaza la vida en pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos con SIDA

Tabla 1. Perspectiva histórica de la Toxoplasmosis. Traducido de Toxoplasmosis: A comprehensive clinical Guide [7].

La toxoplasmosis es un problema grave para individuos inmunosuprimidos y para mujeres embarazadas. En el caso de los individuos inmunosuprimidos, como consecuencia de la infección con VIH o por tratamiento médico, los pacientes son incapaces de controlar la parasitosis en caso de una reactivación y desarrollan encefalitis toxoplásmica, que suele ser fatal. Estos pacientes no están exentos de una infección primaria pero el escenario más común es el de la reactivación de la infección (Tabla 2) [8-10]. En las mujeres embarazadas la toxoplasmosis genera complicaciones cuando es una infección primaria. Si la infección primaria ocurre antes de las 20 semanas de embarazo pueden ocurrir serios daños al feto como coriorretinitis, hidrocefalia, calcificación intracraneal e incluso se puede inducir un aborto. Después de las 20 semanas de

embarazo se reduce considerablemente la probabilidad de que el feto presente alguno de los síntomas antes mencionados. Sin embargo, si una mujer llega a reinfectarse durante el embarazo el sistema inmune es capaz de controlar la infección. (Tabla 2).

Infección con <i>T. gondii</i> en diferentes pacientes		
Paciente	Efectos de la infección.	Referencias
Inmunocompetente	Normalmente son asintomáticos o presentan síntomas de malestar general (pirexia, linfadenopatía, dolor muscular).	[6, 10, 11]
Inmunosuprimidos	La infección primaria llega a ocurrir pero en frecuencias muy bajas. Es más común que el problema sea causado por la reactivación de la infección.	[8-10]
VIH ⁺	La reactivación se observa generalmente en pacientes con cuentas de CD4 ⁺ menores a 100 células/ μ l.	
VIH ⁻	Pacientes en alguna de las siguientes condiciones: Receptores de trasplantes. En quimioterapia. En tratamientos con corticosteroides. Con enfermedades del tejido conectivo.	
Mujeres Embarazadas	La probabilidad de la infección incrementa con la edad gestacional pero el riesgo de que el feto sufra síntomas clínicos severos se reduce con la edad gestacional	[10, 12-14]
Infección primaria	La mayoría de las mujeres no presentan síntomas. Antes de las 20 semanas el feto puede presentar: Corioretinitis. Hidrocefalia. Calcificación intracraneal. Aborto. Después de las 20 semanas es muy baja la probabilidad de observar malformaciones.	
Reactivación o Reinfección	La reactivación se ha descrito en mujeres inmunosuprimidas . Sólo hay 6 casos reportados de mujeres que se reinfectaron durante el embarazo.	

Tabla 2 Infección con *T. gondii* en diferentes pacientes

Actualmente se sabe que la toxoplasmosis está ampliamente distribuida y se estima que un tercio de la población mundial está infectada [15], sin embargo, existe una gran diversidad en la prevalencia, pues se reportan valores desde <1% en la región de Shangdong en China hasta 83.5% en Madagascar [16] (Figura 1). En México está reportado que la seropositividad promedio es del 30% [17, 18]. En la figura 2 observamos que la mayor prevalencia se encuentra en las zonas costeras, particularmente en Colima, Nayarit, Campeche, Veracruz y Tabasco (>60%, rojo) y la menor al norte del país, en los estados de Baja California Sur, Sonora, Durango, Aguascalientes y San Luis Potosí (10-20%, naranja); esto se relaciona directamente con los estadios infectivos del parásito (ver más adelante, ciclo de vida). Otros datos importantes presentados en este estudio indican que hombres y mujeres se infectan en la misma proporción y que en las zonas norte y

centro del país la mayor seroprevalencia se observó en zonas de bajos niveles socioeconómicos, mientras que en las zonas costeras no se observó influencia del estrato social [18].

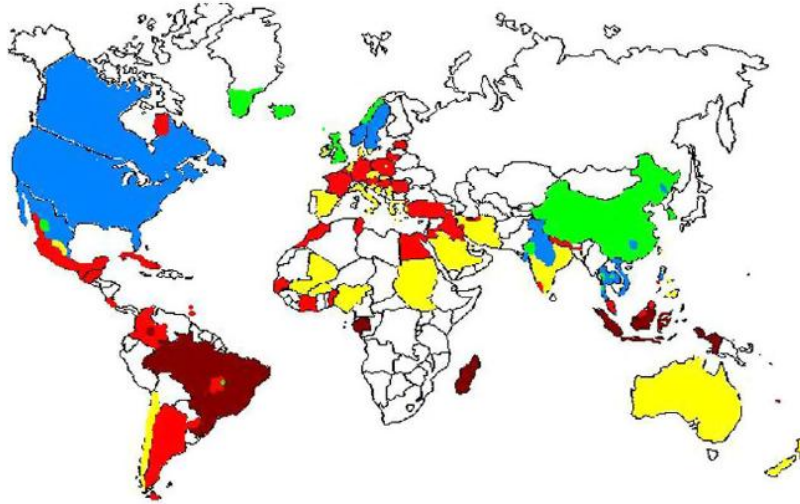


Figura 1 Estado global de la seroprevalencia anti-*T. gondii*. Rojo oscuro: >60%, rojo claro 40-60%, amarillo 20-40%, azul 10-20%, verde <10% y blanco no hay datos disponibles [16] .



Figura 2 Seroprevalencia de *T. gondii* en México. Rojo >60%, amarillo 50-60%, verde 40-50%, azul 30-40%, cian 20-30%, naranja 10-20% Adaptado de Velasco-Castrejón et al. [18].

1.1. Ciclo de vida

Toxoplasma gondii tiene tres estadios infecciosos: el taquizoíto (Fig. 3A), caracterizado por su capacidad de proliferar a gran velocidad; el quiste tisular que contiene a los bradizoítos (Fig. 3B), y el ooquiste, que contiene a los esporozoítos (Fig. 3C). Los taquizoítos tienen forma oval arqueada, miden aproximadamente $2 \times 6 \mu\text{m}$ (Fig. 3A) e invaden a las células penetrándolas activamente o por fagocitosis. Una vez dentro, el parásito queda rodeado por una vesícula parasitófora y se multiplica asexualmente por endodiogenia, un proceso en el que 2 células hijas se forman dentro de la célula madre dejándola intacta. La célula invadida se lisa después de que el parásito se ha dividido varias veces y estos pueden invadir a otras células. El taquizoíto puede dividirse en cualquier tipo celular excepto en eritrocitos [19, 20].

Los bradizoítos se encuentran dentro de los quistes, tienen una morfología prácticamente igual a la de los taquizoítos y al igual que éstos se dividen por endodiogenia, sin embargo, lo hacen a una velocidad muy baja. Los quistes son de diferentes tamaños ($5-100 \mu\text{m}$) y pueden contener desde 2 hasta miles de bradizoítos (Fig. 3B). Generalmente se encuentran en cerebro, ojos, músculo esquelético y tejido cardiaco aunque también se pueden encontrar en pulmones, hígado y riñones [19, 20]. Todavía se desconocen los agentes que inducen la conversión de taquizoíto a bradizoíto y viceversa, no obstante, se ha sugerido que podrían participar factores como el pH, choque térmico, inhibición mitocondrial, óxido nítrico, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-12 [21].

El ooquiste es el resultado de la división sexual del parásito en el intestino de los felinos (ver más adelante). Cuando es excretado por los felinos se encuentra en forma no esporulada y mide entre 10 y 12 μm de diámetro (Fig. 3C). En las condiciones adecuadas de humedad y temperatura los ooquistes esporulan (Fig. 3C) y se vuelven infecciosos; esto puede tomar entre 1 y 5 días [19, 20, 22]. Los ooquistes son muy resistentes a diferentes condiciones ambientales; por ejemplo, se ha reportado que en suelos húmedos la infectividad de los quistes puede mantenerse por más de 1 año [22]. Esta resistencia de los ooquistes se relaciona directamente con la epidemiología reportada, por ejemplo, en México, donde la seroprevalencia es más alta en zonas costeras. Este parásito tiene la capacidad de dividirse asexualmente en cualquier tipo

celular pero su ciclo de vida comprende una fase sexual (ciclo enteroepitelial) que sólo puede llevarse a cabo en el intestino de los felinos, que son sus huéspedes definitivos [23, 24].

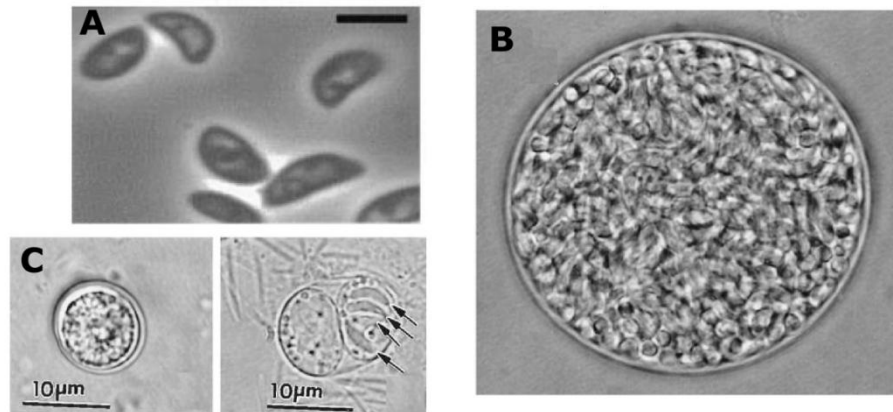


Figura 3 Estadios infecciosos de *T. gondii*. Observación por microscopía de campo claro de: (A) Taquizoítos (barra, 10 µm) [25] (B) bradizoítos enquistados [19] y (C) ooquistes sin esporular y esporulados, las flechas señalan a los esporozoítos [19] .

1.1.1. Fase Sexual

Cuando un felino ingiere alguna de las formas infectivas del parásito, éste llega al epitelio intestinal y se replica varias veces. Los parásitos se reproducen y pasan por varios estadios, denominados A-E, que llevan a la formación de los gametos masculinos y femeninos, microgametos y macrogametos respectivamente [19, 20, 22] (Fig. 4). El microgameto fertiliza al macrogameto que se encuentra en el enterocito creando un cigoto que se convertirá en el ooquiste cuando se forme una pared a su alrededor (Fig. 4) [19, 20]. El tiempo transcurrido entre la ingestión del parásito y la excreción de los ooquistes va de 3 a 10 días, pero este tiempo depende del estadio infectivo del parásito que haya ingerido el animal. Después de este periodo, la producción de ooquistes dura entre 7 y 20 días, siendo los días 5-8 el pico de excreción, cuando los animales pueden producir más de 10 millones de ooquistes por día. En total, un gato puede excretar más de mil millones de ooquistes [22]. Regularmente, los gatos que ya han excretado ooquistes se vuelven inmunes al parásito y ya no excretan ooquistes en el caso de una reinfección [20].

1.1.2. Fase Asexual

Los ooquistes excretados requieren de un periodo de entre 1-5 días en condiciones apropiadas de humedad y temperatura para esporular y volverse infecciosos (Fig. 4) [22]. Éstos contaminan agua y comida y es así que son ingeridos por los huéspedes intermediarios, entre ellos los humanos (Fig. 4). Después de ingerir ooquistes o quistes, estas estructuras se deshacen en el estómago por efecto de las enzimas gástricas, liberando los esporozoítos o los bradizoítos y convirtiéndolos en taquizoítos. Durante la fase aguda de la infección los taquizoítos se replican rápidamente y se diseminan por todo el organismo. Posteriormente, en la fase crónica los taquizoítos se convierten en bradizoítos y se forman los quistes tisulares, principalmente en cerebro y músculo. La ingestión de quistes en carne contaminada lleva a la infección en los huéspedes intermediarios y en los huéspedes definitivos, cerrando así el ciclo de vida del parásito (Fig. 4) [20, 26].

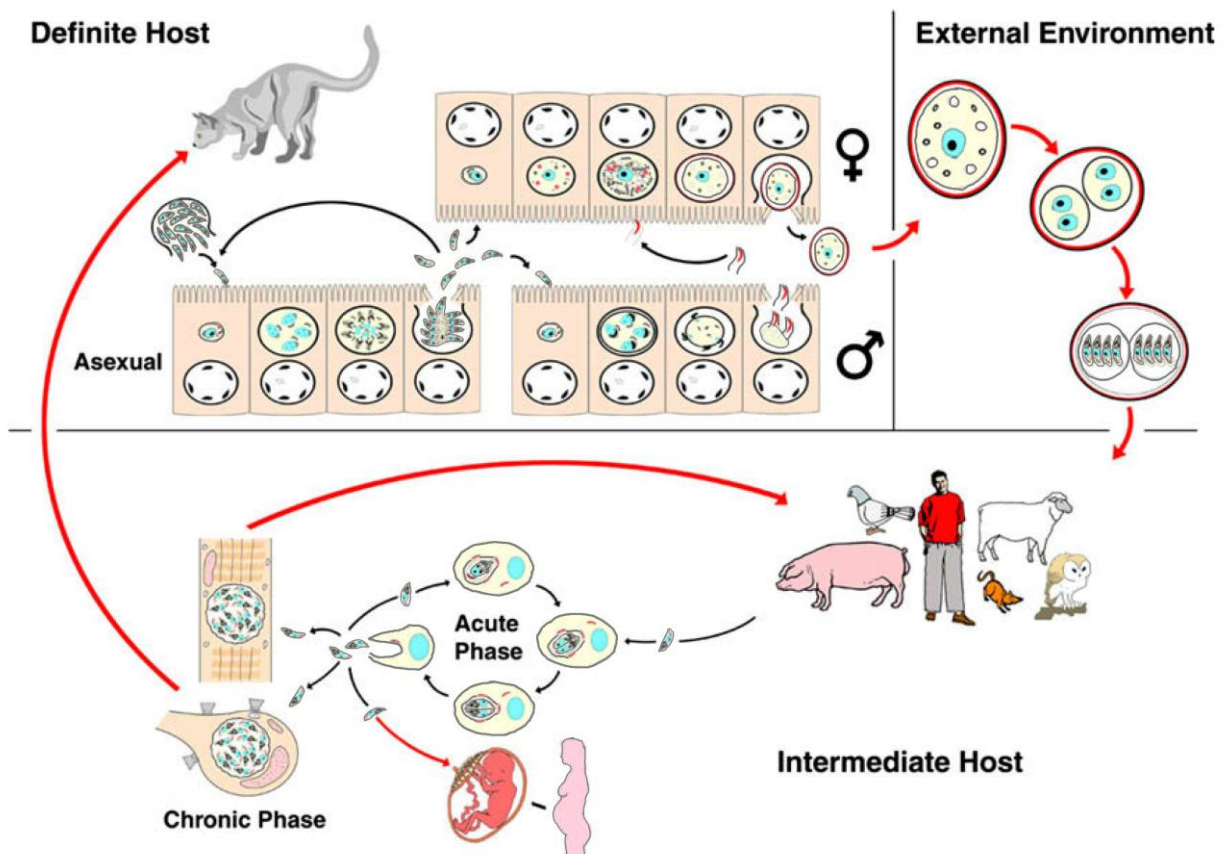


Figura 4 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* [27].

1.2. La respuesta inmune contra *T. gondii*

T. gondii es un organismo modelo para el estudio de la inmunología, por lo que la respuesta inmune contra éste parásito ha sido bien caracterizada. La primera citocina que aparece en respuesta a la infección es la IL-12 que puede ser producida por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas [28-32], siendo estas últimas las principales productoras de dicha citocina [33]. La alta producción de IL-12 por células dendríticas se debe por un lado a la ciclofilina-18, una molécula secretada por el parásito que se une a CCR5 [34] y por el otro a la profilina, que se une a TLR 11 [35, 36] (Fig. 5). Esta gran cantidad de IL-12 lleva a la activación de células NK y de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y consecuentemente a la producción de altos niveles de IFN- γ , polarizando la respuesta hacia T_H1 [28, 37, 38] (Fig. 5).

El IFN- γ es indispensable para el control de la infección ya que activa a los macrófagos para que puedan llevar a cabo sus funciones efectoras [39-42]. La activación de los macrófagos hace que estas mismas células produzcan TNF- α , el cual funciona como cofactor ayudando a que los macrófagos lleven a cabo las funciones efectoras que dan como resultado la inhibición de la replicación y la eliminación del parásito [43, 44] (Fig. 5). Estas funciones efectoras incluyen la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno (NRI) [43, 45], de especies reactivas de oxígeno [46-48], la acumulación de GTPasas p47 en las vacuolas parasitóforas [49, 50] y la degradación de triptófano (Fig. 5) [51-53]. Recientemente, se reportó que los macrófagos también controlan al parásito por autofagia de manera independiente de IFN- γ y TNF- α (Fig. 5) [54-57].

Los linfocitos T tienen un papel crucial en la respuesta inmune contra *T. gondii*, tanto en el control de la fase aguda como en el control de la reactivación durante la fase crónica [58-60]. La cooperación entre linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ es sinérgica [61] y se requiere la producción de IFN- γ por parte de ambas poblaciones, aunque la mayor proporción de esta citocina es producida por los linfocitos CD8⁺ [60, 62, 63]. Se ha demostrado que después de la infección los linfocitos CD4⁺ se activan y producen IL-2, la cual ayuda a los linfocitos CD8⁺ a optimizar y mantener su producción de IFN- γ [58, 64, 65] (Fig. 5). Además de su alta producción de IFN- γ , los linfocitos CD8⁺ participan en la eliminación del parásito ejerciendo su actividad citotóxica sobre células infectadas [66, 67] (Fig. 5). Se ha reportado que la presentación de antígenos del

parásito a linfocitos CD8⁺ depende de la aminopeptidasa ERAAP en el retículo endoplásmico [68] (Blanchard 2008) y se ha sugerido que la fusión del retículo endoplásmico del huésped con la vacuola parasitófora es el conducto para el transporte de antígenos entre la vacuola parasitófora y el citosol del huésped, permitiendo que los antígenos entren a la vía de presentación por MHC clase I [69].

La respuesta T_{H1} es crucial para el control de la infección, pero una respuesta exacerbada de este tipo tiene como consecuencia serios daños para el huésped, por lo tanto la regulación de la respuesta inmune durante la infección tiene un papel tan importante como la activación de la misma. Existe un mecanismo dependiente de TGF-β independiente de linfocitos T para la regulación de IL-12 [70] y se ha demostrado que después de la infección los macrófagos producen TGF-β, lo cual lleva a una reducción en la producción de TNF-α y de su receptor [71, 72]. El efecto autócrino del TGF-β conlleva a la inducción de apoptosis en monocitos [73] y la inhibición de producción de óxido nítrico en macrófagos [74]. Recientemente se demostró que esta citocina es importante para la inmunorregulación de la infección con *T. gondii* en intestino [75] y contrariamente a lo sugerido anteriormente, la producción de esta citocina depende de los linfocitos intraepiteliales CD8^{αβ} TCR^{αβ} (Fig. 5) [76, 77].

La IL-10 inhibe las funciones efectoras de macrófagos activados por IFN-γ [78] y es una citocina importante tanto en la infección primaria como durante la respuesta a la encefalitis toxoplásmica pero no es necesaria para la generación de memoria inmunológica (Fig. 5) [79-81]. Los animales IL-10^{-/-} mueren durante la fase aguda de la infección con necrosis en el hígado y el intestino delgado, ya que son incapaces de controlar la producción exacerbada de IL-12, IFN-γ y TNF-α [82-84]. Se ha reportado que la IL-10 producida por los linfocitos CD4⁺ es la que está involucrada en la inmunomodulación durante la infección [85], sin embargo, son estas mismas células las que se han descrito como causantes de la patología observada durante la infección [64, 82, 83]. Esta contradicción puede explicarse con un reporte reciente que sugiere que los linfocitos T CD4⁺ T_{H1} juegan un papel dual durante la infección ya que producen tanto IFN-γ como IL-10 [86]. Recientemente se reportó que también las células NK producen IL-10 durante la fase aguda de la infección, particularmente en hígado y pulmón, lo cual limita la producción de IL-12 por células dendríticas (Fig.5) [87].

La IL-27 también participa en el control de la respuesta inflamatoria observada durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* [88, 89]. Los ratones deficientes en el receptor de dicha citocina desarrollan una hiperactividad de linfocitos T caracterizada por la alta producción de IFN- γ y los animales mueren a causa de una inflamación descontrolada [90]. Se ha sugerido que la IL-27 es producida por las DCs y limita el desarrollo de una respuesta T_{H1} a través de la inhibición de la producción de IL-2 (Fig. 5) [91].

El eicosanoide lipoxina_{A4} se reportó como modulador de la respuesta inmune contra *T. gondii* tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección. Si bien no se ha determinado cuál es la(s) célula(s) productora de esta molécula durante la infección, se ha reportado que la lipoxina_{A4} regula la producción de IL-12 por células dendríticas y que su inmunomodulación es independiente de la IL-10 (Fig. 5) [92-94]

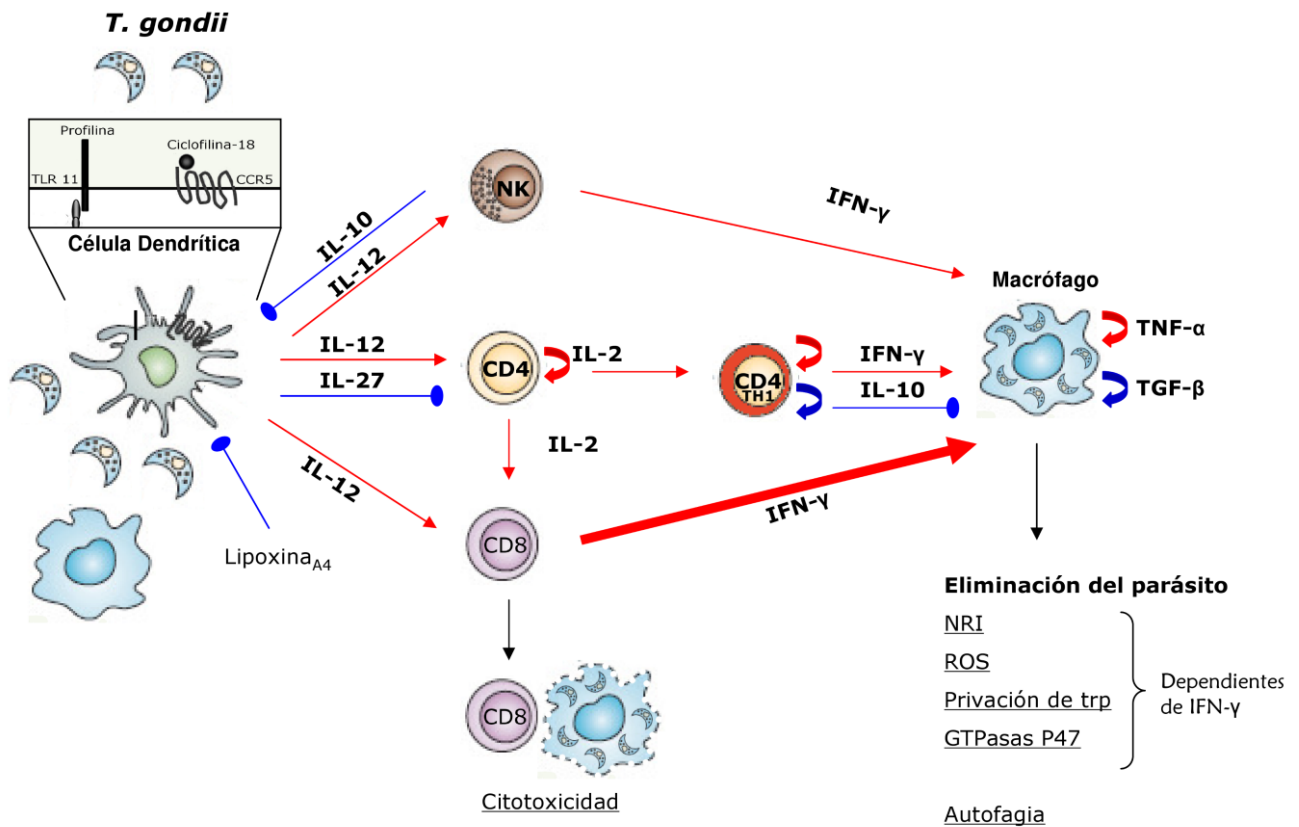


Figura 5 Respuesta inmune contra *T. gondii*. Adaptado de Aliberti [94], Lang [79], Denkers [32] y Hunter [88]

1.3. Susceptibilidad y resistencia a la infección con *T. gondii* en el modelo murino

Una de las herramientas más importantes para el estudio de la infección con *T. gondii* son los modelos de susceptibilidad y resistencia. Esto depende por un lado de la cepa de ratón que se utiliza para la infección y por el otro de la virulencia del parásito con el que se infecta. La virulencia de *T. gondii* se determina con la dosis letal del 100% (LD₁₀₀) en ratones de cepa abierta infectados con taquizoítos. Las cepas virulentas tienen una LD₁₀₀=1 y las cepas avirulentas tienen una LD₁₀₀ ≥10³ [95, 96].

T. gondii es la única especie de su género pero estudios genéticos han determinado que existen 11 haplogrupos definidos por polimorfismos en intrones en los locus UPTR (intrones 1 y 7 cromosoma XI), MIC2 (intrones 1 y 3 cromosoma VIIa), BTUB (intrones 1 y 2 cromosoma IX), EF1 (intron 1 cromosoma X) y HP (intron 2 cromosoma IV) [97, 98]. Las cepas de los tipos I, II y III predominan en Norte América y en Europa, fueron las primeras que se describieron [99, 100] y son con las que más estudios inmunológicos se cuentan. Las cepas IV a XI fueron descritos más recientemente y comprenden principalmente parásitos de Sudamérica, donde se ha reportado una gran variabilidad [97]. Las cepas tipo I se caracterizan por su alta virulencia, pero se encuentran en baja proporción en muestras aisladas de pacientes [95, 99-101]. Se ha reportado que en casos severos de toxoplasmosis congénita hay una mayor frecuencia de parásitos de este tipo de cepa, por lo que la patogenicidad de la misma parece afectar también a humanos [96, 102]. Las cepas tipo I incluyen a la RH y la PT que fueron obtenidos de aislados humanos en el año 1940 en E.U.A y en el año 1984 en Francia respectivamente [101]. Se ha descrito que la virulencia de las cepas tipo I se debe a loci que se encuentran en los cromosomas VII y IV del parásito [96]. Las cepas tipo II son avirulentas y dan lugar a infecciones crónicas. Este tipo de parásito es el que se ha encontrado en más del 70% de los aislados de pacientes [99, 100]. Debido a esto último, las cepas tipo II se utilizan comúnmente para el estudio de la toxoplasmosis en el modelo murino, entre las que se encuentran la ME49, aislada de un borrego en el año 1965 en E.U.A. y la cepa Beverly, obtenida de un aislado clínico en Inglaterra en 1959 [101]. Las cepas tipo III también son avirulentas, se han encontrado en baja frecuencia en aislados de pacientes pero son más comunes en muestras aisladas de diferentes tipos de animales [99, 100].

La resistencia y susceptibilidad a la infección con *T. gondii* es difícil de definir en el modelo murino, ya que depende del fondo genético del ratón, del tipo de cepa de parásito que se utilice para la infección, del tamaño del inóculo, de la vía de infección y del periodo de la infección a evaluar [103-105]. Todas las cepas de ratón son susceptibles a las cepas tipo I de *T. gondii*, sin embargo, al infectar con cepas tipo II se observa que existen diferentes niveles de susceptibilidad y resistencia al parásito. En la Figura 6 podemos observar que después de la infección con 100 quistes de la cepa ME49 por vía oral, las cepas A/J, C3He/J y DBA/2J son resistentes, las cepas DBA/1J y BALB/c son medianamente resistentes y las cepas C57L/J, SJL/J, SB/LE y C57BL/6J son susceptibles [106]. Existe evidencia de que los haplotipos H2d y H2k contribuyen a la resistencia mientras que los haplotipos H2a y H2b favorecen a la susceptibilidad [104], aunque también existen cepas de *T. gondii* que inducen respuestas inmunes independientes del haplotipo del animal [107]. Otros estudios indican que la cepa BALB/c es susceptible a la fase aguda de la infección pero resistente a la fase crónica, contrario a lo reportado en la cepa CBA/Ca [105].

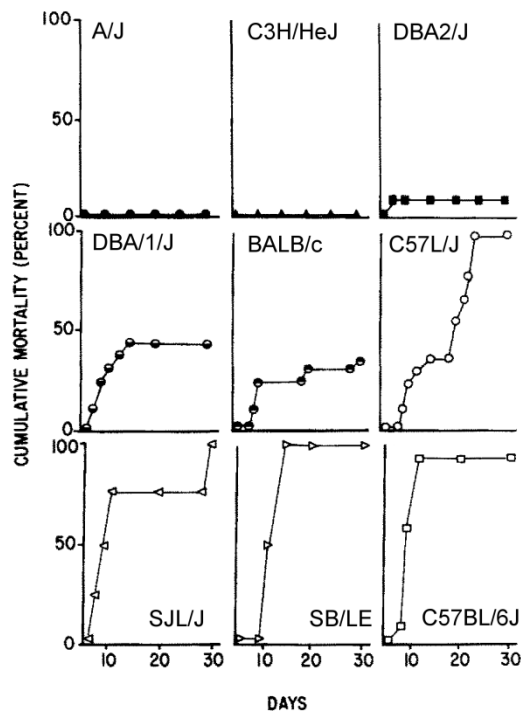


Figura 6 Sobrevivencia de diferentes cepas de ratones singénicos a la infección con *T. gondii*. Los animales fueron infectados con 100 quistes de la cepa ME49 por vía oral y se monitoreó la sobrevivencia durante 30 días. Adaptado de McLeod 1989 [106].

2 Células T reguladoras

Los linfocitos CD4⁺ son una población celular que se clasifica en cuatro linajes efectores, células T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} y T_{regs}. Cada subtipo se caracteriza por la producción de un patrón de citocinas y por la expresión de factores de transcripción específicos (Tabla 3); sin embargo existe una gran heterogeneidad dentro de cada linaje. Se han descrito otras poblaciones como las T_{H3}, T_{H9}, T_{R1} y T_H foliculares que podrían ser linajes independientes, sin embargo, esto aún es materia de debate y todavía se les considera como parte de la gran diversidad de subtipos de linfocitos T_H. Estudios recientes han demostrado que los linfocitos CD4⁺ tienen gran flexibilidad y plasticidad, ya que dependiendo del microambiente linfocitos CD4⁺ efectores ya diferenciados pueden expresar citocinas y factores de transcripción característicos de otros linajes. La plasticidad de linfocitos CD4⁺ es un tema de estudio importante actualmente, ya que existen implicaciones terapéuticas importantes [108-110].

Linaje	Función efectora	Factor de Transcripción característico	Citocinas características	Subtipos dentro del linaje
T _{H1}	Inmunidad contra microorganismos intracelulares	STAT4 T-bet	IFN-γ	T _{H1} productoras de IL-10 T _{R1} ?
T _{H2}	Inmunidad contra helmintos y otros patógenos extracelulares	STAT6 GATA3	IL-4 IL-5 IL-13	T _{H9} ? T _H Foliculares? T _{R1} ?
T _{H17}	Eliminación de bacterias extracelulares y hongos, especialmente en mucosas	STAT3 RORγt	IL-17a IL-17f IL-22	
T _{reg}	Mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune	Foxp3	IL-10 IL-35 TGF-β	nT _{reg} iT _{reg}

Tabla 3. Clasificación de los linfocitos CD4⁺ efectores. Adaptado de Zhou et al. [108], Zhu et al. [109] y O'Shea et al. [110].

En este trabajo nos enfocamos en el estudio de las células T reguladoras (T_{reg}) que comprenden entre el 5 y 10% de las células $CD4^+$ periféricas y son una de las poblaciones celulares responsables de mantener la homeostasis del sistema inmune. Su importancia se demostró en 1985 con los primeros experimentos de Sakaguchi en los cuales la transferencia adoptiva de esplenocitos depletados de ciertas poblaciones a ratones desnudos como receptores llevaba al desarrollo de patologías autoinmunes. Estos experimentos demostraron que las células T_{reg} eran linfocitos $CD4^+$ que expresaban altos niveles de CD5 y bajos niveles de CD45 [111, 112]. Utilizando el mismo modelo se descubrió posteriormente que la expresión constitutiva de CD25 en linfocitos $CD4^+$ distingue la población de T_{regs} de la población que contiene células autoreactivas [113]. La fenotipificación de células T_{reg} como $CD4^+CD25^+$ permitió realizar estudios más finos sobre el origen y funciones de esta población celular [114]. Sin embargo, el uso de CD25 para identificar células T_{reg} tiene la desventaja de que esta molécula se expresa también en células activadas y por lo tanto no es un marcador específico de células T_{reg} ; un problema semejante ocurre con otras moléculas que se han utilizado para caracterizar a esta población, como CTLA-4 [115, 116] y GITR [117]. En el año 2003 se describió que el factor de transcripción Foxp3 se expresa constitutivamente en T_{regs} y que es una molécula necesaria para el desarrollo y la función de estas células [118, 119], convirtiéndose en el marcador más confiable para la identificación de T_{regs} . Por lo tanto, estas células pueden ser ahora claramente distinguidas por el fenotipo $CD4^+Foxp3^+$. Cabe aclarar que las células T humanas activadas pueden expresar Foxp3 de manera transitoria, y por lo que este fenotipo no es exclusivo de Tregs en humano [120, 121]. Foxp3 confiere a las T_{regs} su capacidad supresora e induce su incapacidad de producir IL-2 y su estado anérgico, lo cual se debe a que este factor de transcripción inhibe la actividad de NF-AT y NF- κ B [122].

Se han descrito dos tipos de células T_{reg} , las naturales (nT_{regs}) y las inducidas (iT_{regs}). Las nT_{regs} se originan en el timo, donde adquieren la expresión de Foxp3 y requieren para su mantenimiento y expansión en la periferia de TGF- β y de IL-2. Las iT_{regs} pueden generarse en bazo, nódulos linfáticos, tejido inflamado y en el tejido linfoide asociado al intestino; se originan de células T $CD4^+Foxp3^-$ o T convencionales (T_{conv}) que en condiciones de exposición crónica a ciertos antígenos [123] y en presencia de TGF- β y ácido retinoico adquieren la expresión de Foxp3 y se vuelven supresoras [123-125]. Algunos estudios indican que las iT_{regs} es que comparten su repertorio de TCR con el de las células T_{conv} . Sugiriendo que las iT_{regs} controlan

respuestas contra antígenos externos y que las nT_{regs} , dado su origen tímico, controlan la respuesta inmune contra autoantígenos [123, 126]. Sin embargo, la especificidad de las T_{regs} es controversial, pues también hay reportes que indican que los TCRs de las nT_{regs} reconocen principalmente antígenos externos [127, 128]. Se ha reportado también que las nT_{regs} expresan Foxp3 de manera más estable que en las iT_{regs} , esta diferencia se relaciona con modificaciones epigenéticas, ya que en nT_{regs} dinucleótidos CpG en el locus de Foxp3 (en el promotor, en CNS2 y en TSDR) se encuentran desmetilados mientras que en iT_{regs} generadas *in vitro* dichos motivos permanecen metilados [129]. A pesar de las diferencias descritas entre estas dos poblaciones es importante señalar que determinar la importancia de las nT_{regs} e iT_{regs} durante procesos inmunológicos ha sido complicado debido a la falta de marcadores específicos que distingan a estas poblaciones.

La plasticidad de las células T_{reg} ha sido evidenciada en años recientes y su estudio tendrá implicaciones importantes para los futuros usos terapéuticos de esta población. Se ha demostrado que las células T_{reg} tienen la capacidad de convertirse en células T_{H1} , T_{H17} o $T_{Hfoliculares}$, lo cual depende del microambiente en que se encuentren, es decir de la citocinas y de las células con las que interactúan [108]. También se ha reportado la existencia de T_{regs} "híbridas" es decir que coexpresan Foxp3 con factores de transcripción y citocinas característicos de otros linajes como ROR γ t/IL-17 y T-bet/IFN- γ , estas células mantienen sus propiedades supresoras *in vitro*, pero se desconoce su función *in vivo*. Se ha sugerido que lejos de ser un estado intermedio entre dos linajes, estas poblaciones son subtipos de T_{regs} especializados que se generan en respuesta a un microambiente específico [130].

Después de casi 30 años de incesantes estudios, ahora se sabe que las células T_{reg} no sólo están involucradas en enfermedades autoinmunes, también participan en la modulación de la respuesta inmune contra tumores, trasplantes de tejidos y agentes infecciosos [131, 132]. Si bien aún falta mucho por descubrir de estas células, se ha demostrado que tienen un potencial terapéutico importante, convirtiendo el estudio de las T_{regs} en un tema de estudio central en la inmunología.

2.1. Mecanismos de supresión de las células T_{reg}

Las células T_{reg} suprimen la proliferación y la producción de citocinas de diversos tipos celulares como células T efectoras tipo T_{H1} y T_{H2} [133-135] por diversos mecanismos que pueden clasificarse como dependientes de citocinas inhibitoras, dependientes de disrupción metabólica y dependientes de contacto [121, 136].

Los mecanismos dependientes de citocinas inhibitoras (Fig. 7A) incluyen a la IL-10, el TGF- β y la IL-35 producidas por las T_{regs} . La IL-10 tiene la capacidad de inhibir la activación de células presentadoras de antígeno (APC) y de limitar la activación de células T. Esta citocina también actúa directamente en linfocitos T inhibiendo tanto su proliferación como la producción de otras citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5. Además, la IL-10 promueve la generación de células Tr1 que son células Foxp3⁻ con la capacidad de generar grandes cantidades de IL-10 [137-139]. El TGF- β se encuentra principalmente unido a la membrana de las T_{regs} y puede inhibir tanto la proliferación celular como las respuestas tipo T_{H1} y T_{H2} [140-143]. Recientemente, se describió que las células T_{reg} expresan grandes cantidades de IL-35 y que ratones incapaces de producir esta citocina tienen menor actividad supresora *in vitro* y son incapaces de controlar la inflamación en un sistema de enfermedad inflamatoria intestinal *in vivo* [144]. Recientemente se reportó que la IL-10 y la IL-35 pueden cooperar para ejercer la supresión [145].

Los mecanismos dependientes de disrupción metabólica incluyen la hidrólisis de ATP extracelular y la privación de IL-2 (Fig. 7B). La hidrólisis de ATP extracelular por las células T_{reg} se debe a que estas células expresan CD39 y CD73. CD39 es una enzima que hidroliza el ATP del medio transformándolo en AMP, el cual es rápidamente degradado por CD73 en adenosina. Esta molécula actúa a través del receptor de adenosina A2A y favorece la inhibición de la proliferación de células T_{conv} [146-148]. Las células T_{reg} también pueden transferir AMP cíclico, segundo mensajero y potente inhibidor de la proliferación, a T_{conv} a través de uniones comunicantes [149]. El concepto de que las células T_{reg} privaran a las células T_{conv} de la IL-2 disponible fue propuesto originalmente por Sakaguchi a partir de la observación de la alta expresión de CD25 en las células T_{reg} [113]. Esta idea concuerda con observaciones donde al bloquear la capacidad de las T_{regs} de consumir IL-2 estas pierden su capacidad supresora [150, 151] y también con modelos que demuestran que existe

competencia por la IL-2 entre células T_{reg} y T_{conv} [150, 152]. Recientemente, Pandiyan demostró que las T_{regs} son capaces de privar a las células T_{conv} de IL-2, lo cual deriva en la apoptosis de estas últimas [153].

También se han identificado mecanismos dependientes de contacto célula-célula que involucran a CTLA-4, LAG3, granzimas, o la vía Fas-FasL y ocurren ya sea utilizando a las células dendríticas (DC) como intermediarias o directamente al contacto con la célula T (Fig. 7C). Se ha demostrado que existe contacto entre las células T_{reg} y las células dendríticas y que esta interacción es importante para que las T_{regs} puedan ejercer sus funciones supresoras. También se ha reportado que las T_{regs} *in vivo* impiden que las DCs y las células $CD4^+$ interactúen de manera estable y reducen su tiempo de contacto, lo cual podría impedir la activación apropiada de las células T_{conv} [154]. Se ha demostrado también que las células T_{reg} impiden la maduración de las APCs, lo cual conlleva a la falta de una activación apropiada de las células T_{conv} [155-157]. La inhibición de la activación de DCs parece depender por un lado de la interacción de LAG-3 en las T_{regs} con el MHC II en DCs y por el otro de la interacción de la molécula CTLA-4 en células T_{reg} que inhibe la expresión de CD80 y CD86 en DCs, probablemente por trans-endocitosis [158, 159]. CTLA-4 también induce la producción de indoleamina 2,3 dioxigenasa en DCs, una molécula con efectos reguladores en células T [160]. Las células T_{reg} también pueden suprimir a las células blanco por contacto directo. Una de las consecuencias de esta interacción es la inducción de apoptosis, que puede ser dependiente de granzimas [161, 162], o de la vía Fas-FasL [163]. Otro mecanismo utilizado por las células T_{reg} es el entrecruzamiento de CTLA-4 directamente con B7 en las células T_{conv} para modular su proliferación [164].

Los mecanismos de supresión descritos (Fig. 7) no son excluyentes y aún cabe la posibilidad de describir nuevos mecanismos diferentes a los aquí descritos. La información reportada sugiere que dependiendo de la situación, las células T_{reg} utilizan uno o varios mecanismos, por ejemplo los mecanismos observados *in vitro* no siempre funcionan *in vivo* y viceversa. También se ha observado que el/los mecanismos de supresión utilizados por las T_{regs} dependen del nivel de inflamación y del tipo de respuesta inmune que sea necesario controlar, demostrando que una de las características fundamentales de esta población es su gran versatilidad [121, 123, 136, 165].

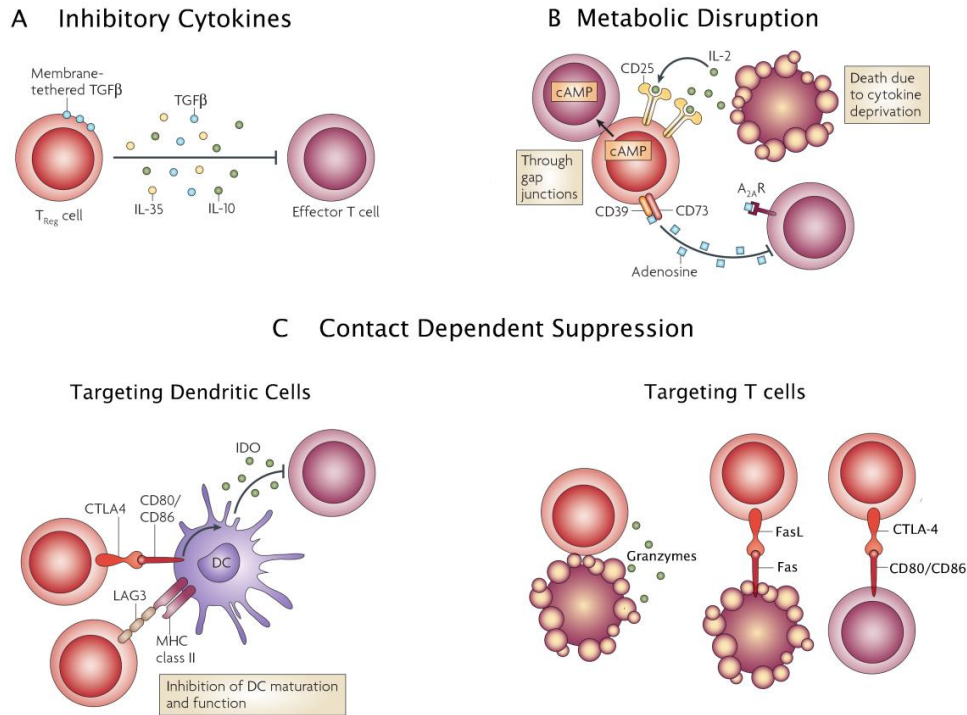


Figura 7 Mecanismos de supresión de las Células T_{reg}. Adaptado de Vignali [136] y Sakaguchi [121].

2.2. Células T reguladoras en infecciones parasitarias

El estudio de las células T_{reg} durante infecciones parasitarias ha generado importantes hallazgos en relación al papel de esta población como moduladora de la respuesta inmune. No obstante, el papel de las T_{regs} en modelos infecciosos ha sido complicado de elucidar debido a que CD25 no sólo se expresa en T_{regs} sino también a las células T_{conv} activadas. Existen muchos reportes donde se ha tratado de evaluar el papel de las T_{regs} utilizando sistemas de depleción con el mAb anti-CD25 con resultados contradictorios, sin embargo, reportes más recientes han ayudado a esclarecer el verdadero papel de estas células durante infecciones parasitarias.

La infección con *Leishmania* fue el primer modelo donde se evaluó el papel de las células T_{reg}. Los primeros reportes sugerían que las células CD4⁺CD25⁺ prevenían el desarrollo de una respuesta T_{H2} [166] y que su acumulación en el sitio de la infección impedía que las células CD4⁺CD25⁻ eliminar al parásito,

también sugerían que las células $CD4^+CD25^+$ utilizaban mecanismos dependientes e independientes de IL-10 [167-169]. Posteriormente se sugirió que la población reguladora $CD4^+CD25^+$ participaba en la reactivación de la infección, ya que la depleción con mAb anti-CD25 al momento de un reto secundario evitaba la reactivación de la infección [170]. Experimentos más recientes demostraron que la eliminación específica de T_{regs} induce un incremento en la carga parasitaria y que las principales células productoras de IL-10 son linfocitos $CD4^+$ que no expresan Foxp3; también confirmaron que las T_{regs} suprimen la respuesta T_{H2} [171]. Finalmente, en el año 2011 se demostró que las células T_{reg} se incrementan en el sitio de la infección y que este incremento depende de las células de Langerhans [172].

Estudios realizados en el modelo de *Trypanosoma* han descrito que las células T_{reg} se incrementan durante la fase aguda de la infección en bazo y en hígado [173, 174]. Diversos experimentos sugieren que las T_{regs} no están involucradas en el control de la carga parasitaria, pero que son importantes para la sobrevivencia a la infección, pues limitan el daño a diversos tejidos modulando la producción de citocinas tipo T_{H1} [173, 174]. Se ha sugerido también que las células T_{reg} controlan a las células NK $CD8^+$ durante la infección [175] y que inducen la generación de macrófagos alternativamente activados [174].

En un modelo de infección con *Plasmodium* se reportó recientemente que durante los primeros días de la infección hay un incremento de células T_{reg} seguido por una súbita reducción [176], lo cual probablemente explica la aparente contradicción respecto al número de T_{regs} durante la infección con *Plasmodium* reportados anteriormente [177-179]. Sin embargo, varios reportes coinciden en que durante esta infección las T_{reg} se activan y muestran mayor capacidad supresora [177, 180]. Recientemente se demostró en un modelo de infección letal con *Plasmodium berghei* ANKA en ratones DERE¹ que la eliminación específica de T_{regs} no modifica la sobrevivencia a la infección, la carga parasitaria, ni la producción de IFN- γ , aunque sí se reportó un incremento en el porcentaje de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ activados [179, 181]; estos reportes aclaran los datos contradictorios obtenidos previamente utilizando

¹ Ratones DERE¹ (depleting regulatory T cells): Estos ratones expresan la proteína verde fluorescente (EGFP) y el receptor de la toxina diftérica bajo el control del gen de foxp3, por lo que al inyectar a los ratones con toxina diftérica se consigue la eliminación selectiva de células T_{reg} (Foxp3⁺) [182]. Estos ratones tienen las mismas características que los ratones Foxp3 DTR (Difteric Toxin Receptor) reportados por otro grupo el mismo año [183]

depleciones con el mAb anti-CD25 [177, 178, 184]. Otros estudios demuestran que si se induce un incremento en la cantidad de T_{regs} durante la infección utilizando complejos IL-2/anti-IL-2 mAb se puede modular el resultado de la infección. Por ejemplo, al aumentar la cantidad de T_{regs} en un modelo de infección letal se observa un incremento en la supervivencia y en el control de la carga parasitaria (los animales tienen menos parásitos). Lo anterior, sugieren los autores, se debe a que en los animales normales la respuesta de los linfocitos $CD8^+$ no está controlada, lo cual explica por qué al eliminar las T_{regs} no se altera el curso de la infección, pero al aumentar las T_{regs} se incrementa la supervivencia; ellos mismos sugieren que el efecto protector observado al incrementar las T_{regs} depende de CTLA-4 pero no de IL-10 [181]. Por otro lado, en un modelo de infección no letal, el incremento de las células T_{reg} impide que los animales controlen la carga parasitaria, pues son incapaces de generar cantidades suficientes de $INF-\gamma$ y mueren prematuramente, lo que sugiere que estas T_{regs} están suprimiendo excesivamente la respuesta inmune requerida para el control de la infección. Este estudio también demuestra que la reducción en el número de T_{regs} descrita anteriormente es consecuencia de la falta de IL-2 durante la infección [176].

Se ha demostrado que durante la infección con diversos parásitos extracelulares como *Trichinella spiralis*, *Schistosoma mansoni* y *Brugia malayi* hay un incremento de células T_{reg} [185-188]. El análisis de las T_{regs} durante estas infecciones se ha realizado particularmente utilizando depleciones con el mAb anti-CD25 y sugieren que estas células suprimen la respuesta T_{H1} para permitir la polarización hacia T_{H2} , pero que también controlan la magnitud de esta última [185, 186, 189].

El modelo de infección con parásitos extracelulares que cuenta con más información hasta la fecha es el de *Heligmosomoides polygyrus*. En este caso también se ha observado un incremento de células T_{reg} , las cuales están activadas y tienen una mayor capacidad supresora [190, 191]. Al eliminar esta población usando ratones DREG no hay alteración de la carga parasitaria, aunque sí se observa un incremento en citocinas tanto T_{H1} como T_{H2} así como un mayor porcentaje de células activadas [192]. Recientemente se describió también que antígenos de este parásito inducen la expresión de Foxp3 en células convencionales [193]. Todos estos datos sugieren que las células T_{reg} ejercen su función de acuerdo al contexto inmunológico en que se encuentran y demuestran que durante las infecciones se requiere de un balance adecuado entre regulación y activación para el control apropiado de la infección.

2.2.1. Células T_{reg} en la infección con *Toxoplasma gondii*

Existen pocos reportes en relación al papel de las células T_{reg} durante la infección con *T. gondii*. Jankovic reportó en el 2007 que la depleción con el mAb anti-CD25 no influenciaba la infección con este parásito ni en la fase aguda ni en la fase crónica de la infección [86], lo que sugería que las células T_{reg} no son importantes para la protección contra esta infección. Estos resultados fueron posteriormente apoyados por Morampudi et al. [194], sin embargo, Couper et al. demostraron en 2009 que en este modelo de infección, la depleción con altas cantidades de anticuerpo llevan principalmente a la eliminación de células CD4⁺ efectoras, por lo que los resultados descritos previamente no son realmente concluyentes [195].

Ge et al. demostraron que durante la infección con *T. gondii* se observa una reducción en el número de T_{regs} durante la fase aguda, y sugirió que esta reducción favorece la inducción de abortos durante la infección con *T. gondii* en un modelo murino [196]. Finalmente, Oldenhove et al. reportaron que la reducción de T_{regs} se relaciona con la elevada inflamación característica de la infección con *T. gondii*. En este artículo se sugiere que el nivel de inflamación en el intestino impide la generación de células iT_{reg}, lo cual es en parte responsable de la reducción de T_{regs} que se observa durante la infección. Los autores demuestran que este ambiente T_{H1} obliga a las T_{regs} a expresar el factor de transcripción T-bet, lo que sugiere que la reducción de T_{regs} también está influenciada por una conversión de T_{regs} a células efectoras tipo T_{H1}. La influencia del ambiente proinflamatorio en la reducción de las células T_{reg} se enfatiza al comparar modelos de susceptibilidad y resistencia, pues dicha reducción es más pronunciada en animales infectados con una cepa virulenta del parásito y también en animales de la cepa de ratón susceptible a la infección. Finalmente, los autores demuestran que esta reducción está relacionada con la falta de IL-2 en el mismo periodo, ya que el tratamiento de los animales con complejos IL-2/anti-IL-2 mAb incrementa la cantidad de T_{regs}, la sobrevivencia de los animales infectados y reduce la inflamación intestinal [197].

II. Antecedentes Directos y Justificación

1 Inmunosupresión durante la infección con *T. gondii*

Durante la infección aguda con *T. gondii* se ha descrito un periodo de inmunosupresión o hiporrespuesta de la respuesta inmune que se caracteriza por la reducción en la proliferación de linfocitos T en respuesta a mitógenos o antígenos. Esta supresión ha sido reportada tanto en humanos como en el modelo murino [106, 198-201] y es también característica de otras enfermedades parasitarias como las causadas por *P. chabaudi* [202-204], *P. berghei* [205], *Trypanosoma cruzi* [206-212], *T. brucei* [213] y *Leishmania donovani* [214-216].

En la infección con *T. gondii* la inmunosupresión se detecta en el bazo pero no en los nódulos linfáticos mesentéricos [217]. Ésta, coincide con una reducción en la viabilidad celular y en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ [106, 218, 219], así como con el incremento en la producción de IFN- γ e IL-10 y la reducción en la producción de IL-2 [106, 201, 217, 220-223]. Los primeros análisis que se realizaron para evaluar las células y moléculas involucradas en la inmunosupresión mostraban que los macrófagos eran en parte responsables de dicha supresión ya que la eliminación de células adherentes de bazo restauraba parcialmente la proliferación [220]. El mecanismo supresor de los macrófagos se describió como dependiente de IFN- γ y mediado por la alta producción de NRI, ya que anticuerpos bloqueadores de IFN- γ o la adición *in vitro* de acetato de N^G-monometil-L-arginina restauran parcialmente la proliferación celular [83, 224]. Por otro lado, también se describió que la IL-10 mediaba la inmunosupresión, ya que durante este periodo se producen altas cantidades de esta citocina y anticuerpos neutralizantes restauran parcialmente la proliferación [219-221, 225]. Sin embargo, experimentos utilizando ratones IL10^{-/-} e IRF^{-/-} (incapaces de producir NRI) demostraron que ambos mecanismos eran dispensables para la supresión, ya que la proliferación de los esplenocitos obtenidos de ambos ratones *knock out* (KO) también se encuentra suprimida durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* [83, 226]. Hasta antes de este trabajo, los mecanismos responsables de la supresión durante *T. gondii* no habían sido descifrados.

2 Justificación

El control adecuado de la respuesta inmune es parte clave de cualquier proceso infeccioso. En el modelo de infección con el parásito intracelular *Toxoplasma gondii* se han descrito diferentes moléculas importantes para la regulación de la respuesta inmune como la IL-10, la L-27 y la lipoxina_{A4} y se ha sugerido que las células T_{H1} productoras de IL-10 son cruciales para el control de la inflamación. Sin embargo, existen pocos reportes en relación al papel de las células T_{reg} Foxp3⁺ durante dicha infección. Estas células han adquirido una gran importancia en el área de la inmunología debido a su gran versatilidad como población inmunomoduladora y por su potencial terapéutico.

Existen reportes que indican lo que ocurre con las células T_{reg} durante la infección con *T. gondii*, pues se ha descrito que hay una reducción en el número y porcentaje de células T_{reg} que es consecuencia de la reducción en la disponibilidad de IL-2 durante la infección. También se ha demostrado la inflamación observada en el intestino de animales infectados evita la generación adecuada de iT_{regs} e induce la expresión de T-bet en T_{regs}. Y se ha sugerido que las células T_{reg} son importantes para el control de la infección, ya que la transferencia adoptiva de células T_{reg} junto con complejos IL-2/IL-2 mAb incrementan la sobrevivencia a la infección de ratones C57BL/6J. Sin embargo, se desconoce cómo participan las células T_{reg} en la modulación de la respuesta inmune contra *T. gondii*. Por lo tanto, elegimos el periodo de inmunosupresión observado durante la infección aguda para estudiar el papel de las células T_{reg} como población inmunomoduladora, nuestros resultados darán una nueva perspectiva a los mecanismos de inmunorregulación previamente descritos en infecciones parasitarias.

III. Hipótesis y Objetivos

1 Hipótesis

Las células T reguladoras Foxp3⁺ son responsables de la inmunosupresión observada durante la infección aguda con *Toxoplasma gondii*.

2 Objetivos

2.1. *Objetivo general*

Determinar la participación de las células T_{reg} la inmunosupresión durante la infección aguda con *T. gondii*

2.2. *Objetivos particulares*

- Identificar las poblaciones celulares afectadas por la inmunosupresión.
- Caracterizar a las células T_{reg} durante el periodo de inmunosupresión, incluyendo su número, porcentaje, fenotipo y capacidad supresora.
- Evaluar la participación de las células T_{reg} durante la inmunosupresión.
- Evaluar los mecanismos utilizados por las células T_{reg} para modular la inmunosupresión.
- Utilizar la depleción con el mAb anti-CD25 como herramienta para el estudio de las células T_{reg} en el modelo de infección con *T. gondii*.

IV. Material y Métodos

1 Animales y parásitos

1.1. *Ratones*

Se utilizaron hembras de las cepas CD1, BALB/c y C57BL/6J de 6 a 8 semanas de edad y con un peso de entre 18 y 20 g. También se usaron ratones transgénicos que coexpresan la proteína verde fluorescente (EGFP) y el factor de transcripción Foxp3 de fondo genético tanto BALB/c (C.Cg-Foxp3tm2Tch/J) como C57BL/6J (B6.Cg-Foxp3tm2Tch/J) adquiridos en The Jackson Laboratory. Los animales se mantienen en condiciones libres de patógenos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas con agua y alimento *ad libitum*. Todos los protocolos fueron aprobados por la Comisión de Bioética para la Investigación en Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas

1.2. *Toxoplasma gondii*

La cepa ME49 de *T. gondii* se mantiene por pasaje de quistes de cerebro en ratones CD1. Los ratones con 2 meses de infección se sacrifican por inhalación de CO₂, se obtienen los cerebros, se homogenizan con DPBS utilizando un homogenizador de tejidos de vidrio con pistilo de teflón (Wheaton, Millville, NJ), y se determina el número de quistes por observación de una alícuota de 10 µl en el microscopio. Se ajusta la suspensión a una concentración de 100 quistes/ml con DPBS y los ratones CD1 se inyectan con 100 µl por vía intraperitoneal. En el caso de los ratones utilizados para los experimentos los animales se anestesian por inhalación con Sevorano (ABBOTT, México), y se administra el inóculo correspondiente por vía oral con una cánula de teflón (Cole Palmer, Vernon Hills, IL).

En el modelo que usamos en el laboratorio los ratones BALB/c son resistentes y los C57BL/6 son susceptibles cuando son infectados con un inóculo de 20-25 quistes de la cepa ME49 por vía oral. En este sistema los ratones BALB/c son resistentes a la infección tanto en la fase aguda como en la crónica mientras que los ratones C57BL/6J son susceptibles desde la fase aguda de la infección.

2 Medios de Cultivo, Soluciones e Hibridomas

2.1. RPMI-1640 Completo

El medio utilizado para el cultivo de células de bazo es RPMI-1640, suplementado con 50 μ M β -mercaptoetanol (Sigma, St Louis, MO), 1 mM piruvato de sodio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (Gibco, Grand Island, NY). El medio completo para los experimentos de cultivo celular de esplenocitos separados por FACS contiene el doble de concentración antibióticos.

2.2. Soluciones

- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM
- PBS (Phosphate Buffered Saline) para purificación de anticuerpos
NaH₂PO₄ 0.02 M, NaCl 0.15 M, pH 7.8
- Solución de Lisis de Eritrocitos
NH₄Cl 0.15M, KHCO₃ 10mM, EDTA-NA₂ 0.1mM
- Solución de lavado para Inmunofluorescencias
DPBS + 1% SFB + 0.1% NaN₃
(Los ensayos en donde se determina viabilidad se usa la solución sin NaN₃)
- Solución de separación
PBS (NaCl 154 mM, KH₂PO₄ 1.05mM, Na₂HPO₄ 2.95 mM) + 2 mM EDTA + 0.5% BSA, degasificado

2.3. Hibridomas y Purificación de Anticuerpos

2.3.1. Hibridomas

El hibridoma PC61 que secreta una inmunoglobulina tipo IgG1 de rata y que reconoce la molécula CD25 murina [227, 228] se obtuvo de la colección ATCC. El hibridoma F41D1 que secreta una inmunoglobulina de rata tipo IgG1 con especificidad no relacionada se utiliza como control de isotipo y fue donada por el Dr. Olivier Denis (Institut Scientifique de Santé Publique, Bruselas, Bélgica). Los hibridomas se

cultivaron en medio CDM libre de suero (Gibco) suplementado con L-Glutamina 8 mM (Gibco). Los sobrenadantes de cultivo se colectaron cuando las células llegaron a confluencia y se guardaron en alícuotas de 50 ml a -20°C.

2.3.2. Purificación de Anticuerpos

Los anticuerpos se obtuvieron precipitando el sobrenadante de cultivo con sulfato de amonio al 45 % (w/v). El sulfato de amonio se agrega lentamente al sobrenadante de cultivo, se mantiene en agitación durante 2 h (todo el procedimiento se lleva a cabo a 4°C) y se centrifuga 1 h a 18,000 rpm. El sobrenadante (SN) se retira y el precipitado se resuspende en la cantidad mínima de PBS y se coloca en membranas de diálisis Spectra/Por 1 con un límite de peso molecular nominal de 6 a 8 kDa (Spectrum Laboratories CA); se dializa contra la misma solución durante 48 h haciendo cambios en intervalos de aproximadamente 6 h. El dializado se recupera y se centrifuga 30 min a 14,000 rpm, se recupera el SN y se determina la concentración de anticuerpo por espectrofotometría a 280 nm utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{mg/ml de proteína} = \frac{\text{Densidad óptica a 280 nm}}{1.25}$$

La concentración de los anticuerpos se ajusta a 1-2 mg/ml con PBS y se guardan en alícuotas de 1 ml a -20°C.

3 Obtención de Esplenocitos de Ratón

Los animales se sacrifican por inhalación de CO₂, se extrae el bazo y se coloca en una caja de petri con 10 ml de RPMI 1640; las células se obtienen perfundiendo el órgano con 5 ml del mismo medio. La suspensión celular se coloca en un tubo de 15 ml, se deja sedimentar durante 5 min y se transfiere la suspensión a un tubo nuevo. La muestra se centrifuga (490g, 5 min), se retira el SN y se lisan los eritrocitos resuspendiendo el pellet en 1.5 ml de solución de lisis e incubando 5 min a temperatura ambiente (T.A.), para detener la lisis se agregan 10 ml de DPBS y se centrifuga la muestra 5 min 490g. Las células se lavan dos veces más con 10 ml de DBPS, se resuspenden en 5 ml de la misma solución, se cuentan por tinción con azul de tripano en una cámara de Neubauer y se utilizan para el experimento correspondiente.

3.1. **Ensayo de proliferación por incorporación de [³H]-Timidina**

Cien mil esplenocitos se siembran en placas de 96 pozos (Costar), por triplicado. Se estimulan con 1µg/ml de concanavalina A (ConA) en un volumen final de 200 µl y se incuban 72 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire. Las células se incuban con 0.5 µCi de [³H]-Timidina (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) durante las últimas 18 h de cultivo y se cosechan en filtros de fibra de vidrio utilizando un cosechador automático (Skatron Instruments, Sterling VA). La incorporación de radiactividad se determinó por espectrometría de centelleo en un contador de centelleo β-plate (Wallac, Turku, Finland) o LS6500 (Beckman Coulter, CA)

4 **Citometría de Flujo**

4.1. **Citómetros de Flujo**

Se utilizaron los citómetros de la Unidad de Citofluorimetría del Instituto de Investigaciones Biomédicas; todos los aparatos y programas para captura de datos se obtuvieron de Becton Dickinson (San Diego, CA):

Citómetro	Características	Canales de detección	Programa para captura de muestras
FACSCan	Láser azul de 488 nm	FL-1 Verde FL-2 Amarillo FL-3 Rojo-naranja	Cell Quest
FACSCalibur	Láser azul de 488 nm	FL-1 Verde FL-2 Amarillo FL-3 Rojo-naranja	Cell Quest Pro
FACSAria	Láser rojo de 635 nm	FL-4 Rojo	FACSDiva
	Láser azul de 488 nm	Verde Amarillo Rojo-naranja Rojo Infrarojo	
	Láser rojo de 633 nm	Rojo Infrarojo	

4.2. Anticuerpos y colorantes

Los reactivos fueron titulados antes de su uso para su óptima detección y compensación.

Anticuerpos contra moléculas de superficie			
<i>Especificidad</i>	<i>Clona</i>	<i>Fluorocromos</i>	<i>Fabricante</i>
CD3	500A2	FITC, PE, Cy5	Caltag, Burlingame CA
CD4	RM4-5	FITC, PE, TC, PercP, APC	Caltag o Biolegend, San Diego CA
CD8	5H10	FITC, PE, TC, APC, Alexa Fluor 647	Caltag
CD19	6D5	PE	Caltag
CD25	PC61 5.3	PE, APC	Caltag o Biolegend
CD25	7D4	PE	Miltenyi Biotec, Auburn CA
CD69	H1.2F3	PE, APC	Biolegend
CD62L	MEL-14	PE, APC	Biolegend
GITR	DTA-1	PE	Biolegend
CD103	2E7	PE, APC	Biolegend
CD49b	DX5	Alexa Fluor 647	Biolegend
Anticuerpos contra moléculas intracelulares			
<i>Especificidad</i>	<i>Clona</i>	<i>Fluorocromos</i>	<i>Fabricante</i>
Foxp3	7D10	Alexa Fluor 488	Biolegend
Foxp3	FJK-16s	Alexa Fluor 488, PE	eBioscience, San Diego CA
CD152	UC10-4B9	PE	eBiosciences o Biolegend
IL-10	JES5-16E3	PE	Biolegend
Helios	22F6	Alexa Fluor 647	Biolegend
Colorantes para evaluar la proliferación			
5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)			Molecular Probes, Eugene OR
Colorantes para determinación de viabilidad			
7-aminoactinomicina D (7-AAD)			Molecular Probes
Perlas fluorescentes para la determinación de números absolutos			
CountBright Absolute Counting Beads			Molecular Probes

Los fluorocromos utilizados tienen las siguientes características:

Fluorocromo o Colorante	Laser de excitación	Canal de Detección	Excitación Max	Emisión
FITC	488	FL-1	494	519
Alexa Fluor 488	488	Verde	495	519
CFSE	488		495	517
PE	488	FL-2 Amarillo	496, 564	578
PercP	488	FL-3	482	678
TC	488	Rojo-naranja	496, 564	667
7-AAD	488		546	650
APC	647, 633	FL-4	650	660
Alexa Fluor 647	647, 633	Rojo	650	668
Cy5	647, 633		649	666

4.3. Inmunofluorescencia Directa en Esplenocitos

Un millón de células se resuspenden en 100 μ l de solución de lavado con la combinación de anticuerpos requerida para detectar las moléculas de superficie de interés. Las muestras se incuban 30 min (4°C, oscuridad), se lavan 2 veces con 1 ml de solución de lavado centrifugando 5 min *490g* y se resuspenden en DPBS. Las células se analizan inmediatamente en el FACS o pueden teñirse para evaluar viabilidad o para detectar antígenos intracelulares.

4.4. Inmunofluorescencia Directa en Linfocitos de Sangre Periférica

En un tubo heparinizado (2 U por tubo) se colectan 20-50 μ l de sangre periférica y las muestras se guardan a 4°C hasta ser procesadas. Las muestras se lavan agregando 1 ml de DPBS y centrifugando *490g* 5 min, se descarta el sobrenadante y se lisan los eritrocitos resuspendiendo el pellet en 500 μ l de solución de lisis e incubando 5 min, T.A. Se agrega 1 ml de DPBS para detener la lisis, se centrifuga la muestra y se retira el SN. Se agrega la mezcla de los anticuerpos contra las moléculas de interés en un volumen final de 100 μ l de solución de lavado y las muestras se incuban 30 min a 4°C en la oscuridad. Se lava la muestra una vez con solución de lavado, y se resuspenden las células en 300 μ l de DPBS, la muestra se analiza inmediatamente en el FACS.

4.5. Determinación de Viabilidad

Las muestras que ya fueron teñidas por inmunofluorescencia directa se incuban con 1µg/ml del colorante 7-AAD en DPBS durante 20 min a 4°C y en la obscuridad, se centrifugan (5 min, 490g) y se resuspenden en DPBS. Las células se analizan inmediatamente en el FACS.

4.6. Determinación de números absolutos de células T reguladoras

Se obtienen los esplenocitos de ratones Foxp3^{EGFP} como se indica anteriormente y se resuspenden en 10 ml de DPBS. Se toma una alícuota de 100 µl, se diluye 1:5 con DPBS y se agregan 50 µl de CountBright Absolute Counting Beads. Las muestras se analizan inmediatamente en el FACS capturando un número suficiente de células Foxp3⁺ y al menos 1000 perlas fluorescentes. La concentración celular se calcula como indica el proveedor utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células Foxp3}^+/\mu\text{l} = \frac{A}{B} \times \frac{C}{D}$$

Dónde:

A= Número adquirido de células Foxp3⁺

B= Número adquirido de perlas fluorescentes

C= Número de perlas en 50 µl del reactivo original

D=Volumen de la muestra

El número de células Foxp3⁺ por bazo se calcula utilizando la siguiente fórmula [229]:

$$\text{Número de células Foxp3}^+/\text{bazo} = \text{Número de células Foxp3}^+/\mu\text{l} \times \text{Factor de dilución de la muestra (5)} \times \text{Volumen de la suspensión celular original (10 ml)}$$

4.7. Tinción con el Colorante CFSE

El colorante CFSE se diluye en DMSO (Sigma) a una concentración de 5 mM y se guarda en alícuotas de 10 µl a -20°C; las alícuotas se utilizan solamente una vez. Es importante que las células que se van a teñir no hayan estado en contacto con medio completo o soluciones con proteínas, en cuyo caso se deben lavar con al menos diez volúmenes de DPBS dos veces para obtener una tinción adecuada.

Las células se resuspenden a una concentración de 2.5×10^7 células/ml de DPBS y se tiñen agregando un volumen idéntico de CFSE $5 \mu\text{M}$ diluido en DPBS e incubando 5 min, T.A. en oscuridad, con agitación ocasional. La reacción se detiene agregando cinco volúmenes de DPBS + 10% SFB y centrifugando 5 min *490g*. Las células se resuspenden en 1ml de RPMI completo, se cuentan y se ajustan a una concentración de 10^6 células/ml.

4.8. Ensayos de Proliferación

Un millón de células de bazo recién teñidas con CFSE y resuspendidas en medio RPMI completo, se siembran en cada pozo de una placas de 24 pozos (Costar, Cambridge MA), en un volumen final de 2 ml y se estimulan con $1 \mu\text{g/ml}$ de concanavalina A (ConA, Sigma) o $5 \mu\text{g/ml}$ de lipopolisacárido (LPS, Sigma). En los experimentos indicados se agregó 1-20 U/ml de IL-2 murina recombinante (Roche, Indianapolis IN) al inicio del cultivo. En los ensayos de neutralización de IL-10 se agregó $30 \mu\text{g/ml}$ de mAb anti IL-10 (clona JES5-2A5, Biolegend) o de un control de isotipo (clona RTK2071, Biolegend) al cultivo 30 minutos antes de la adición de ConA. Las células se incuban a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 en aire. 72 h después se recuperan, se lavan con DPBS y se realiza una inmunofluorescencia directa para detectar las moléculas CD4, CD8 y CD19, así como una tinción para determinar viabilidad. Las muestras se analizan inmediatamente en el FACS, capturando 20,000 células vivas de cada una de las poblaciones de interés.

5 Detección de Moléculas Intracelulares

5.1. Detección de Foxp3 en esplenocitos

Se utiliza el Kit de Detección de Foxp3 de eBioscience (Foxp3 Staining Buffer Set) siguiendo las instrucciones del proveedor. Después de teñir los esplenocitos por inmunofluorescencia directa, las células se centrifugan (5 min *490g*), se resuspenden en 1 ml de la solución fijadora y se incuban durante 30 min (todas las incubaciones se realizan a 4°C y en oscuridad). Las células se lavan dos veces con solución de permeabilizado, se agregan los anticuerpos para reconocer la(s) molécula(s) intracelulares de interés en un

volumen de 100 μ l, se incuban por 30 min y se lavan dos veces con solución de permeabilizado. La células se resuspenden en DPBS y se analizan en el FACS inmediatamente.

5.2. Detección de Foxp3 en Linfocitos de Sangre Periférica

Se utiliza el Kit de Detección de Foxp3 de eBioscience con algunas modificaciones. Después de colectar 50-100 μ l de sangre en tubos heparinizados se agrega la combinación requerida de anticuerpos para detectar los antígenos de superficie de interés en un volumen final de 10 μ l y se incuban durante 30 min a 4°C en oscuridad. Se lisan los eritrocitos agregando 500 μ l de solución de lisis e incubando las muestras 5 min T.A., posteriormente se agrega 1ml de DPBS y se centrifugan las células 5 min *300g*, se retira el SN y se lavan una vez más con 1 ml de solución de lavado. Las muestras se resuspenden en 500 μ l de solución de fijado y se incuban 30 min (4°C, oscuridad), se lavan 2 veces con solución de lavado y se resuspenden en 100 μ l de solución de permeabilizado con el anticuerpo contra la(s) molécula(s) intracelulares de interés, se incuban 30 min (4°C, oscuridad). Finalmente las células se lavan una vez con 1 ml de solución de lavado, se resuspenden en 300 μ l de DPBS y se analizan inmediatamente en el FACS.

5.3. Detección Intracelular de IL-10

La detección intracelular de IL-10 se realizó utilizando un protocolo reportado previamente [230], utilizando las siguientes soluciones:

Solución de fijado

Paraformaldehído 4% en DPBS

DPBS-S

DPBS 10mM HEPES, 1mM CaCl₂, 1mM MgSO₄ + 0.1% saponina + 0.05% NaN₃ + 0.01% BSA. Conservar a 4°C.

DPBS-S/Milk

Mezclar DPBS-S con 5% de leche descremada y centrifugar a 15,000g durante 30 minutos. Recuperar el sobrenadante y conservar a 4°C.

Diez millones de células de bazo de ratones Foxp3^{EGFP} se estimulan con 20 ng/ml PMA, 1 μ g/ml ionomicina y 2 μ M monensina en un volumen final de 1ml de medio completo en cada pozo de una placa de

24 pozos. Las células se incuban por 5 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire, posteriormente se recuperan, se lavan con DPBS y se realiza una inmunofluorescencia directa para detectar la molécula CD4. Las células se fijan resuspendiéndolas en 1ml de solución de fijado e incubándolas durante 15 min T.A. con agitación ocasional. Las células se lavan una vez y se resuspenden en solución de lavado. Para la tinción intracelular un millón de células fijadas se lavan con 1ml de DPBS-S (1500g, 4°C 5 min), se resuspenden en 25 µl de DPBS-S/Milk y se incuban durante 30 min 4°C. Las células se centrifugan incuban con 100 µl del mismo buffer con el anticuerpo anti-IL-10 durante 30 min 4°C. Finalmente las células se lavan dos veces con 1ml de DPBS-S cada una. Las muestras se resuspenden en DPBS y se analizan en el FACS inmediatamente.

6 Aislamiento de Subpoblaciones Celulares

6.1. Enriquecimiento de Subpoblaciones de Linfocitos por Columnas Magnéticas

Los esplenocitos se centrifugan (490g, 10 min) y se resuspenden 10⁷ células en 90 µl de solución de separación, se agregan 10 µl del anticuerpo de rata anti-CD4 acoplado a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) y se incuban 15 min en agitación a 4°C. Las células se lavan con 10 volúmenes de solución de separación, se resuspenden en 500 µl de la misma solución y se mantienen a 4°C mientras se prepara la columna de separación.

Se coloca la columna (LS Columns, Miltenyi Biotec) en el separador magnético y se equilibra con 500 µl de solución de separación. Posteriormente se agrega la suspensión celular y se hacen tres lavados con solución de separación utilizando 500 µl cada vez. La suspensión celular eluída corresponde a la fracción CD4⁻ y se irradia (3000 rads) para ser utilizada como células accesorias. La fracción CD4⁺ se colecta retirando la columna del imán, agregando 2 ml de solución y aplicando presión con el émbolo que acompaña a la columna. Las células se lavan con 10 ml de DPBS, se resuspenden en la misma solución, se cuentan y se usan de acuerdo al protocolo de separación requerido.

6.2. "Cell Sorting" de Células T_{regs}

Todas las separaciones celulares se realizan en el separador de alta velocidad FacsAria descrito previamente utilizando una *Nozzle* de 70 μ M y colectando las muestras en SFB + 1% antibióticos.

6.2.1. Purificación de Células $CD4^+Foxp3^+$ y $CD4^+Foxp3^-CD25^-$

La población de linfocitos $CD4^+$ de esplenocitos de ratones $Foxp3^{EGFP}$ se enriquece por selección positiva utilizando columnas magnéticas como se indica en la sección 6.1 y se tiñe con anti- $CD4$ y anti- $CD25$. Para separar las poblaciones se define primero la población de linfocitos por características de tamaño y granularidad, después se grafica un histograma de $CD4$ y se selecciona la población $CD4^+$, finalmente se grafica un *dot plot* de $Foxp3$ vs $CD25$ y se seleccionan para separación las poblaciones $Foxp3^+$ y $Foxp3^-CD25^-$.

6.2.2. Eliminación de Células T_{reg}

Los esplenocitos totales de ratones $Foxp3^{EGFP}$ se separan en el FACS definiendo por tamaño granularidad una población que excluya únicamente los restos celulares. Posteriormente se hace un histograma de $Foxp3$ y se selecciona para separación la población $Foxp3^-$.

7 Ensayos de Supresión

Cincuenta mil células blanco ($CD4^+Foxp3^-CD25^-$) se incuban con 200,000 células accesorias y diferentes proporciones de células T_{regs} ($CD4^+Foxp3^{EGFP}$), en placas de 96 pozos (Costar), por triplicado. Se estimulan con 1 μ g/ml de ConA en un volumen final de 200 μ l y se incuban 72 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 en aire. Las células se incuban con 0.5 μ Ci de [3 H]-Timidina durante las últimas 18 h de cultivo y se cosechan en filtros de fibra de vidrio utilizando un cosechador automático. La incorporación de radiactividad se determinó por espectrometría de centelleo en un contador de centelleo β -plate o LS6500.

8 Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo

Las citocinas IL-2 e IL-10 se cuantificaron en sobrenadante de cultivo por ELISA sándwich utilizando las siguientes soluciones y anticuerpos:

Solución de Carbonatos	0.1M NaHCO ₃ , 33.6 mM Na ₂ CO ₃ . pH 9.5
Solución de Fosfatos	83.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 134.1 mM NaH ₂ PO ₄ . pH 9.5
PBS	136.9 mM NaCl, 8.2 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.47 mM KH ₂ PO ₄ , 2.7 mM KCl pH a 7.4 con HCl
Solución de Lavado	PBS + Tween 20 0.05%
Solución de dilución	PBS + 10% SFB Filtrar por membrana de 45 µm
Solución de Acetato de Sodio	Acetato de Sodio 0.1M pH a 6 con ácido cítrico. Guardar a 4°C
Solución TMB	Diluir 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (Sigma) en DMSO a una concentración de 13mg/ml. Guardar a 4°C en la oscuridad
Solución H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 130 mM Preparar en fresco
Reactivo para Revelar	Solución de Acetato de Sodio + 1% Solución TMB + 1% solución H ₂ O ₂

Anticuerpos de captura

	Clona	Dilución	Observaciones
αIL-2 Purificado	JES6-1A12 (Biolegend)	2 µg/ml	Diluir en Solución de Carbonatos
α IL-10 Purificado	JES5-2A5 (Biolegend)	2 µg/ml	Diluir en Solución de Fosfatos

Anticuerpos de Detección

	Clona	Dilución
α IL-2 Biotinilado	JES6-5H4 (Biolegend)	1 µg/ml
α IL-10 Biotinilado	JES5-16E3 (Biolegend)	1 µg/ml

Las curvas estándar se preparan con citocinas recombinantes (Biolegend) haciendo diluciones seriales 1:1 con RPMI completo. La curva de IL-2 tiene un rango de 500 a 3.9 pg/ml y la de IL-10 de 2000 a 31.25 pg/ml.

El anticuerpo de captura se diluye a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ en la solución correspondiente y se colocan 100 μl en cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos de poliestireno de alta afinidad (Costar), se cubre la placa y se deja incubando a 4°C toda la noche. Transcurrida la incubación se retira la placa del refrigerador y una vez que la placa ha llegado a T.A. se lava tres veces con solución de lavado, se agregan 200 μl de solución de dilución a cada pozo y se incuba a T.A. por >4h. Lavar la placa 3 veces y agregar 100 μl de la cada una de las diluciones de la curva estándar o de las muestras en cada pozo por duplicado, cubrir la placa e incubar toda la noche a 4°C. Lavar la placa 5 veces y agregar a cada pozo 100 μl del anticuerpo de detección diluido en solución de dilución a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, cubrir la placa e incubar 1 h T.A. Lavar la placa 5 veces y agregar a cada pozo 100 μl del conjugado Avidina-HRP (Biolegend) diluido 1:1000 en solución de dilución e incubar 30 min, T.A. Lavar la placa 5 veces y agregar 100 μl del reactivo para revelar a cada pozo, incubar T.A. durante 10-30 min en la oscuridad y detener la reacción agregando a cada pozo 100 μl de H_2SO_4 1N. Leer la absorbancia a 450/570 nm.

9 Cuantificación de NO_2^- en sobrenadante de cultivo

La detección de NO_2^- en sobrenadantes de cultivo se realizó utilizando la reacción de Griess. Se colocan 100 μl de cada muestra y de cada dilución de la curva estándar en pozos de una placa de 96 pozos por duplicado, se agregan 50 μl de una solución de sulfanilamida (Sigma) al 1% en H_3PO_4 2.5% y se incuba por 5 min T.A. y en la oscuridad. Posteriormente se agregan 50 μl de una solución de N-(1-naftil)-etilendiamina (Sigma) al 0.1% y se incuba 10 min en las mismas condiciones. La absorbancia se determina a 540 nm. La curva estándar se prepara con nitrito de sodio diluido en agua bidestilada en un rango de concentraciones de 1-10 μM

10 Software de Análisis y Estadística

10.1. *FlowJo*

El análisis de las muestras de citometría se realizó con el programa FlowJo versión 5.7.2 de Tree Star (Ashland OR).

10.2. Prisma

El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 3.03 de GraphPad Software (San Diego, CA). Para determinar diferencias significativas entre dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student con un intervalo de confianza del 95%, cuando los grupo tenían varianzas diferentes se aplicó la corrección de Welch. Para comparar tres o más grupos se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% y una prueba posterior de comparación múltiple de Bonferroni o de Dunnett. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativos los valores $p < 0.05$.

V. Resultados

Los resultados de esta tesis están divididos en tres partes. La primera parte describe los experimentos realizados para verificar y validar en nuestro laboratorio la inmunosupresión previamente reportada en el modelo de infección con *T. gondii* en las cepas BALB/c y C57BL/6J. La segunda parte contiene el artículo titulado "CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2 dependent mechanism but independently of IL-10" [231] donde demostramos que las células T_{reg} son responsables de la inmunosupresión previamente descrita. En esta misma sección se incluye información adicional que no fue publicada en el artículo pero que fue importante para la interpretación de los datos de los resultados obtenidos de los experimentos realizados.

En la tercera parte evaluamos la depleción con el mAb anti-CD25 como herramienta para analizar a las células T_{reg} durante la infección con *T. gondii* y se incluyen los artículos "Reduction of Foxp3⁺ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*" [232] y "Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly T_{regs} in BALB/c mice but activated cells in C57BL/6J mice" [233]. En estos artículos sugerimos que las células T_{reg} son importantes para la resistencia de la cepa BALB/c a la infección con *T. gondii* y demostramos que el efecto de la depleción antes de la infección es radicalmente opuesto entre las cepas BALB/c y C57BL/6J.

1 Caracterización de la inmunosupresión observada durante la infección aguda con *T. gondii*.

Durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* se ha observado un periodo de inmunosupresión caracterizado por la incapacidad de los linfocitos T de responder a mitógenos o a antígenos [106]. Este periodo se describió originalmente utilizando ensayos de incorporación de [³H]-Timidina, por lo que nuestro primer objetivo fue verificar la reproducibilidad de dicho fenómeno en el laboratorio utilizando esta misma técnica, pero también con técnicas más modernas como la dilución del colorante CFSE.

Infectamos ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6J (resistente y susceptible respectivamente) con quistes de la cepa ME49 y a los 7 y 14 días post infección (dpi) obtuvimos los esplenocitos, los activamos con ConA y evaluamos la proliferación por incorporación de [³H]-Timidina. Como se puede observar en la Fig. 8A los esplenocitos de la cepa BALB/c mostraron una reducción del 63.9% en la proliferación a los 7 dpi, pero a los 14 dpi las células comenzaron a recuperar su capacidad proliferativa. Por otro lado, los esplenocitos de ratones C57BL/6J obtenidos a los 7 dpi proliferaron 70.6% menos que el control y a los 14 días esta reducción alcanzó un 92.7% (Fig. 8A). Evaluamos también la proliferación celular utilizando el colorante CFSE (Fig. 8B) y al igual que en el experimento de incorporación de [³H]-Timidina encontramos que las células de los ratones BALB/c estaban suprimidas a los 7 dpi mientras que en los C57BL/6J la supresión se observó tanto a los 7 como a los 14 dpi, demostrando que la inmunosupresión puede detectarse utilizando dos técnicas diferentes para el estudio de la proliferación celular. Estos datos muestran que el periodo de la inmunosupresión es diferente entre las cepas BALB/c y C57BL/6J y concuerdan con los datos descritos por McLeod, quien describió que la inmunosupresión a los 7dpi es más fuerte en animales susceptibles que en animales resistentes a la infección con *T. gondii* [106].

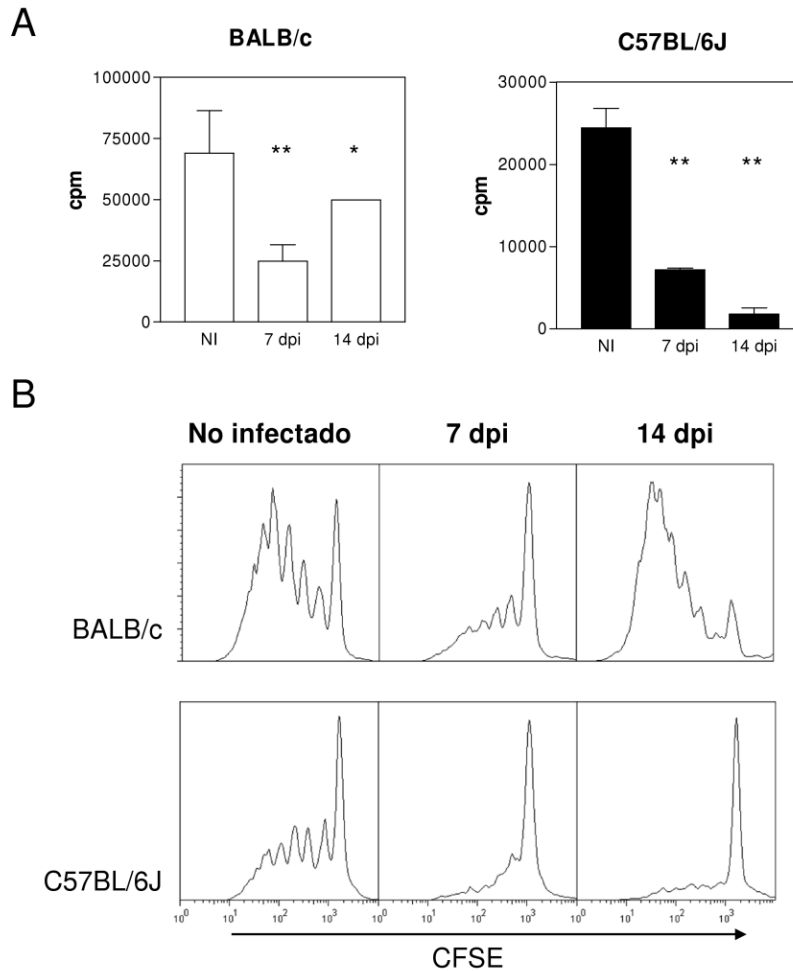


Figura 8 La infección con *T. gondii* induce inmunosupresión en linfocitos T de ratones BALB/c y C57BL/6J. Ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6J fueron infectados con 20 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii*. Los esplenocitos se obtuvieron 7 y 14 dpi y se estimularon con ConA. (A) La proliferación se determinó por incorporación de [³H]-Timidina. (B) Las células se cosecharon 72 h después de la estimulación, se lavaron y se capturaron en el FACS. La región de los linfocitos se definió por características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC), posteriormente se analizó la fluorescencia del CFSE. *p<0.05, **p<0.01, ANOVA con post análisis de Dunnett.

Se ha descrito que la inmunosupresión coincide con una reducción de la viabilidad celular [234] y del porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ [106], por lo que para continuar con la caracterización de este periodo evaluamos la viabilidad celular total así como de las subpoblaciones CD4⁺, CD8⁺ y CD19⁺. En la Figura 9 observamos que, tanto en los ratones BALB/c como en los C57BL/6J, la viabilidad se redujo únicamente a los 14 dpi, sin embargo, en esta última el porcentaje de células vivas se redujo un 20%, mientras que en los BALB/c la reducción fue únicamente del 9.1%.

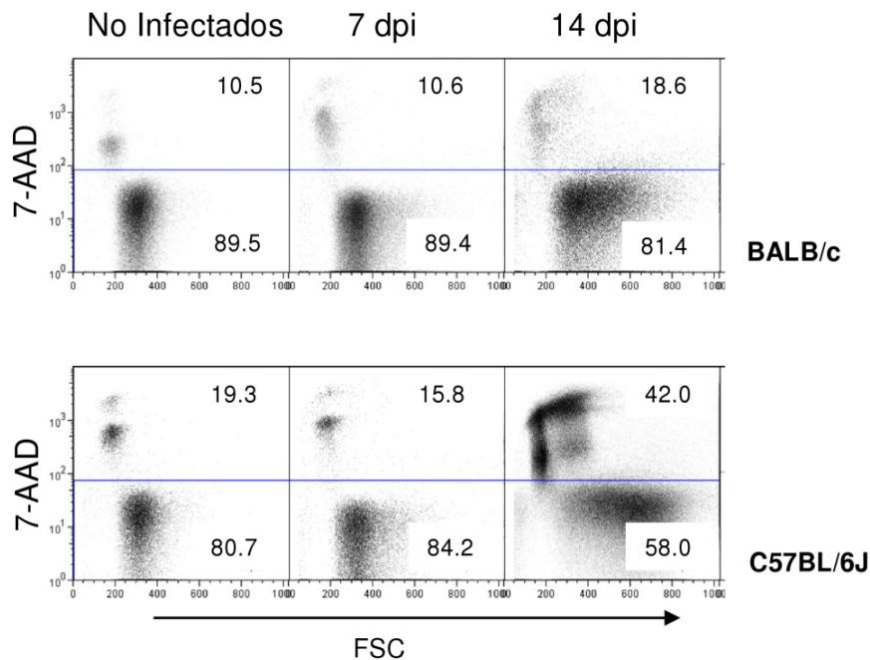


Figura 9 La infección con *T. gondii* induce mortalidad en células de bazo. Esplenocitos de ratones BALB/c y C57BL/6J obtenidos a los días de infección indicados fueron teñidos con 7-AAD e inmediatamente analizados en el FACS. El análisis muestra la viabilidad de la población total.

Al analizar la viabilidad de las subpoblaciones mencionadas anteriormente (Fig. 10) observamos que en los ratones BALB/c el porcentaje de células CD4⁺ vivas se redujo desde el día 7 dpi (20.2% vs 26.9%) y se volvió más evidente al día 14 de la infección (14.4% vs 26.9%); en este punto se observó también una reducción del porcentaje de células CD8⁺ vivas (34.4%). El porcentaje de células CD19⁺ vivas, sin embargo, se mantuvo constante durante los 7 y 14 dpi.

El análisis de los esplenocitos de ratones C57BL/6J (Fig. 10) mostró que el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ vivas se redujo a los 7 dpi (14.0% vs 20.6% y 7.5 % vs 10.2% respectivamente) y la reducción fue mayor a los 14 dpi (5.3% vs 20.6% y 3.6% vs 10.2% respectivamente). En el caso de los linfocitos B la reducción en la viabilidad se observó únicamente a los 14 dpi.

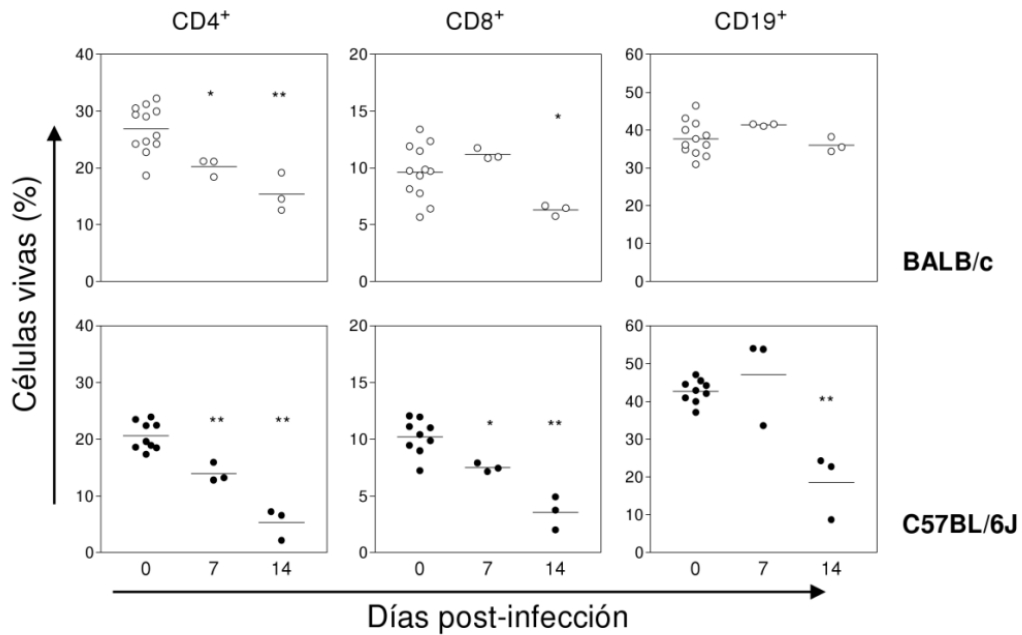


Figura 10 La infección con *T. gondii* reduce la viabilidad de las subpoblaciones CD4⁺, CD8⁺ y CD19⁺. Esplenocitos de ratones BALB/c y C57BL/6J obtenidos a los días de infección indicados fueron teñidos con anti-CD4, anti-CD8 o anti-CD19 y 7-AAD e inmediatamente analizados en el FACS. Se el porcentaje de células vivas de cada subpoblación en relación a la población total. Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA con post análisis de Dunnett (*p<0.05, **p<0.01).

Estos datos demuestran que durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* se reduce la viabilidad celular. Los tipos celulares y el nivel de reducción de la viabilidad depende de la cepa de ratón que se utilice, sin embargo, el daño es mayor en la cepa susceptible C57BL/6J.

Dado que la reducción en la viabilidad aquí descrita puede ser crucial para el análisis e interpretación de la proliferación celular por CFSE, evaluamos la viabilidad de los esplenocitos estimulados con ConA por 72 h. En la Figura 11 observamos que en los ratones BALB/c no infectados había un bajo porcentaje de células muertas (4.2%) que se incrementó ligeramente en los animales infectados a los 7 y 14 dpi (10.7% y 8.5% respectivamente); sin embargo, en los ratones C57BL/6J había un mayor número de células muertas tanto en los animales no infectados (8.74 %) como en los infectados, particularmente a los 14 dpi (29.4%). Estos datos demuestran que para la interpretación adecuada de los experimentos de proliferación celular por CFSE en animales infectados con *T. gondii* es indispensable incluir una prueba de viabilidad que permita la exclusión de células muertas para el análisis, especialmente en el caso del modelo con ratones C57BL/6J.

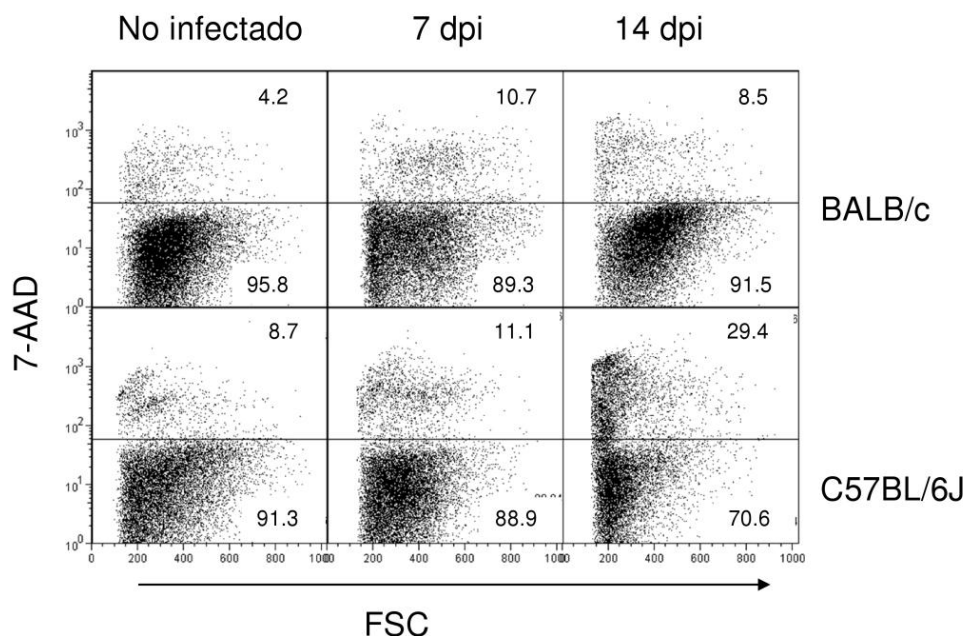


Figura 11 La infección con *T. gondii* induce una reducción en la viabilidad de esplenocitos estimulados con ConA. Esplenocitos de ratones BALB/c y C57BL/6J se obtuvieron a los días indicados de la infección y se cultivaron en presencia de 1 μ g/ml de ConA durante 72 h. Las células se cosecharon, se tificaron con 7-AAD y se analizaron inmediatamente en el FACS. La región de los linfocitos se definió por características de FSC y SSC y posteriormente se analizó la fluorescencia del 7-AAD.

Una vez demostrado que podíamos reproducir los experimentos de inmunosupresión originalmente descritos y que verificamos parámetros críticos que coinciden con este fenómeno, como la reducción en la viabilidad y en los porcentajes de células CD4⁺ y CD8⁺, evaluamos la proliferación celular en ratones BALB/c y C57BL/6J durante 28 días para determinar la cinética de la supresión. Utilizamos el colorante CFSE para el análisis de la proliferación ya que ofrece ventajas como la capacidad de poder incluir pruebas de viabilidad y de analizar diferentes subtipos celulares en una misma muestra [235]. La estrategia de análisis que utilizamos para los datos de citometría se indica en la Figura 12. Primero, se seleccionan las células vivas (7AAD⁻), después se define la región de linfocitos de acuerdo a sus características de tamaño y granularidad y se define la subpoblación de interés (CD4⁺ CD8⁺ o CD19⁺). La proliferación se evalúa analizando la fluorescencia del CFSE en la población de linfocitos y en cada una de las subpoblaciones antes mencionadas.

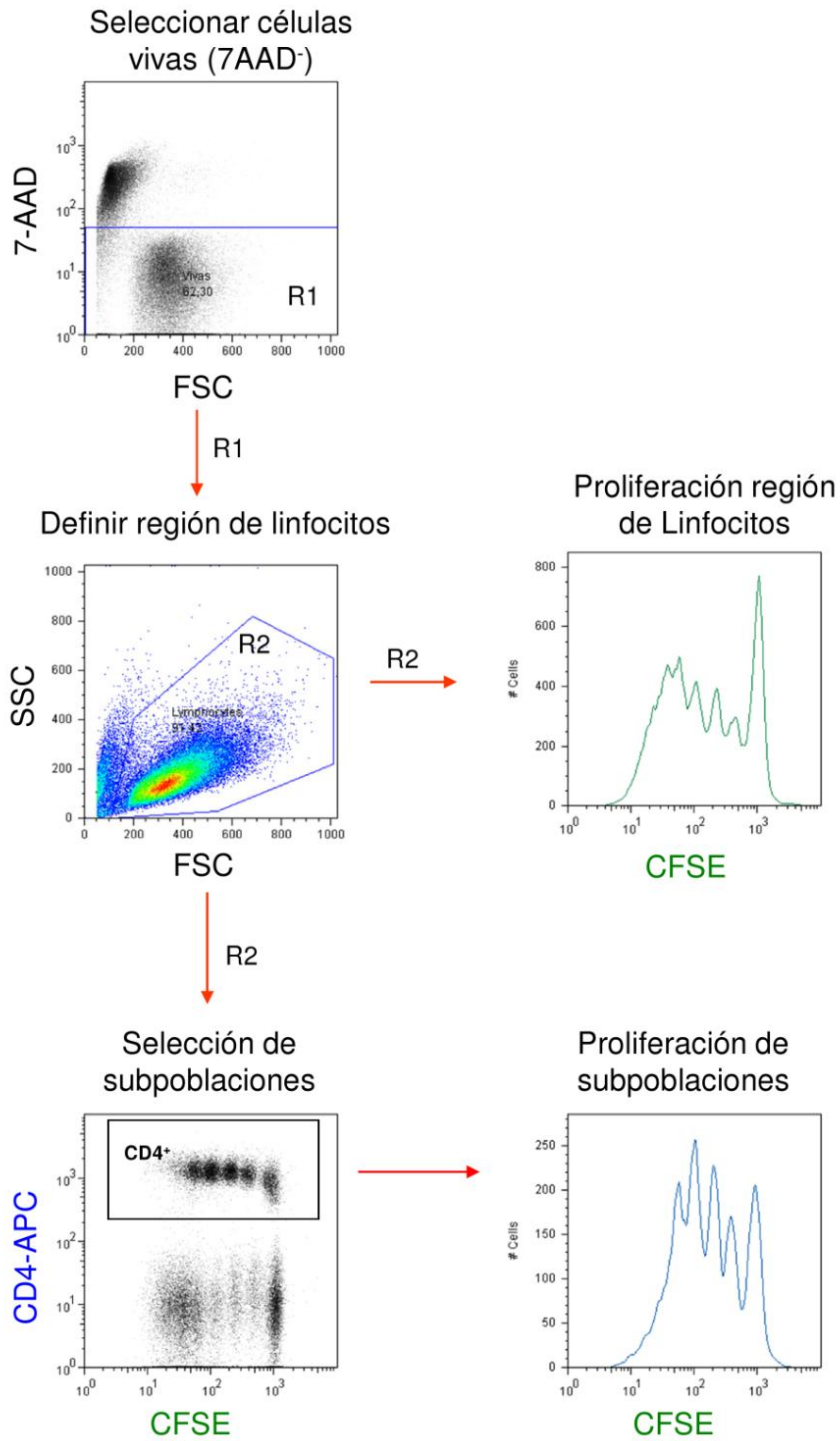


Figura 12 Estrategia de análisis para el estudio de la proliferación por citometría de flujo con el colorante CFSE.

En la Figura 13 podemos observar la proliferación de esplenocitos de ratones BALB/c a diferentes tiempos post infección. El análisis de la región de linfocitos muestra que la supresión ocurre únicamente a los 7 dpi, pues a partir del día 14 de infección las células recuperaron por completo su capacidad proliferativa, e incluso proliferaron más que las células de un animal no infectado. El mismo patrón de supresión se observó en las células CD4⁺ y CD8⁺, aunque estas últimas estaban menos suprimidas en comparación con los linfocitos CD4⁺. Los linfocitos CD19⁺ no se suprimieron durante la infección con *T. gondii*.

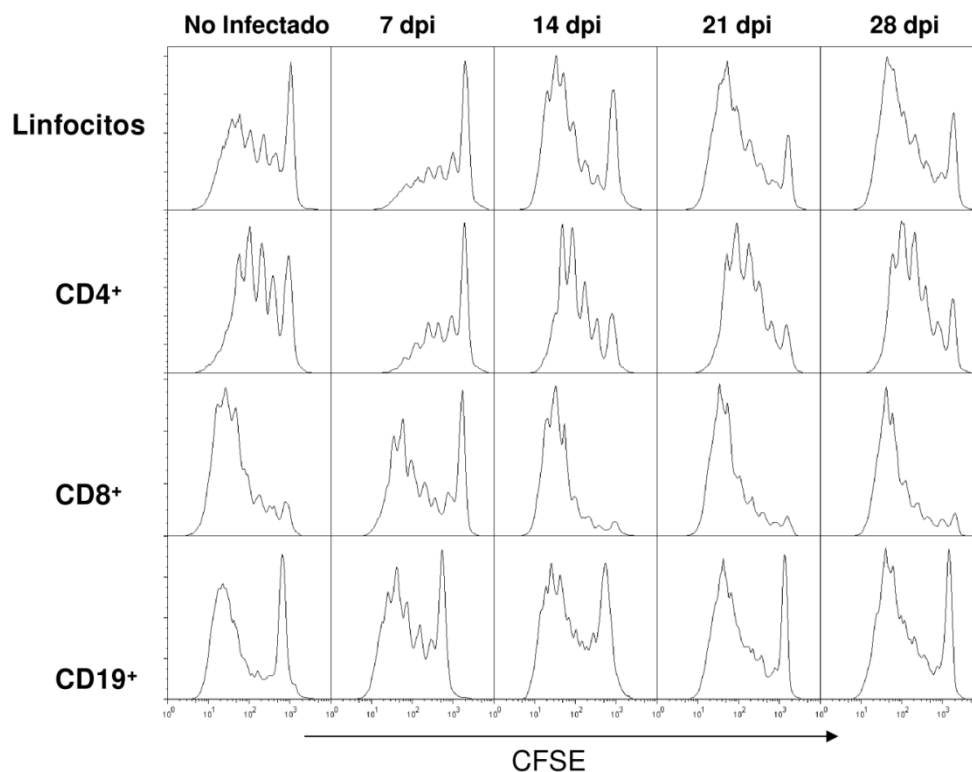


Figura 13 La infección con *T. gondii* en ratones BALB/c induce una inmunosupresión en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ pero no en linfocitos B. Esplenocitos de ratones BALB/c infectados y no infectados fueron teñidos con CFSE y estimulados con ConA o LPS. Después de 72 h las células se recuperaron, se tñieron con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 o anti-CD19 y 7-AAD, se capturaron en el FACS y se analizaron como se indica en la Fig. 12.

El análisis de la proliferación en células de ratones C57BL/6J (Fig. 14) muestra que en la región de linfocitos la supresión se observó a los 7 y 14 dpi, siendo la supresión más fuerte a los 14 dpi; a los 21 y 28 dpi las células ya habían recuperado sus capacidad proliferativa. Los linfocitos CD4⁺ mostraron un patrón de proliferación similar, mientras que en los linfocitos CD8⁺ la supresión se observó únicamente a los 14 dpi. Por

otro lado, la proliferación de los linfocitos CD19⁺ se mantuvo durante todo el periodo de la infección analizado.

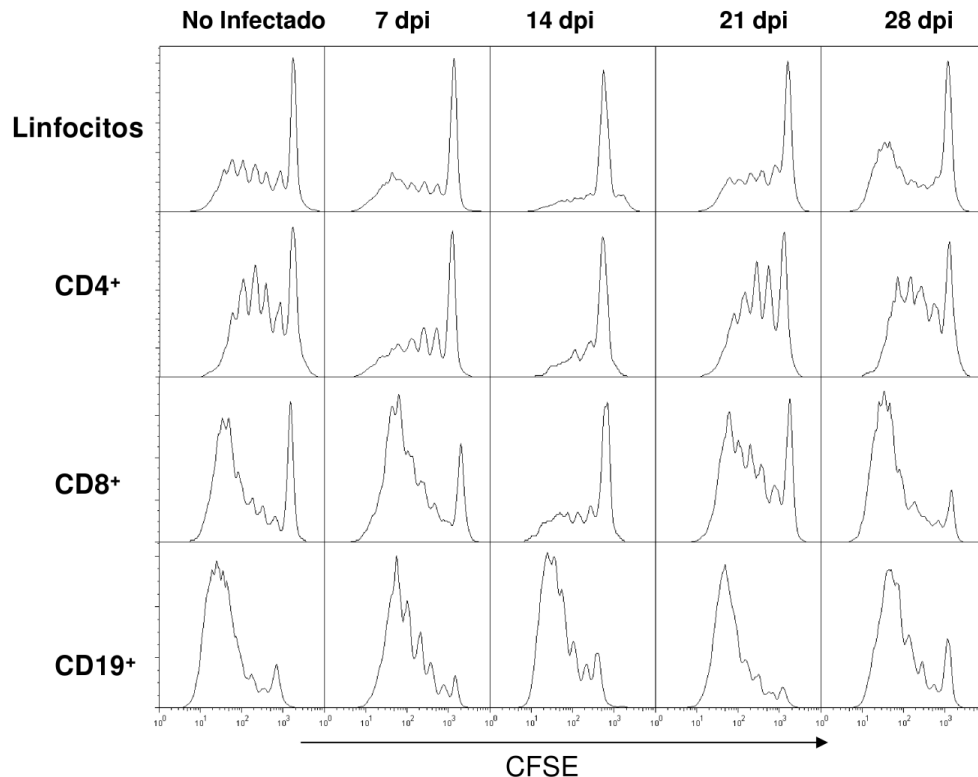


Figura 14 La infección con *T. gondii* en ratones C57BL/6J induce una inmunosupresión en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ pero no en linfocitos B. Esplenocitos de ratones C57BL/6 infectados y no infectados fueron teñidos con CFSE y estimulados con ConA o LPS. Después de 72 h las células se recuperaron, se tiñeron con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 o anti-CD19 y 7-AAD, se capturaron en el FACS y se analizaron como se indica en la Fig. 12.

Estos datos nos muestran claramente que la inmunosupresión observada durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* afecta únicamente a linfocitos T pero no a linfocitos B. Más aún, existen diferencias entre subtipos celulares que dependen de la resistencia o susceptibilidad de las cepas de ratón que utilizamos. Podemos concluir además, que el periodo de estudio más adecuado para estos experimentos es hasta el día 14 post-infección pues más allá de este punto las células proliferan al igual que células de ratones no infectados.

2 Caracterización de las células T_{reg} y su papel durante la inmunosupresión

Resumen de los hallazgos publicados en el artículo: **CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10.** Tenorio, E.P., Fernandez, J., Castellanos, C., Olguin, J., and Saavedra, R., *Eur. J. Immunol.* 2011. DOI: 10.1002/eji.201141507

Como se mencionó anteriormente, las células y moléculas involucradas en la inmunosupresión no han sido completamente elucidadas. Con el objetivo de determinar si las células T_{reg} son responsables de la inmunosupresión, infectamos ratones de la cepa C57BL/6J y caracterizamos a las T_{regs}, incluyendo su capacidad supresora y expresión de moléculas de activación. Finalmente evaluamos el papel de las T_{regs} durante la inmunosupresión eliminándolas selectivamente por FACS utilizando ratones Foxp3^{EGFP} y analizamos los posibles mecanismos de supresión utilizados por las T_{regs}. Nuestros resultados muestran que la fase donde se detecta la inmunosupresión coincide con una reducción en el porcentaje y número de células T_{reg}. Sin embargo, las células T_{reg} restantes se activan y adquieren una mayor capacidad supresora, lo que sugiere que a pesar de su reducción, las células T_{reg} podrían ser capaces de mantener la inmunosupresión compensando con su eficiencia la reducción de la población.

Con el objetivo de evaluar el papel de las células T_{reg} durante la inmunosupresión depletamos ratones con un mAb anti-CD25, los infectamos y verificamos la capacidad proliferativa de los esplenocitos. Encontramos que el tratamiento revertía la supresión observada en los animales infectados, sin embargo, al analizar las poblaciones eliminadas por el anticuerpo encontramos que el tratamiento eliminaba principalmente células activadas, no células T_{reg}. Debido a que este enfoque experimental no arrojó conclusiones reales sobre el papel de las T_{regs} durante la supresión (Ver sección 2 de resultados), seguimos una estrategia diferente. Utilizamos ratones transgénicos Foxp3^{EGFP} para eliminar selectivamente las células Foxp3⁺ de los esplenocitos por FACS antes de la estimulación y encontramos que al eliminar las células Foxp3⁺ la proliferación celular se recuperaba por completo, demostrando que las células T_{reg} son las responsables de la supresión.

Posteriormente evaluamos posibles mecanismos por los cuales estas células pudieran estar modulando la inmunosupresión. Primero analizamos la producción de NRI que han sido descritos como posibles moduladores de la supresión, pero en nuestros experimentos no encontramos que los NRI aumentaran durante la infección y su producción tampoco se modificó al eliminar las T_{regs} , demostrando que los NRI no están involucrados en nuestro sistema. Después, evaluamos la participación de la IL-10, que también se había reportado como una citocina involucrada en la supresión, además de ser un mecanismo supresor utilizado por las células T_{reg} . Encontramos que las células de los ratones infectados producían grandes cantidades de IL-10, y que al eliminar a las T_{regs} se reduce la IL-10 detectada en sobrenadante de cultivo. Al evaluar la capacidad de las T_{regs} de producir IL-10, encontramos que durante la infección se incrementó el porcentaje de T_{regs} productoras de dicha citocina. Estos datos sugerían fuertemente que las células T_{reg} inducen la supresión vía la producción de IL-10, sin embargo, al neutralizar la citocina con mAb en cultivo las células de los animales infectados se mantuvieron suprimidas, demostrando que la IL-10 no es el mecanismo utilizado por las T_{regs} para modular la supresión. Finalmente, evaluamos la posibilidad de que las T_{regs} utilizaran un mecanismo relacionado con la IL-2 para inducir la supresión. Nuestros resultados mostraron que las células de animales infectados producían bajas cantidades de IL-2 y que al eliminar las T_{regs} no se recuperaba la acumulación de la citocina, pero sí la proliferación celular. Esto sugería por un lado que las células T_{reg} no inhiben la producción de IL-2 y por otro lado que al eliminar a las T_{regs} la poca IL-2 disponible podía ser consumida por otras células T, permitiéndoles recuperar su capacidad proliferativa. Para evaluar el papel de la IL-2 en la inmunosupresión agregamos IL-2 recombinante (rIL-2) a los cultivos celulares y observamos una recuperación total de la proliferación, demostrando que la inmunosupresión es consecuencia de la baja disponibilidad de IL-2. Nuestros datos demuestran que las células T_{reg} son responsables de la inmunosupresión observada durante la infección con *T. gondii* y lo hacen independientemente de IL-10, pero a través de un mecanismo relacionado con la IL-2, probablemente por privación de la misma.

CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10

Eda P. Tenorio, Jacqueline Fernández, Carlos Castellanos,
Jonadab E. Olgún and Rafael Saavedra

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Acute *Toxoplasma gondii* infection comprises an immunosuppression stage, characterized by a reduction in T-cell proliferation in vitro. Treg cells maintain the homeostasis of the immune system, but their role in *T. gondii*-induced suppression has not been addressed. We show herein that immunosuppression, affecting both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation, concurs with a reduction in Treg-cell number. The residual Treg cells, however, are activated and display an increased suppressive capacity. We show that selective elimination of Treg cells using Foxp3^{EGFP} mice leads to a full recovery of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation. After Treg-cell removal, a reduced production of IL-10 was observed, but IL-2 levels were unchanged. The numbers of IL-10-producing Treg cells also increased during infection, although the in vitro neutralization of this cytokine did not modify T-cell proliferation, suggesting that IL-10 does not mediate the Treg-mediated suppression. However, addition of rIL-2 in vitro fully restored T-cell proliferation from infected animals. Thus, we show that Treg cells mediate the T-cell suppression observed during acute *T. gondii* infection through an IL-2-dependent mechanism. Our results provide novel insights into the regulation of the immune response against *T. gondii*.

Key words: IL-2 · IL-10 · Immunosuppression · Treg cells · *Toxoplasma gondii*

Introduction

Toxoplasma gondii is a worldwide distributed intracellular protozoan parasite that infects approximately one-third of the human population. Toxoplasmosis is usually clinically asymptomatic in healthy individuals, but it can cause severe complications in pregnant women and immunocompromised patients. In the latter, chronic infection can reactivate leading to disseminated toxoplasmosis and/or encephalitis that are often lethal. Primary infection during pregnancy may lead to abortion, neonatal malformations or defects that appear during child development [1].

Infection with *T. gondii* activates DCs to produce large amounts of IL-12 [2, 3] which in turn activates NK cells and T lymphocytes to produce IFN- γ [4, 5] leading to macrophage activation and parasite control [6, 7]. A T_{H1} immune response and cooperation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells are crucial for infection control [5, 8, 9]. Downregulation of the extremely strong T_{H1} immune response caused by infection is mediated by IL-10, lipoxinA₄ and IL-27 [10–12].

During acute infection with *T. gondii* a transient reduction in the proliferative response of T cells to mitogens or antigens is observed in humans and mice [13–17]. Analysis of cells and molecules involved in the immunosuppression observed during *T. gondii* infection has shown that IFN- γ -dependent reactive nitrogen intermediates (RNIs) produced by macrophages and IL-10 are implicated in this process [16–21]. However, neutralization of these molecules restores only partially T-cell

Correspondence: Dr. Rafael Saavedra
e-mail: saavedra@servidor.unam.mx

proliferation capacity. Furthermore, it has been demonstrated that splenocytes from infected IL-10^{-/-} and IRF-1^{-/-} mice are also suppressed [19, 22], thus indicating that additional mediators are involved in immunosuppression. A recent report suggested that Treg cells could be involved in the suppression observed during other parasitic infection [23].

Treg cells are CD4⁺ lymphocytes that constitutively express CD25 [24], CTLA-4 [25] and the Treg cell-specific transcription factor Foxp3 [26, 27], which is required for the development and the suppressive capacity of these cells. Treg cells are involved in control of autoimmunity, immune response against tumors, tissue transplants and infectious agents [28, 29]. Several roles for Treg cells during infectious diseases have been described, including control of the pathology, maintenance of immunity against reinfection and favouring pathogen establishment or persistence [29]. We previously showed that Treg cells play an important role in the protective response against *T. gondii*, since removal of Treg cells led to an increased mortality rate in the resistant BALB/c mouse strain [30]. Moreover, treatment of *T. gondii*-infected susceptible C57BL/6J mice with IL-2-anti-IL-2 complexes resulted in an increased Treg-cell frequency and survival, which correlated with reduced morbidity [31]. Additionally, adoptive transfer of Treg cells has been reported to reduce the abortion rate in pregnant mice injected with excretory–secretory antigens from the parasite [32]. These studies demonstrate that Treg cells are important mediators of the immune response during *T. gondii* infection.

The aim of this study was to determine whether Treg cells are involved in the immunosuppression observed during acute infection with *T. gondii*. We studied the suppression induced in C57BL/6J mice infected with the ME49 strain of *T. gondii*. We analysed the different cell subsets suppressed and characterized the Treg-cell population, including their suppressive capacity and expression of activation molecules. We evaluated the role of Treg cells in immunosuppression by selective elimination of these cells using Foxp3^{EGFP} mice and explored some possible mechanisms for Treg cell-induced suppression during *T. gondii* infection.

Results

Infection with *T. gondii* induces suppression of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation

In order to evaluate the suppression of different cell types during acute *T. gondii* infection, we analysed the mitogen-induced proliferation of splenocytes from C57BL/6J mice using CFSE. A representative FACS analysis (Fig. 1A) showed that proliferation of ungated splenocytes at 7 d post infection (dpi) was slightly reduced when compared with cells from uninfected mice, but at 14 dpi the reduction was stronger. Cell proliferation, however, was completely restored at 21 dpi. The same proliferation pattern was observed in CD4⁺ T cells. The proliferation of CD8⁺ T cells at 7 dpi was comparable to that of cells from uninfected animals,

but was dramatically reduced at 14 dpi, and was restored at 21 dpi, while LPS-induced B-cell proliferation was not affected. Accordingly, data from different experiments showed that the percentage of divided cells from the ungated population (Fig. 1B) is significantly reduced at 7 and 14 dpi. The percentage of CD4⁺ divided cells was halved at 7 and 14 dpi, while in the CD8⁺ subset it was only significantly reduced at 14 dpi. The percentage of CD19⁺ divided cells, however, increased approximately 30% and remained significantly higher during the period analysed. These data demonstrate that *T. gondii*-induced immunosuppression in Con A-stimulated splenocytes and in isolated CD4⁺ T cells observed by ³H-thymidine incorporation [15, 33] is also detected using CFSE dilution. Furthermore, we show that CD4⁺ and CD8⁺ T cells have different suppression patterns while CD19⁺ cells display an increased proliferation.

Treg-cell number decreases but residual Treg cells activate and increase their suppressive capacity

Given that Treg cells suppress the proliferation of different cell types [34], it was tempting to speculate that the immunosuppression observed during *T. gondii* infection could be mediated by this cell population. However, as can be observed in a representative FACS analysis (Fig. 2A), the percentage of CD4⁺Foxp3⁺ cells decreased at 7 dpi, and markedly dropped at 14 dpi. Results from several experiments showed that Treg-cell percentage decreased by 16.3% at 7 dpi and by 50.4% at 14 dpi (Fig. 2B) when compared with control animals. A similar reduction in the absolute number of Foxp3⁺ cells was also detected (Fig. 2C), demonstrating that the decline in Treg-cell percentage is not consequence of a disparity in the proportion of other cell subsets. Further analysis of the residual Treg cells showed that at 7 dpi the percentage of natural Treg cells (Helios⁺) and induced Treg cells (Helios⁻) is comparable to that observed in uninfected animals, whereas at 14 dpi a slight reduction in the proportion of natural Treg cells was observed (Fig. 2D and E).

The above results indicate that *T. gondii*-induced suppression concurs with a reduction in Treg cell number. In order to explain this apparent contradiction, we analysed the expression of activation markers in the residual Treg-cells. We focused on cells from mice at 7 dpi because at this time point immunosuppression was already detected and the number of Treg cells still allowed a proper analysis. Expression of CD25, CTLA-4 and GITR rose up in Foxp3⁺ cells from infected mice (2.5-, 3- and 0.5-fold, respectively); the proportion of Treg cells expressing these molecules was also slightly increased (Fig. 3). Analysis of additional activation molecules showed that the percentage of CD69⁺ and CD62L⁻ cells increased 1.9- and 1.3-fold, respectively. Modulation of these molecules has already been reported after Treg-cell activation [25, 35–37]. A significantly enhanced expression of CD69 was also detected; expression of CD62L and CD103 remained unchanged. Thus, although infection leads to a reduction in Treg-cell number, the residual cells display an activated phenotype.

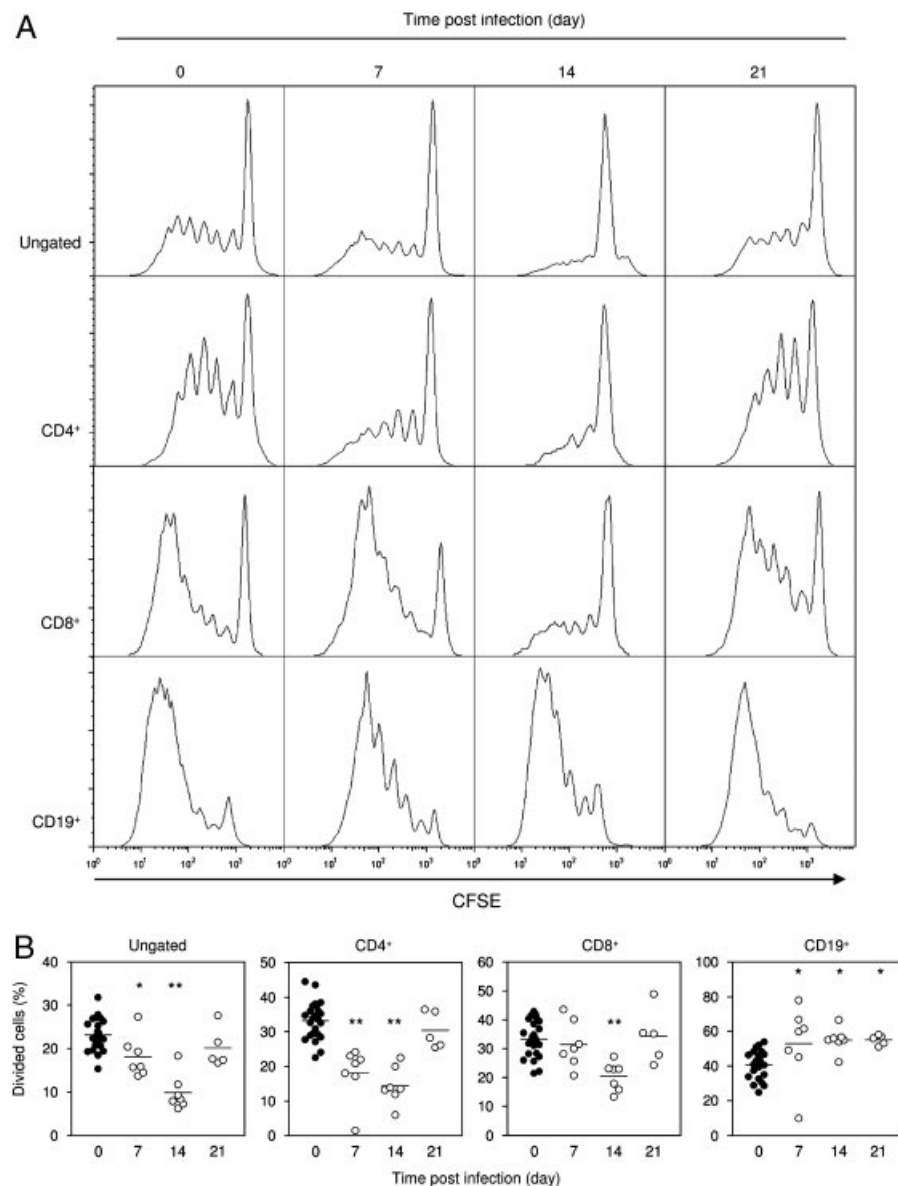


Figure 1. Infection with *T. gondii* induces immunosuppression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells but not in B cells. Splenocytes from WT mice obtained at the indicated times post infection, were stained with CFSE and stimulated with Con A or LPS for 72 h. Cells were stained with anti-CD4, anti-CD8 or anti-CD19 mAbs and 7-AAD and immediately analysed by FACS. The lymphocyte gate was defined by FSC and SSC characteristics within living cells (7-AAD⁻, Ungated), further subgatings of the CD4⁺, CD8⁺ and CD19⁺ cells were carried out and 10 000 events of each subpopulation were captured. (A) Representative analysis of proliferation by CFSE dilution for each gate. (B) Results of two independent experiments with three mice per group per time point expressed as percentage of divided cells. Data obtained with cells from infected mice were compared with data obtained with cells from uninfected mice (day 0) using One-Way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test, **p*<0.05, ***p*<0.01.

Treg-cell activation observed after infection suggested that these cells might also increase their suppressive capacity. We thus compared the suppression capacity of Treg cells from infected and uninfected mice against target cells from uninfected animals. We initially carried out suppression assays using CD4⁺CD25⁺ cells as Treg cells and CD4⁺CD25⁻ cells as target cells, and found a slight increase in the suppression capacity of CD4⁺CD25⁺ cells obtained from infected mice (data not shown). Although this separation protocol is the most commonly used, an increase in the CD4⁺Foxp3⁻CD25⁺ cell population, corresponding to activated T cells, is observed in infected mice (Fig. 4A, 1.3 versus 17.5%). Therefore, the CD4⁺CD25⁺ fraction used in that system was enriched with activated T cells, and the suppression capacity of Treg cells from infected animals cannot be addressed. In order to overcome this issue, we used Foxp3^{EGFP} mice to sort Foxp3⁺ Treg cells and CD4⁺

Foxp3⁻CD25⁻ cells as target cells to carry out the suppression assay (Table 1). Results obtained from three independent experiments showed that although Treg cells from uninfected animals are able to suppress proliferation at various degrees (36.1–85.7%), Treg cells from infected mice induced a significantly higher suppression of target cells proliferation (84.3–97.4%); as expected, Treg cells alone were unable to proliferate under these conditions. These results demonstrate that during infection, the residual activated Treg cells display an increased suppressive capacity.

Treg cells mediate *T. gondii*-induced suppression

The activated phenotype and the increased suppression capacity of the residual Treg cells could explain the apparent discrepancy

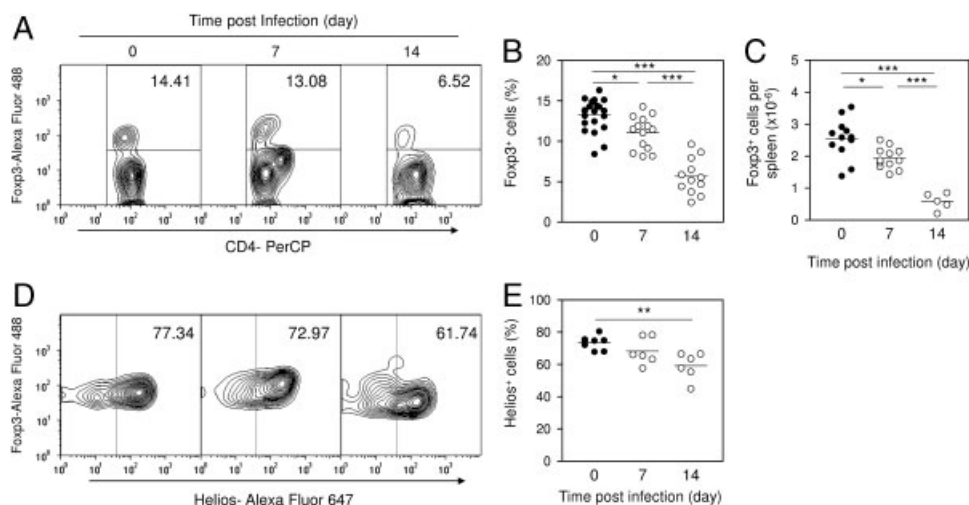


Figure 2. Infection with *T. gondii* induces a reduction in Treg-cell number. Splenocytes from either WT or Foxp3^{EGFP} mice were obtained at 7 and 14 days post infection (dpi). (A, B, D, E) Cells from WT mice were incubated with anti-CD4, anti-Foxp3 and anti-Helios mAbs and analysed by FACS. The lymphocyte region was first identified and gated according to its FSC and SSC characteristics, the CD4⁺ region was subgated and 10 000 CD4⁺ cells were captured. (A) Representative results of Treg-cell detection; percentages of CD4⁺Foxp3⁺ cells in the CD4⁺ gate are displayed. (B) Results of five independent experiments with at least two mice per group expressed as percentage of Foxp3⁺ cells in the CD4⁺ gate. (C) Cells from Foxp3^{EGFP} mice were mixed with CountBright Absolute Counting Beads and immediately analysed by FACS. Results from two independent experiments with at least two mice per group are expressed as absolute numbers of Foxp3^{EGFP} cells per spleen. (D) Representative results of Helios expression detection; percentages of Foxp3⁺ Helios⁺ cells in the CD4⁺ Foxp3⁺ gate are shown. (E) Results of two independent experiments with at least three mice per group are expressed as percentage of Helios⁺ cells in the CD4⁺ Foxp3⁺ gate. In (B, C, E), results were analysed using One-Way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

between the immunosuppression and the reduced proportion of Treg cells observed during infection. In a first attempt to evaluate the role of Treg cells in the observed immunosuppression, we injected animals with anti-CD25 mAb and examined whether proliferation was recovered. However, as we previously reported, treatment of C57BL/6J mice with anti-CD25 mAb before infection eliminates mainly activated cells, and thus the role of Treg cells is impossible to elucidate using this approach [38]. Thus, we used Foxp3^{EGFP} mice to directly assess whether Treg cells mediate immunosuppression.

Foxp3⁺ cells were eliminated by cell sorting (Fig. 4A) and proliferation of Foxp3⁻ cells was analysed (Fig. 4B). As expected, proliferation of ungated, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes was suppressed when unsorted splenocytes were assayed. These results are indistinguishable from those shown in Fig. 1, demonstrating that the EGFP⁺ phenotype does not alter the immunosuppression pattern of *T. gondii*-infected mice. When Foxp3⁺ cells were eliminated from infected mice splenocytes, a proliferation recovery was clearly observed in the ungated population. CD4⁺ cells showed a strong proliferation, similar to that observed in cells from uninfected mice. CD8⁺ cells from infected animals also recovered their proliferative response. Elimination of Foxp3⁺ cells from uninfected mice did not alter proliferation of CD4⁺ nor CD8⁺ cells.

Statistical analysis of the data collected from two independent experiments confirmed that after Treg-cell removal the percentage of divided CD4⁺ cells from infected mice was significantly enhanced and was similar to that of cells from uninfected animals (Fig. 4C); a non-significant increase in the percentage of divided

cells from the ungated and CD8⁺ subsets was observed. Since the percentage of divided cells only represents the proportion of the original population that responded by dividing [39] we also calculated the percentage of proliferating cells (cells found in any round of division). Figure 4D shows that when Treg cells are eliminated, the percentages of proliferating CD4⁺ and CD8⁺ cells are similar for uninfected and infected animals. These data thus demonstrate that Treg cells mediate the immunosuppression observed during acute *T. gondii* infection.

Treg cells mediate immunosuppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10

We analysed some possible mechanisms that could explain the Treg cell-mediated immunosuppression described above. Since it was previously reported that during *T. gondii*-induced suppression, IL-2, RNIs and IL-10 are involved [16, 17, 20, 21, 40], we evaluated the effect of Treg-cell removal on the production of these mediators in vitro. NO₂⁻ production was similar in cells from uninfected and infected animals and Treg-cell elimination had no effect in the production of this molecule (Fig. 5), demonstrating that in our system RNIs are not involved in Treg cell-mediated suppression.

The role played by IL-10 in *T. gondii*-induced suppression has been controversial [17, 19–22]. However, since it has been described as a suppressive mechanism of Treg cells, we analysed IL-10 production. As can be observed in Fig. 5, no IL-10 could be detected in culture supernatant of cells from uninfected mice, while cells from infected animals produced highly significant

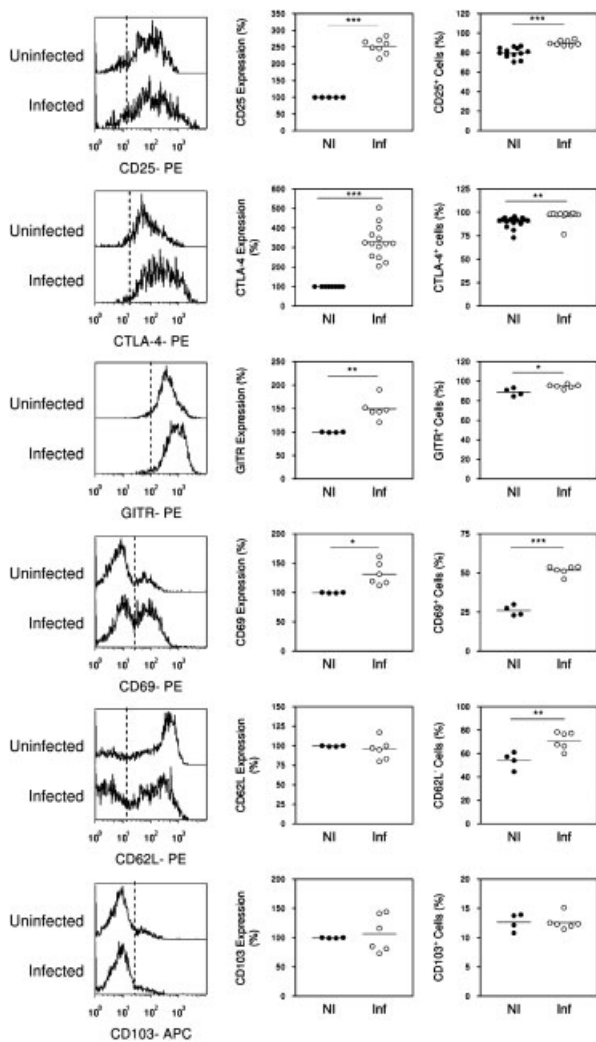


Figure 3. Treg cells display an activated phenotype in acute *T. gondii* infection. Splenocytes from WT mice obtained at 7 dpi were stained with anti-CD25, anti-CTLA-4, anti-CD69, anti-CD62L, anti-CD103 or anti-GITR, and analysed by FACS. The lymphocyte region was first identified and gated according to its FSC and SSC characteristics, the CD4⁺Foxp3⁺ region was subgated and 5000 events of this population were captured. Representative histograms are shown for each of the studied activation marker; dotted line indicates the fluorescence threshold. Mean fluorescence intensity was normalized and graphed as percentage expression. Percentage of cells expressing each molecule is also shown. Data were obtained from two independent experiments, including at least two mice per group. Data were analysed using Student t test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. NI: Uninfected. Inf: Infected.

levels of IL-10. Moreover, elimination of Treg cells led to a drastic reduction of the cytokine level. Because this reduction in IL-10 levels correlated with a recovery of T-cell proliferation after Treg-cell removal, we hypothesized that IL-10 produced by Treg cells could be a key molecule involved in the suppression. We thus first analysed IL-10 production by Foxp3⁺ and Foxp3⁻ cells from infected mice. As can be observed in Fig. 6, IL-10 was produced by both Foxp3⁺ and Foxp3⁻ cells, but after infection, a 3-fold increase in the proportion of IL-10-producing cells was observed in the Treg-cell population only, suggesting that these cells were

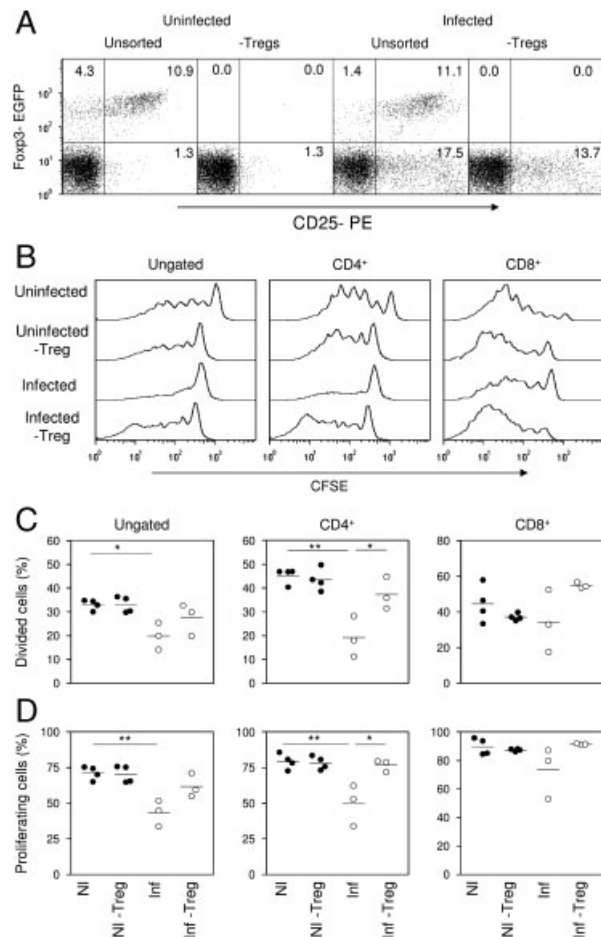


Figure 4. Treg cells mediate immunosuppression during acute *T. gondii* infection. Foxp3⁺ cells from uninfected or infected Foxp3^{EGFP} mice splenocytes were eliminated by cell sorting. The Foxp3⁻ cells were stained with CFSE and stimulated with Con A for 72 h. (A) Representative analysis of the sorted populations according to CD25 and Foxp3 expression. (B) Proliferation was evaluated as described in Fig. 1, in the ungated, CD4⁺ and CD8⁺ populations. Representative histograms are shown. (C, D) Results of two independent experiments with two mice per group per time point expressed as percentage of divided cells (C) and percentage of proliferating cells (D). Results were analysed using ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. NI: Uninfected. Inf: Infected.

the source of the increased amount of IL-10 found in the supernatant. We next carried out *in vitro* IL-10 neutralization in order to test if this cytokine was responsible of the Treg cell-mediated suppression. Addition of anti-IL-10 mAb did not alter the proliferation of the ungated, the CD4⁺ and CD8⁺ subsets from infected mice (Fig. 7A and B) demonstrating that IL-10 was not responsible for the Treg-cell suppressive effect on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, despite the increased proportion of IL-10-producing Treg cells detected during infection.

We finally explored the possibility that the observed suppression by Treg cells was IL-2-dependent. IL-2 levels in culture supernatants of stimulated splenocytes were drastically reduced in the supernatant of cells from infected animals when compared with uninfected animals (Fig. 5), as reported [17, 20,

Table 1. Con A-induced proliferation of target cells is highly suppressed by Treg cells from *T. gondii*-infected mice

Target cells ^{a)}	Treg cells ^{a)}	[³ H] Thymidine uptake (cpm ± SD)		
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
Uninfected	–	6600.6 ± 268.9	6858.1 ± 1431.3	8963.7 ± 2882.3
Uninfected	Uninfected	4217.6 ± 1426.2* (36.1%) ^{b)}	3707.9 ± 865.1* (46.0%)	1278.9 ± 554.4* (85.7%)
Uninfected	Infected	1035.0 ± 162.4*** (84.3%)	1897.1 ± 282.2** (72.3%)	228.8 ± 69.7* (97.5%)
–	Uninfected	254.6 ± 78.1	292.1 ± 53.4	1213.8 ± 1151.5
–	Infected	202.9 ± 26.9	112.8 ± 14.9	67.3 ± 2.5

Data obtained from each co-culture were compared with that obtained with target cells alone according to One-Way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

^{a)} Target cells (CD4⁺Foxp3[–]CD25[–]) and Treg cells (CD4⁺Foxp3⁺) from Foxp3^{EGFP} mice were separated by cell sorting. Cells were seeded at a ratio 2:1 (Target:Treg cells).

^{b)} Percentage of suppression was calculated according to the following formula: $[(\text{cpm}_0 - \text{cpm}_{\text{mix}}) / \text{cpm}_0] \times 100$, where cpm_0 is the [³H]-Thymidine uptake by target cells alone and cpm_{mix} is the uptake by the co-culture of targets and Treg cells.

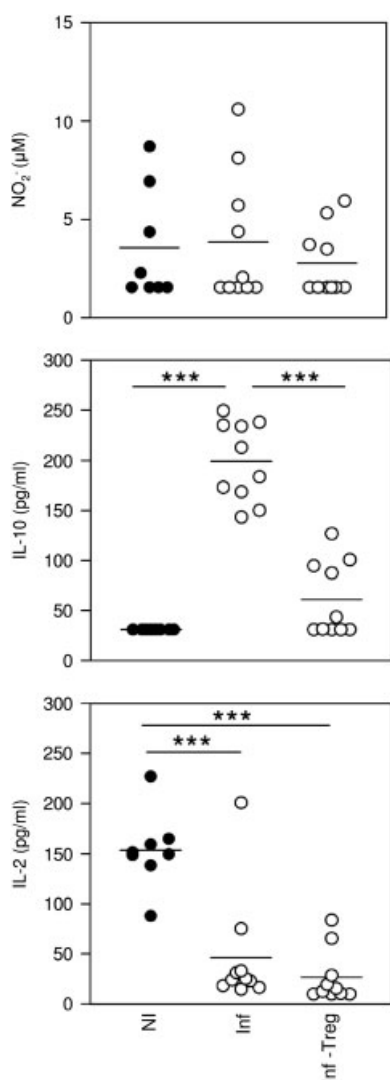


Figure 5. Selective elimination of Treg cells reduces IL-10 production, but IL-2 and NO₂[–] levels are unaffected. Foxp3[–] splenocytes were sorted as described in Fig. 4. Culture supernatants were collected after a 24 h stimulation period with Con A, and IL-2, IL-10 and NO₂[–] production was determined. Data were analysed using ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test, *** $p < 0.001$. NI: Uninfected. Inf: Infected.

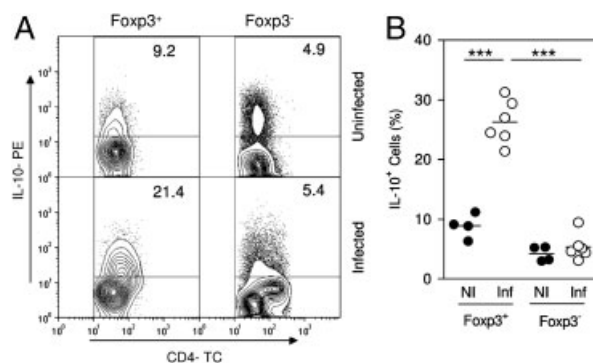


Figure 6. The numbers of IL-10-producing Treg cells increase during acute infection with *T. gondii*. Splenocytes from uninfected or infected Foxp3^{EGFP} mice were obtained at 7 dpi. Cells were stimulated with PMA/ionomycin, stained with anti-CD4 and anti-IL-10 mAb and analysed by FACS. The lymphocyte gate was defined using its FSC and SSC characteristics within the CD4⁺ gate; further subgatings of the CD4⁺Foxp3⁺ and CD4⁺Foxp3[–] subsets were performed and these subsets were analysed for IL-10 expression. Five thousand CD4⁺Foxp3⁺ events were captured. (A) Representative contour plots of IL-10-producing cells in the Foxp3⁺ and Foxp3[–] populations. (B) Data obtained from two independent experiments with at least two mice per group. Results were analysed using One-Way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test, *** $p < 0.001$. NI: Uninfected. Inf: Infected.

21, 31, 33]. Removal of Treg cells, however, led to a slight but non-significant reduction of IL-2 levels (Fig. 5), suggesting that Treg cells do not suppress IL-2 production. The absence of IL-2 accumulation also indicated that either this cytokine is not involved in Treg cell-mediated immunosuppression or that the Treg and conventional T (Tconv) cells could compete for the reduced IL-2 concentrations. Thus, to evaluate if the Treg-mediated suppression was related to a reduced availability of this cytokine, we added rIL-2 to cell cultures from infected mice, and found that proliferation of the ungated as well as the CD4⁺ and CD8⁺ cells was fully restored (Fig. 8A and B). Proliferation of T cells from uninfected mice, however, was unaffected by rIL-2 addition (Fig. 8A and B). All these results demonstrate that the Treg cell-mediated immunosuppression observed during acute *T. gondii* infection is consequence of a reduced IL-2 availability for T cells.

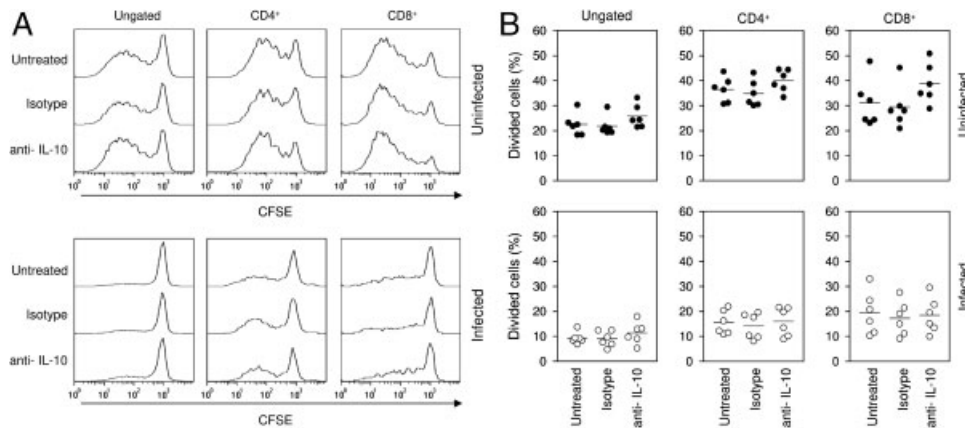


Figure 7. IL-10 neutralization does not modify *T. gondii*-induced suppression. Splenocytes from WT mice were obtained at 7 dpi, stained with CFSE and stimulated with Con A in the presence of anti-IL-10 (30 µg/mL) or isotype control mAbs. After 72 h, cells were stained and analysed as described in Fig. 1. (A) Representative analysis of cells obtained from one uninfected and one infected animal. Proliferation by CFSE dilution for each gate is shown. (B) Data obtained from two independent experiments including three mice per group, showing the percentage of divided cells. No statistical difference was found between groups using One-Way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test.

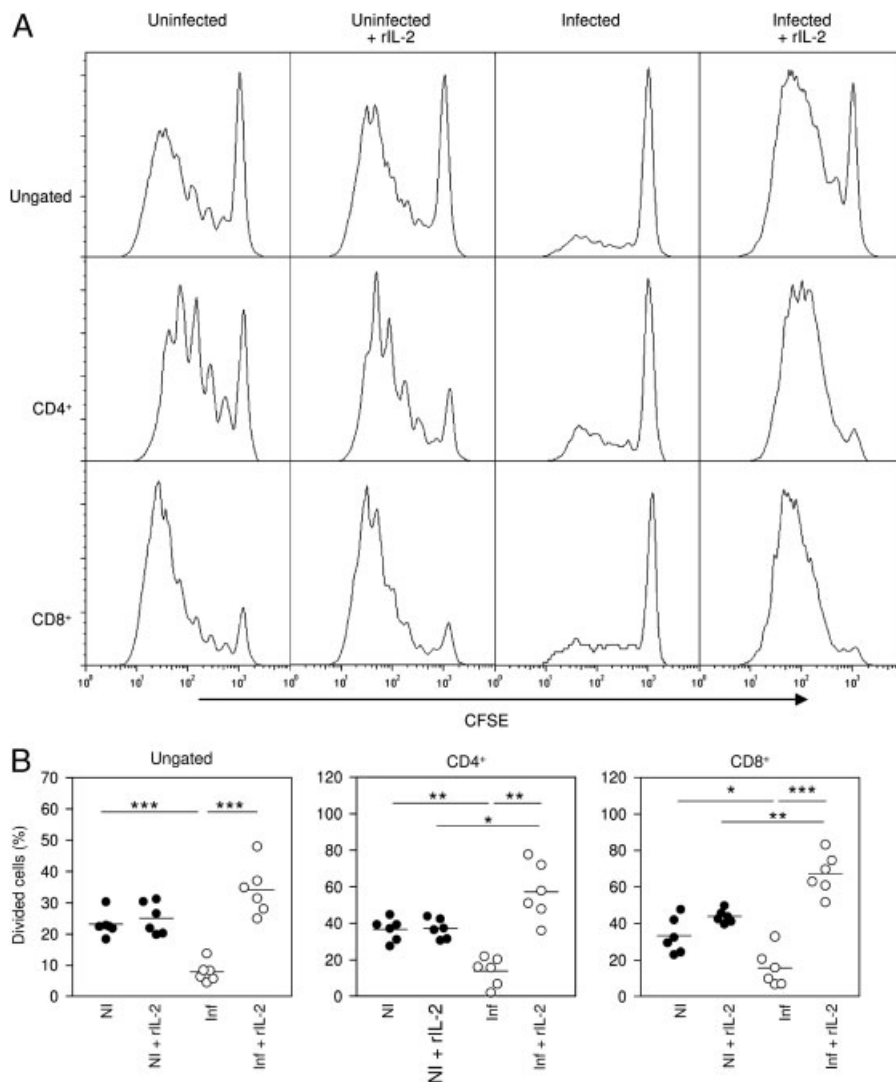


Figure 8. Treg-cell-mediated immunosuppression during acute *T. gondii* infection is IL-2 dependent. Splenocytes from WT mice were obtained at 7 dpi, stained with CFSE and stimulated with Con A in the presence or absence of rIL-2 (20 U/mL). After 72 h, cells were stained and analysed as described in Fig. 1. (A) Representative analysis of cells obtained from one uninfected and one infected animal. Proliferation by CFSE dilution for each gate is shown. (B) Results of two independent experiments with three mice per group showing the percentage of divided cells. Data were analysed using ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Discussion

The aim of this work was to evaluate a possible role for Treg cells in the immunosuppression observed during the acute phase of *T. gondii* infection in C57BL/6J mice. This suppression has been described using different mitogens and the [³H]-thymidine incorporation assay. In order to determine the cell types affected by the parasite, we analysed proliferation of mouse splenocytes using CFSE. Our results confirm previous findings showing that T cells are unable to respond to mitogens during acute infection [15, 16, 33] and further show that only CD4⁺ and CD8⁺ T cells, but not B cells, were affected. Although suppression of CD4⁺ T cells has already been reported [33], this is the first report describing suppression of CD8⁺ T cells during *T. gondii* infection.

Treg cells suppress the proliferation and cytokine production of other cells [34] and have been shown to control immune response in several infection models [29]. These properties suggested that these cells could mediate the immunosuppression observed during *T. gondii* infection. However, we found a reduction in the proportion and absolute numbers of Treg cells during the first two wks of infection, an observation which is in agreement with the recent reports [30–32]. Oldenhove et al. recently reported a decrease in Treg cell number during *T. gondii* infection related to the inhibition of peripheral induction of Foxp3⁺ T cells in GALT [31] and suggested that an impaired Treg-cell conversion might be involved in this reduction. In order to further characterize the Treg-cell phenotype during infection, we examined the transcription factor Helios which has been recently described as a molecule that can be used to discriminate between natural and induced Treg cells [41], and it has already been employed as a marker in murine and human models [42–44]. Analysis of this molecule in the residual Treg cells of *T. gondii*-infected mice showed that the proportion of natural and induced Treg cells was unchanged at 7 dpi, although a slight increase in Helios⁺ cells was observed at a later time point, suggesting that the amount of induced Treg cells is not impaired during the first wk of infection. However, a recent study demonstrated that Helios expression is more related to the method of activation of T cells than to the Treg-cell origin [45]. Thus, given that the use of Helios as a definitive marker for natural Treg cells is still unclear, further studies are required to address this issue.

Treg-cell number reduction seemed contradictory with the observed immunosuppression. The paradox of a reduced number of Treg cells mediating suppression could be explained if the residual Treg cells were activated and displayed an increased suppressive capacity. The remaining Treg cells were indeed highly activated, as denoted by the increased expression of CD25, CTLA-4, CD69 and GITR, the loss of CD62L expression and their capacity to produce IL-10. Furthermore, suppression assays showed that Treg cells from infected animals display an increased suppressive capacity when compared with cells from uninfected mice. Since at the time point studied (7 dpi) a reduction of only 16.3% of Treg cells is observed, the activation and acquisition of a higher suppressive capacity of the remaining Treg cells could

easily explain the ability of these cells to mediate immunosuppression. The activation of Treg cells described herein is consistent with data previously reported during other infectious diseases [46–50], and supports the idea that Treg-cell activation could be a natural response towards some pathogens. Whether Treg-cell activation depends on molecules derived from the parasite, on the proinflammatory environment, or both, remains to be established.

The increased suppressive capacity we observed in Treg cells from infected animals, however, contrasts with a recent report indicating that there is no difference between the suppression capacity of Treg cells from *T. gondii*-infected animals and that of uninfected mice [31]. The discrepancy could be explained by differences in inoculum size, animal sex, T cell stimuli, source of T cells used in the assay and the methodology used for detection of proliferation.

Regardless of Treg-cell number reduction, the activation and increased suppressive function of the remaining Treg cells supported the hypothesis that these cells were involved in the immunosuppression. Full restoration of the proliferation pattern of CD4⁺ and CD8⁺ cells from infected mice splenocytes after selective elimination of Foxp3⁺ cells definitively demonstrated that Treg cells are the key cells mediating the suppression observed during acute *T. gondii* infection.

Since this is the first time that *T. gondii*-induced suppression is fully reversed, we studied some possible mechanisms to explain the Treg cell-mediated suppression. Earlier reports showed that RNIs produced by macrophages are important for induction of *T. gondii*-induced suppression [16, 17, 21, 22, 40]. However, we did not find alterations in the in vitro NO₂⁻ concentration, neither after infection or after Treg-cell elimination, demonstrating that in our model NO₂⁻ is not involved in the suppression induced by Treg cells. Our results are supported by the data of Khan et al., who showed that Con A-stimulated splenocytes from *T. gondii*-infected IRF-1^{-/-} mice remained suppressed even in the presence of the RNI inhibitor N^G-monomethyl-L-arginine monoacetate [19].

Interestingly, other molecules previously studied as mediators of immunosuppression are also reported mechanisms of Treg-cell function, including the inhibitory cytokines TGF-β and IL-10 [34]. TGF-β does not seem to participate in *T. gondii*-induced suppression, since we did not detect membrane bound TGF-β in Treg cells from infected mice (data not shown), and previous reports showed that addition of anti-TGF-β antibodies to in vitro cultures of spleen cells from infected mice does not reverse immunosuppression [19, 20].

We thus analysed the possible role of IL-10 and found an increased level of this cytokine in cell culture supernatants from infected animals, as previously reported [17, 19–21, 33]; Treg-cell removal led to a reduction in IL-10 levels, an observation that correlated with T-cell proliferation recovery. Additionally, we found an increased proportion of IL-10-producing Treg cells in infected animals, a result that reinforced the hypothesis that this cytokine could be responsible for the immunosuppression. This result was unexpected since it was previously reported that during infection with *T. gondii* most IL-10 is produced by

Foxp3⁻ T_{H1} cells [51]. However, our results are supported by data previously published by Oldenhove et al. [31], who demonstrated that despite Treg-cell number reduction, these cells maintain their capacity to produce IL-10.

Analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation in the presence of anti-IL-10 mAb, however, revealed that this cytokine does not mediate immunosuppression. Our results agree with those obtained in *T. gondii*-infected IL-10^{-/-} mice, where T-cell suppression is similar to that observed in WT mice [22], although earlier reports of IL-10 in vitro neutralization in splenocytes from infected animals showed a partial reversion of suppression [17, 19–21]. Thus, despite an increase in IL-10-producing Treg cells in infected animals, and the concomitant reduction in IL-10 levels and T-cell proliferation recovery after Treg-cell removal, IL-10 is not involved in the Treg cell-mediated immunosuppression.

Given the lack of contribution of RNIs and IL-10 in Treg cell-mediated suppression, we evaluated a possible role of IL-2, since deprivation of this cytokine is a reported Treg-cell mechanism [52–55]. We found reduced IL-2 levels in culture supernatants of cells from infected animals, as reported [17, 20, 21, 31, 33]. Treg-cell removal did not restore IL-2 levels but fully reversed T-cell proliferation, suggesting that Treg cells do not inhibit IL-2 production. In contrast, when rIL-2 was added to cell cultures, complete restoration of T-cell proliferation occurred, even in the presence of Treg cells. Therefore, proliferation recovery was independently achieved either by removing Treg cells or by addition of rIL-2, showing that immunosuppression mediated by Treg cells during *T. gondii* infection is a consequence of a lack of IL-2 for Tconv cells.

The fact that T-cell proliferation from infected animals was fully restored in the absence of Treg cells (Fig. 5), even if IL-2 levels were low (Fig. 6), demonstrates that Tconv cells proliferate in a milieu of low IL-2 availability. These observations thus suggest that when limiting amounts of IL-2 exist, competition for this cytokine could take place between activated Treg and Tconv cells. Hence, Treg cells in our model might act by IL-2 deprivation. This hypothesis is supported by a recent mathematical model reported by Busse et al. [56] predicting that IL-2 deprivation by Treg cells occurs under conditions of limited IL-2 supply.

Clear evidence of IL-2 deprivation was recently provided by Pandiyan et al. [53], who demonstrated that Treg cells “imbibe” more IL-2 than Tconv cells, particularly after activation, and this IL-2 deprivation leads to apoptosis of Tconv cells. In our model, Treg cells are activated and express very high levels of CD25 and could thus become more efficient IL-2 consumers. Furthermore, we observed that addition of IL-2 also led to increased cell viability (data not shown). The results obtained in our work thus strongly suggest that Treg cells mediate immunosuppression by IL-2 deprivation. However, additional experiments are required to confirm this hypothesis.

IL-2 is a molecule essential for mice survival after *T. gondii* infection [31, 57] and our results highlight the importance of this cytokine. It has been demonstrated that the reduced number of Treg cells during acute infection is consequence of a reduced IL-2 availa-

bility [31], and is probably related to IL-27 [58], which has been shown to cooperate with IL-12 to suppress IL-2 production during acute infection [59]. Our results suggest that the reduced IL-2 levels favours the competition for this cytokine between activated Treg cells and Tconv cells and that IL-2 exhaustion by activated Treg cells leads to the immunosuppression of CD4⁺ and CD8⁺ cells, but not of B lymphocytes, that do not require IL-2 for proliferation [60]. These events could thus contribute to the highly inflammatory immune response that is characteristic during *T. gondii* infection.

Analysis of Treg cells during *T. gondii* infection by several groups has shown a reduction of these cells in C57BL/6/J, BALB/c and in pregnant mice [30–32]. We have shown herein that regardless of their reduction, Treg cells display an activated phenotype and a higher suppressive capacity, leading these cells to mediate immunosuppression. Interestingly, IL-10 does not participate as a modulator of suppression, despite the increase of IL-10-producing Treg cells. Instead, our results suggest that IL-2 deprivation is the mechanism used by Treg cells to mediate *T. gondii*-induced suppression. The role of Treg cells we describe herein as the mechanism controlling immunosuppression opens a new insight in the immunoregulation previously described for *T. gondii* infection.

Materials and methods

Mice

Six–eight-wk-old C57BL/6J (WT), and Swiss-Webster mice were bred in our animal house and maintained in microisolator cages according to the institutional guidelines. Foxp3^{EGFP} knock-in mice (B6.Cg-Foxp3tm2Tch/J), coexpressing Foxp3 and Enhanced GFP were obtained from The Jackson Laboratory and maintained under the same conditions in our animal house. All experiments were carried out with age and sex matched animals. Animal experimentation protocols were approved by the local Bioethics Committee for Animal Research.

Parasites and infection

The ME49 strain of *T. gondii* was maintained in Swiss-Webster mice as previously described [61]. For parasite maintenance, Swiss mice were infected i.p. with ten cysts obtained from brains of infected animals. For peroral infection, mice weighing 18–20 g were anesthetized with Sevoflurane (Abbott) and infected by gavage with 25 cysts obtained from Swiss mice infected 2–4 months earlier.

Flow cytometry and mAbs

The following fluorochrome-conjugated mAbs were used: anti-CD3-FITC or -Cy5 (500A2); anti-CD4-TC, -PE or -APC (RM4-5);

anti-CD8-FITC, -PE or -APC (5H10); anti-CD19-PE (6D5); anti-CD25-APC or -PE (PC61 5.3) from Caltag; anti-CD152-PE (CTLA-4, UC10-4B9); anti-Foxp3-Alexa Fluor 488 (FJK-16s) from eBioscience; anti-CD69-PE (HL2F3), anti-CD62L-PE (MEL-14), anti-GITR-PE (DTA-1), anti-CD103-PE (2E7), anti-Helios-Alexa Fluor 647 (22F6) and anti-IL-10-PE (JES5-16E3) from Biolegend. Cell surface molecules were detected by incubating 10^6 cells with the indicated mAb in washing buffer (DPBS, 1% FCS, 0.1% NaN_3) for 30 min (4°C , in the dark). Cells were washed twice, resuspended in DPBS and analysed by FACS. Foxp3, Helios and CTLA-4 were detected using the eBioscience Foxp3 detection kit following manufacturer's instructions. For viability determination, cells were stained with $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ of 7-amino-actinomycin D (7-AAD, Molecular Probes), as previously described [62]. Cells were acquired using a FACScan, FACScalibur or FACSAria cytometer (Becton Dickinson). Data were analysed using the FlowJo Software V.5.7.2 (Tree Star).

Determination of absolute Foxp3⁺ cell numbers

Splenocytes from Foxp3^{EGFP} mice were obtained by perfusion and red blood cells were lysed with hypotonic NH_4Cl solution. Cells were washed and resuspended in 10 mL of DPBS. One hundred μL of the cell suspension were diluted 1:5 with DPBS and 50 μL of CountBright Absolute Counting Beads (Molecular Probes) were added. The diluted suspension was immediately analysed by FACS and the cell concentration was calculated following the manufacturer instructions. Total Foxp3^{EGFP} cell number per spleen was calculated as described elsewhere [63].

Intracellular IL-10 detection

Ten million splenocytes from Foxp3^{EGFP} mice were incubated with 20 ng/mL PMA, $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ionomycin and $2\ \mu\text{M}$ monensin in 1 mL of complete RPMI medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mM non-essential aminoacids, 1 mM sodium pyruvate, 25 mM HEPES, 50 μM 2-ME and 50 IU/mL penicillin streptomycin [GIBCO]), in each well of a 24-well plate (Costar) for 5 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 in air. Cells were harvested, stained with anti-CD4-TC and intracellular cytokine detection was performed as previously described [64]. Briefly, cells were washed with washing buffer, resuspended in 1 mL of 4% paraformaldehyde and incubated (15 min, room temperature) with occasional stirring. Cells were washed once ($1500 \times g$, 4°C , 5 min) and resuspended in washing buffer. One million fixed cells were washed with 1 mL of DPBS-S (DPBS containing 10 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 0.1% saponin, 0.05% NaN_3 , 0.1% BSA) and incubated (30 min, 4°C) with 25 μL of DPBS-S/Milk (5% nonfat dry milk in DPBS-S cleared by centrifugation [$15\ 000 \times g$, 30 min]). Cells were centrifuged and incubated with anti-IL-10-PE mAb in DPBS-S/milk (30 min, 4°C), washed twice with DPBS-S, resuspended in DPBS and immediately analysed by FACS.

Cell sorting

Splenocytes from Foxp3^{EGFP} mice were first enriched by positive selection using anti-CD4 Microbeads (Miltenyi Biotec) following manufacturer's instructions. The CD4⁻ fraction from uninfected animals was irradiated (3000 rad) and used as feeder cells. The CD4⁺ fraction was stained with anti-CD4 and anti-CD25 mAbs. Treg and target cells were sorted using the CD4⁺Foxp3⁺ and CD4⁺Foxp3⁻CD25⁻ gates, respectively, and used immediately in suppression assays. Purity of each population was always $\geq 90\%$. For Treg-cell elimination, splenocytes from Foxp3^{EGFP} mice were obtained and the EGFP⁻ population was sorted in a FACSAria and used immediately for proliferation assays. Purity of the EGFP⁻ population was always $> 99\%$.

Proliferation assay

CFSE staining was carried out as previously described with some modifications [62]. Briefly, 2.5×10^7 cells/mL were stained with $2.5\ \mu\text{M}$ CFSE (Molecular Probes) in DPBS (5 min, room temperature, in the dark) with occasional stirring. Staining was stopped with five volumes of DPBS containing 10% FCS; cells were centrifuged (5 min, $490 \times g$), resuspended in complete RPMI medium and immediately used. CFSE-stained splenocytes (5×10^5 cells/mL) in 2 mL of complete medium were stimulated with $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Con A (Sigma) or $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ LPS (Sigma) in each well of a 24-well plate (Costar). In some experiments, murine rIL-2 (20 U/mL, Roche) was added at the beginning of the culture. For IL-10 neutralization experiments, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-IL-10 (JES5-2A5, Biolegend) or control isotype mAbs (RTK2071, Biolegend) were added at the beginning of the culture and incubated for 30 min before stimulation. Seventy two hours later, cells were washed twice with buffer (1% FCS in DPBS) and stained with anti-CD4, anti-CD8 or anti-CD19 mAbs and 7-AAD.

Suppression assay

Fifty thousand target cells (CD4⁺Foxp3⁻CD25⁻) were seeded with 2.5×10^4 Treg cells (CD4⁺Foxp3⁺) and 2×10^5 feeder cells. Cells were stimulated with $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Con A in a final volume of 200 μL in triplicate wells of a 96-well flat bottom plate (Costar). Cells were pulsed with 0.5 μCi of [³H]-Thymidine (45 Ci/mmol, Amersham) for the last 18 h and were harvested onto glass-fiber filters using an automatic cell harvester. Radioactivity uptake was measured by scintillation spectroscopy on a LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckman) using Meltilex A solid scintillant (Wallac).

Determination of cytokines and NO_2^-

IL-2 and IL-10 quantification was carried out by ELISA following manufacturer's instructions (Biolegend); detection limits were 3.9 ng/mL for IL-2 and 31.25 ng/mL for IL-10. NO_2^- determination

was carried out by the Griess assay as described [40] with some modifications. Briefly, 100 μ L of each sample was added to each well of a 96-well plate in duplicate, 50 μ L of 1% sulfanilamide (Sigma) in 2.5% H_3PO_4 was added and incubated for 5 min, 50 μ L of 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride (Sigma) was added and incubated for 10 min (room temperature, in the dark); absorbance was read at 540 nm. Standard curves were prepared with sodium nitrite and the detection limit was 1.56 μ M.

Statistical analysis

Statistical differences between groups were determined by the unpaired two-tailed Student *t*-test or One-Way ANOVA with Dunnett's or Bonferroni's Multiple Comparison tests using the PRISM software (GraphPad).

Acknowledgements: This work was supported by grants IN-200608 and IN-209111 from PAPIIT (DGAPA, UNAM, Mexico) and by grants 79775, 102399 and 102984 from CONACYT (Mexico). The authors are grateful to M. V. Z. Georgina Díaz and M. V. Z. Jorge Omar García for their expert advice and help in the care of the animals and Katharine A. Muirhead for helpful advices on cell tracking dyes. E. P. T. is recipient of a PhD fellowship from CONACYT (Registro 199991). This work was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD Program of Doctorado en Ciencias Biomédicas of E. P. T. at the Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflict of interest: The authors have declared no financial or commercial conflict of interest.

References

- Montoya, J. G. and Liesenfeld, O., Toxoplasmosis. *Lancet* 2004. **363**: 1965–1976.
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G. and Sher, A., Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1994. **153**: 2533–2543.
- Liu, C. H., Fan, Y.T., Dias, A., Esper, L., Corn, R. A., Bafica, A., Machado, F. S. and Aliberti, J., Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 2006. **177**: 31–35.
- Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D. and Remington, J. S., Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988. **240**: 516–518.
- Denkers, E. Y. and Gazzinelli, R. T., Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998. **11**: 569–588.
- Gazzinelli, R. T., Amichay, D., Sharton-Kersten, T., Grunwald, E., Farber, J. M. and Sher, A., Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996. **219**: 127–139.
- Lykens, J. E., Terrell, C. E., Zoller, E. E., Divanovic, S., Trompette, A., Karp, C. L., Aliberti, J. et al., Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. *J. Immunol.* 2010. **184**: 877–885.
- Suzuki, Y. and Remington, J. S., Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by $Lyt-2^+$ and $Lyt-1^+$, $L3T4^+$ T cells in mice. *J. Immunol.* 1988. **140**: 3943–3946.
- Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M. and Sher, A., Synergistic role of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 1991. **146**: 286–292.
- Suzuki, Y., Sher, A., Yap, G., Park, D., Neyer, L. E., Liesenfeld, O., Fort, M. et al., IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 2000. **164**: 5375–5382.
- Aliberti, J., Serhan, C. and Sher, A., Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Exp. Med.* 2002. **196**: 1253–1262.
- Hunter, C. A., Villarino, A., Artis, D. and Scott, P., The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol. Rev.* 2004. **202**: 106–114.
- Luft, B. J., Kansas, G., Engleman, E. G. and Remington, J. S., Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 1984. **150**: 761–767.
- Strickland, G. T., Ahmed, A. and Sell, K. W., Blastogenic response of *Toxoplasma*-infected mouse spleen cells to T- and B-cell mitogens. *Clin. Exp. Immunol.* 1975. **22**: 167–176.
- McLeod, R., Eisenhauer, P., Mack, D., Brown, C., Filice, G. and Spitalny, G., Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1989. **142**: 3247–3255.
- Candolfi, E., Hunter, C. A. and Remington, J. S., Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* 1994. **62**: 1995–2001.
- Candolfi, E., Hunter, C. A. and Remington, J. S., Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 1995. **63**: 751–756.
- Channon, J. Y. and Kasper, L. H., *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma interferon. *Infect. Immun.* 1996. **64**: 1181–1189.
- Khan, I. A., Matsuura, T., Fonseca, S. and Kasper, L. H., Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in $IRF-1^{-/-}$ mice. *J. Immunol.* 1996. **156**: 636–643.
- Haque, S., Khan, I., Haque, A. and Kasper, L., Impairment of the cellular immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin 2 production and macrophage-mediated inhibitory effects. *Infect. Immun.* 1994. **62**: 2908–2916.
- Khan, I. A., Matsuura, T. and Kasper, L. H., IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol.* 1995. **17**: 185–195.
- Neyer, L. E., Grunig, G., Fort, M., Remington, J. S., Rennick, D. and Hunter, C. A., Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and

- T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 1997. 65: 1675–1682.
- 23 Nie, C. Q., Bernard, N. J., Schofield, L. and Hansen, D. S., CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T-cell function and inhibit the development of Plasmodium berghei-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. *Infect. Immun.* 2007. 75: 2275–2282.
- 24 Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995. 155: 1151–1164.
- 25 Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W. and Sakaguchi, S., Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 2000. 192: 303–310.
- 26 Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y., Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003. 4: 330–336.
- 27 Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S. A. and Ramsdell, F., An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 2003. 4: 337–342.
- 28 Sakaguchi, S., Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 2005. 6: 345–352.
- 29 Belkaid, Y. and Tarbell, K., Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27: 551–589.
- 30 Tenorio, E. P., Olguin, J. E., Fernandez, J., Vieyra, P. and Saavedra, R., Reduction of Foxp3⁺ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. DOI: 10.1155/2010/786078.
- 31 Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E. A., Hall, J. A., Chou, D., Dos, S. L., O'Brien, S. et al., Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 2009. 31: 772–786.
- 32 Ge, Y. Y., Zhang, L., Zhang, G., Wu, J. P., Tan, M. J., Hu, E., Liang, Y. J. and Wang, Y., In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4⁺CD25⁺-regulatory T cells. *Parasite Immunol.* 2008. 30: 471–481.
- 33 Khan, I. A., Matsuura, T. and Kasper, L. H., Activation-mediated CD4⁺ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int. Immunol.* 1996. 8: 887–896.
- 34 Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. and Hafler, D. A., FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010. 10: 490–500.
- 35 Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G. and Sakaguchi, S., Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol.* 2000. 12: 1145–1155.
- 36 Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. and Sakaguchi, S., Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 2002. 3: 135–142.
- 37 Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R. and Salomon, B. L., Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J. Exp. Med.* 2003. 198: 737–746.
- 38 Tenorio, E. P., Fernandez, J., Olguin, J. E. and Saavedra, R., Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly Tregs in BALB/c mice but activated cells in C57BL/6j mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011. 62: 362–367.
- 39 Lyons, A. B., Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods* 2000. 243: 147–154.
- 40 Neyer, L. E., Kang, H., Remington, J. S. and Suzuki, Y., Mesenteric lymph node T cells but not splenic T cells maintain their proliferative response to concanavalin-A following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 1998. 20: 573–581.
- 41 Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y. and Shevach, E. M., Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2010. 184: 3433–3441.
- 42 Elkord, E., Sharma, S., Burt, D. J. and Hawkins, R. E., Expanded subpopulation of FoxP3(+) T regulatory cells in renal cell carcinoma co-express Helios, indicating they could be derived from natural but not induced Tregs. *Clin. Immunol.* 2011. 140: 218–222.
- 43 McClymont, S. A., Putnam, A. L., Lee, M. R., Esensten, J. H., Liu, W., Hulme, M. A., Hoffmuller, U. et al., Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J. Immunol.* 2011. 186: 3918–3926.
- 44 Fujimoto, M., Nakano, M., Terabe, F., Kawahata, H., Ohkawara, T., Han, Y., Ripley, B. et al., The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2011. 186: 32–40.
- 45 Verhagen, J. and Wraith, D. C., Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells". *J. Immunol.* 2010. 185: 7129.
- 46 Vigario, A. M., Gorgette, O., Dujardin, H. C., Cruz, T., Cazenave, P. A., Six, A., Bandeira, A. and Pied, S., Regulatory CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* 2007. 37: 963–973.
- 47 McSorley, H. J., Harcus, Y. M., Murray, J., Taylor, M. D. and Maizels, R. M., Expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*. *J. Immunol.* 2008. 181: 6456–6466.
- 48 Rausch, S., Huehn, J., Kirchhoff, D., Rzepecka, J., Schnoeller, C., Pillai, S., Lodenkemper, C. et al., Functional analysis of effector and regulatory T cells in a parasitic nematode infection. *Infect. Immun.* 2008. 76: 1908–1919.
- 49 Taylor, M. D., van der, W. N., Harris, A., Graham, A. L., Bain, O., Allen, J. E. and Maizels, R. M., Early recruitment of natural CD4⁺ Foxp3⁺ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection. *Eur. J. Immunol.* 2009. 39: 192–206.
- 50 Finney, C. A., Taylor, M. D., Wilson, M. S. and Maizels, R. M., Expansion and activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in Heligmosomoides polygyrus infection. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: 1874–1886.
- 51 Jankovic, D., Kullberg, M. C., Feng, C. G., Goldszmid, R. S., Collazo, C. M., Wilson, M., Wynn, T. A. et al., Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.* 2007. 204: 273–283.
- 52 de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. and Scheffold, A., Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 2004. 34: 2480–2488.
- 53 Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. and Lenardo, M. J., CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 2007. 8: 1353–1362.

- 54 Scheffold, A., Huhn, J. and Hofer, T., Regulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur. J. Immunol.* 2005. **35**: 1336–1341.
- 55 Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. and Hafler, D. A., FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010. **10**: 490–500.
- 56 Busse, D., de la Rosa, M., Hobiger, K., Thurley, K., Flossdorf, M., Scheffold, A. and Hofer, T., Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010. **107**: 3058–3063.
- 57 Sharma, S. D., Hofflin, J. M. and Remington, J. S., In vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1985. **135**: 4160–4163.
- 58 Wojno, E. D., Hosken, N., Stumhofer, J. S., O'Hara, A. C., Mauldin, E., Fang, Q., Turka, L. A. et al., A role for IL-27 in limiting T regulatory cell populations. *J. Immunol.* 2011. **187**: 266–273.
- 59 Villarino, A. V., Stumhofer, J. S., Saris, C. J., Kastelein, R. A., de Sauvage, F. J. and Hunter, C. A., IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J. Immunol.* 2006. **176**: 237–247.
- 60 Malek, T. R., The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 2008. **26**: 453–479.
- 61 Piña-Vazquez, C., Saavedra, R. and Herion, P., A quantitative competitive PCR method to determine the parasite load in the brain of *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Parasitol. Int.* 2008. **57**: 347–353.
- 62 Tenorio, E. P. and Saavedra, R., Differential effect of sodium arsenite during the activation of human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* 2005. **5**: 1853–1869.
- 63 Montes, M., Jaensson, E. A., Orozco, A. F., Lewis, D. E. and Corry, D. B., A general method for bead-enhanced quantitation by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 2006. **317**: 45–55.
- 64 Foster, B., Prussin, C., Liu, F., Whitmire, J. K. and Whitton, J. L., Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* 2007. **6.24.1–6.24.21**.

Abbreviations: dpi: days post infection · RNI: reactive nitrogen intermediate · Tconv cell: conventional T cell

Full correspondence: Dr. Rafael Saavedra, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70228, Ciudad Universitaria, CP 04510, Mexico DF, Mexico
 Fax: +52-5555503893
 e-mail: saavedra@servidor.unam.mx

Received: 14/2/2011

Revised: 4/8/2011

Accepted: 6/9/2011

Accepted article online: 9/9/2011

2.1. Información suplementaria

2.1.1. Los linfocitos CD4⁺Foxp3⁻ y CD8⁺ se activan durante la infección aguda con *T. gondii*

Durante el análisis de la expresión de moléculas de activación en células T_{reg} analizamos a la par el patrón de expresión de moléculas de activación de linfocitos CD4⁺ Foxp3⁻ y CD8⁺. Encontramos que a los 7 dpi se incrementó el porcentaje de linfocitos CD4⁺Foxp3⁻ que expresaban CD69, CD25 y que perdieron la expresión de CD62L; también incrementó la expresión de dichas moléculas (Fig. 15A). En los linfocitos CD8⁺ encontramos un incremento en la expresión y en el porcentaje de células CD69⁺ y CD25⁺, pero no de las células CD62L⁻ (Fig. 15B). Estos datos demuestran que tanto linfocitos CD4⁺ como CD8⁺ efectores se encuentran activados durante la infección con *T. gondii*, la diferencia observada entre estas dos poblaciones, probablemente se relaciona con que durante esta infección los linfocitos CD4⁺ se activan primero que los CD8⁺ [64].

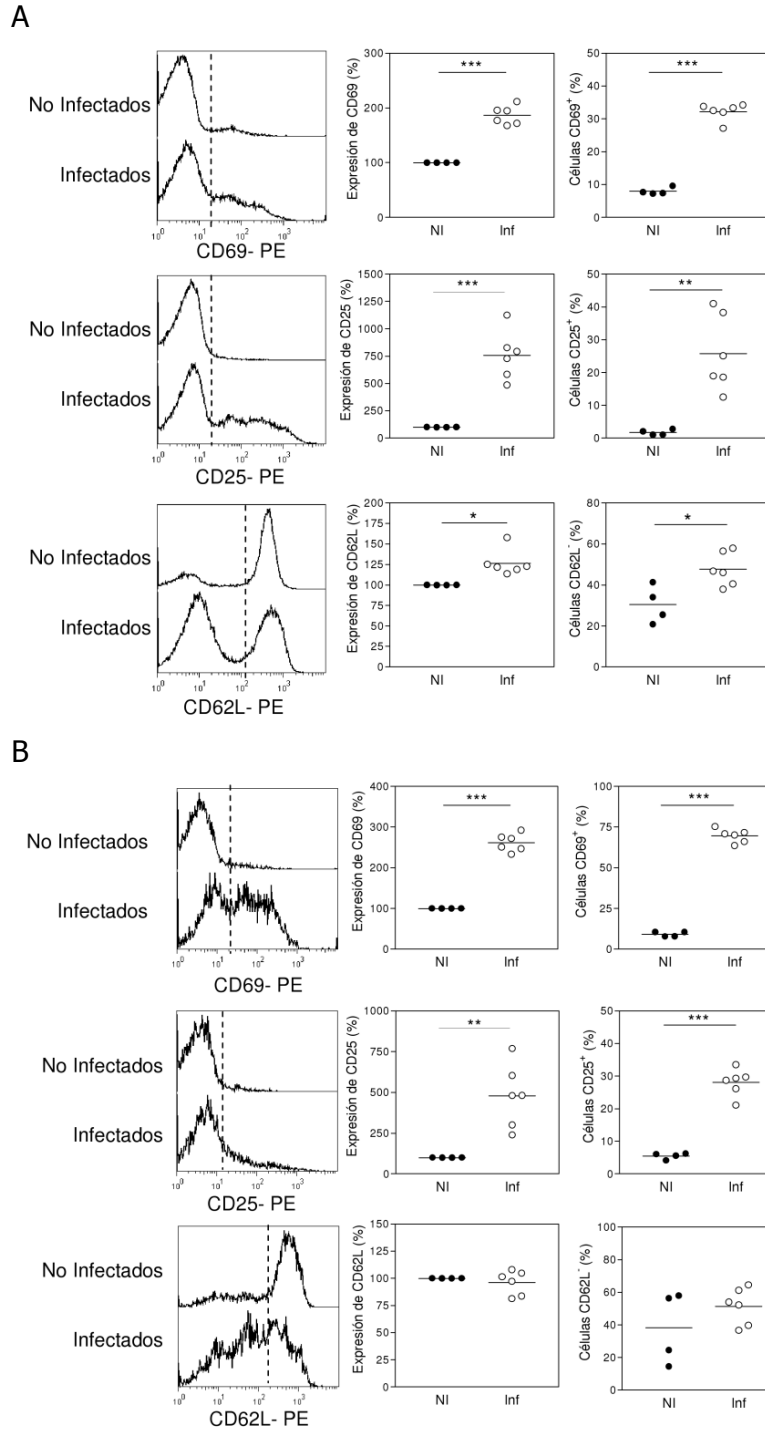


Figura 15 Expresión de moléculas de activación en linfocitos T $CD4^+Foxp3^-$ y $CD8^+$ durante la infección con *T. gondii*. Esplenocitos de ratones C57BL/6 infectados y no infectados fueron obtenidos al día 7 p.i. y se tiñeron con anti-CD69, anti-CD25 o anti-CD62L y se analizaron por citometría de flujo. La región de linfocitos se definió por características de FSC y SSC y se analizaron las moléculas indicadas en la subregión (A) $CD4^+Foxp3^-$ o (B) $CD8^+$. Se muestran histogramas representativos del análisis de cada marcador. La intensidad media de fluorescencia se normalizó y se graficó como porcentaje de expresión; se muestra también el porcentaje de células positivas para cada molécula. Los datos se analizaron utilizando la prueba *t* de Student (*: $p < 0.05$, **: $p > 0.01$, *** $p > 0.001$). NI: No infectado, Inf: Infectado

2.1.2. La inmunosupresión se revierte con bajas dosis de IL-2

Como parte de los experimentos para evaluar el papel de la IL-2 como molécula involucrada en la supresión evaluamos la proliferación de linfocitos T de animales infectados en presencia de diferentes concentraciones de dicha citocina. Nuestros datos muestran que con una concentración de 1 U/ml hubo una recuperación parcial de la proliferación tanto en linfocitos totales como en las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺. La recuperación total de la proliferación de las poblaciones mencionadas se observó desde la adición de 10 U/ml.

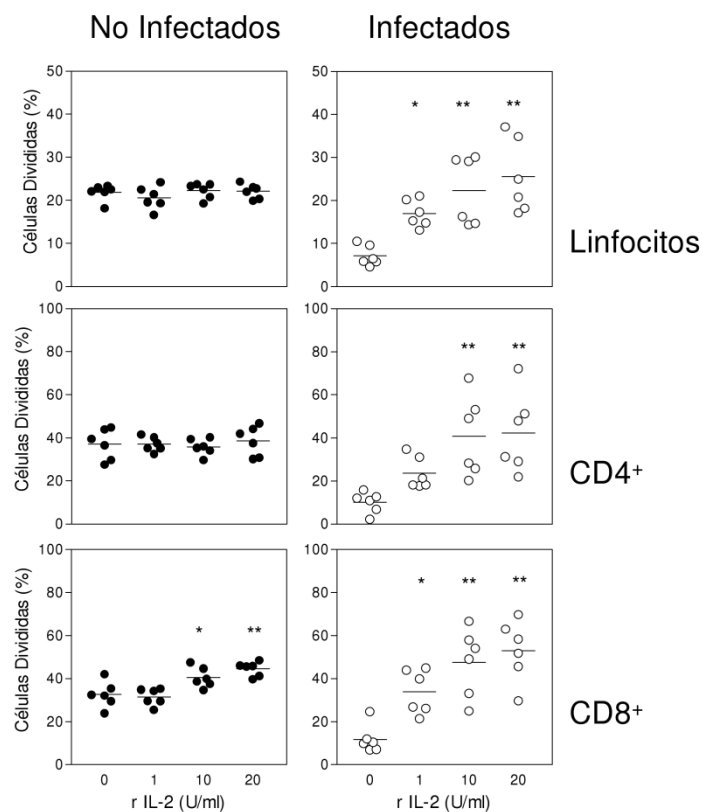


Figura 16. Proliferación de esplenocitos de ratones infectados con *T. gondii* en presencia de rIL-2. Esplenocitos de ratones C57BL/6J infectados y no infectados fueron teñidos con CFSE y estimulados durante 72h con ConA; la cantidad indicada de rIL-2 se agregó al inicio del cultivo. Se recuperaron las células, se tiñeron con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y 7-AAD, se capturaron en el FACS y se analizaron como se indica en la Fig. 12. Para cada población se calculó el porcentaje de células divididas de acuerdo a Lyons [236], cada círculo representa un ratón. Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA con post análisis de Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

2.1.3. La adición exógena de rIL-2 incrementa la viabilidad de esplenocitos activados *in vitro*

Se ha demostrado que cuando las células T_{reg} privan a las células T_{conv} de IL-2, estas últimas mueren por apoptosis [153], consecuentemente, una cantidad suficiente de IL-2 en el medio debería de evitar la muerte celular. Por lo tanto evaluamos si la adición exógena de IL-2 modificaba la viabilidad celular y encontramos que tanto en los animales infectados como no infectados hubo un incremento significativo en la viabilidad de linfocitos totales, $CD4^+$ y $CD8^+$ a partir de la adición en cultivo de 10U/ml de IL-2. Estos datos apoyan la hipótesis de que las células T_{reg} utilizan la privación de IL-2 como mecanismo para modular la inmunosupresión.

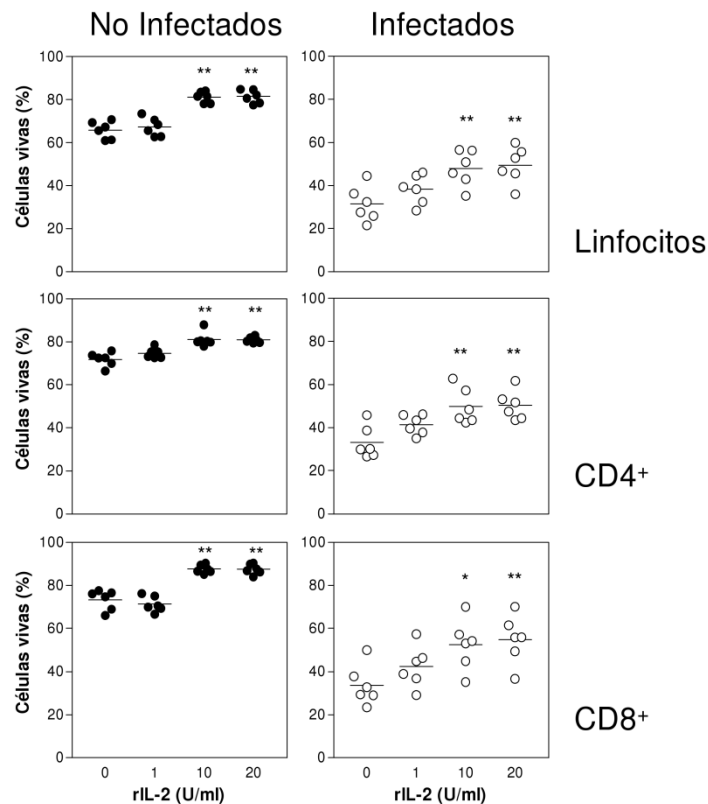


Figura 17 Viabilidad de esplenocitos de ratones infectados con *T. gondii* in presencia de rIL-2. Esplenocitos de ratones C57BL/6J infectados y no infectados fueron teñidos con CFSE y estimulados durante 72h con ConA; la cantidad indicada de rIL-2 se agregó al inicio del cultivo. Se recuperaron las células, se teñieron con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y 7-AAD y se analizaron inmediatamente en el FACS. El porcentaje de células vivas indica el porcentaje de células 7-AAD⁻ de cada población; cada círculo representa un ratón. Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA con post análisis de Dunnett (*p<0.05, **p<0.01).

3 El mAb anti-CD25 como herramienta para el estudio de las células T_{reg} durante la infección con *T. gondii*

3.1. Estandarización de la depleción

Las células T_{reg} expresan de manera constitutiva la molécula CD25, por lo que el uso de anticuerpos monoclonales contra esta molécula es una herramienta que se ha utilizado de manera recurrente para el estudio de las células T_{reg} en diferentes modelos infecciosos [175, 177, 184, 237]. Como se describió anteriormente, nuestro objetivo era utilizar la depleción con anti-CD25 para evaluar el papel de las células T_{reg} durante la inmunosupresión. Para ello, estandarizamos la depleción, determinando la concentración adecuada de mAb necesaria para eliminar las células CD4⁺CD25⁺. Inyectamos ratones con 100 o 200 µg de mAb por vía intraperitoneal (i.p.) y evaluamos por citometría de flujo la eficiencia y la duración de la depleción de células CD4⁺CD25⁺ a diferentes días post depleción. En la Figura 18 se muestra que los esplenocitos de ratón tienen un porcentaje basal de 14% de células CD4⁺CD25⁺ y al inyectar 100µg de mAb este porcentaje se redujo 3.9 veces 3 días después del tratamiento y 7 veces al día 7 posterior a la inyección del mAb; al día 10 observamos una recuperación del 50% y al día 14 las células llegaron casi al porcentaje basal. Al inyectar con 200 µg observamos que el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ se redujo entre 71 y 85% durante los primeros 10 días después del tratamiento mientras que para el día 14 se observó una recuperación casi total de la población. Estos datos muestran que si bien las células CD4⁺CD25⁺ pueden eliminarse usando 100 µg de mAb, la depleción se prolonga cuando se usan 200 µg de mAb, por lo que usamos esta concentración para realizar los experimentos.

Días post inyección del Ac PC61

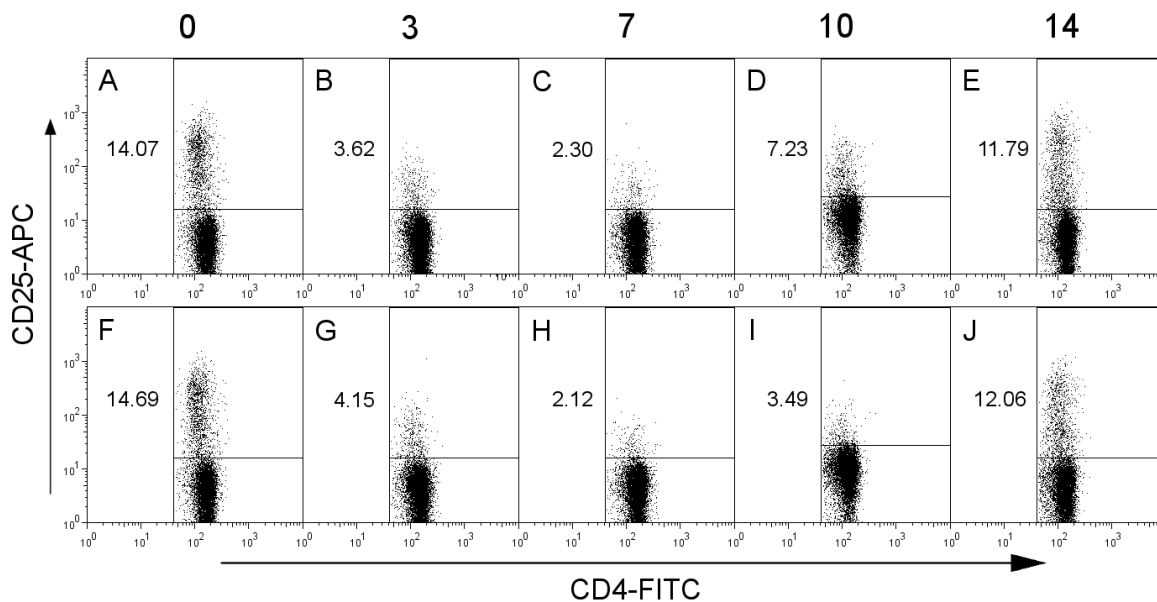


Figura 18. Análisis de la población CD4⁺CD25⁺ en animales depletados con el mAb PC61. Ratones de la cepa BALB/c fueron inyectados i.p. con 100 o 200 µg del mAb PC61. Los esplenocitos se obtuvieron a los días indicados, se tiñeron con anti-CD4 y anti-CD25 y se analizaron inmediatamente en el FACS. La región de los linfocitos se definió por características de FSC y SSC y posteriormente se analizó la expresión de CD25 en la población CD4⁺.

3.2. Efecto de la depleción con mAb anti-CD25 en la inmunosupresión

Con el objetivo de evaluar el papel de las células T_{reg} durante la inmunosupresión inyectamos ratones C57BL/6J con 200 µg del mAb anti-CD25, dos días después los animales fueron infectados y al día 7 post infección recuperamos los esplenocitos, los estimulamos y evaluamos la proliferación celular. Como podemos ver en la figura 19 el tratamiento con el mAb anti-CD25 incrementó ligeramente la proliferación de linfocitos totales, CD4⁺ y CD8⁺ de ratones no infectados. En el caso de los ratones infectados observamos que el tratamiento con el mAb PC61 pero no con un mAb control llevó a la recuperación de la capacidad proliferativa de linfocitos totales y del subtipo CD4⁺; en el caso de los linfocitos CD8⁺ que no están suprimidos, el tratamiento también indujo un incremento en la capacidad proliferativa. Estos datos demuestran que las células CD4⁺CD25⁺ participan en la inmunosupresión observada durante la infección con *T. gondii* y sugieren una posible participación de las células T_{reg}.

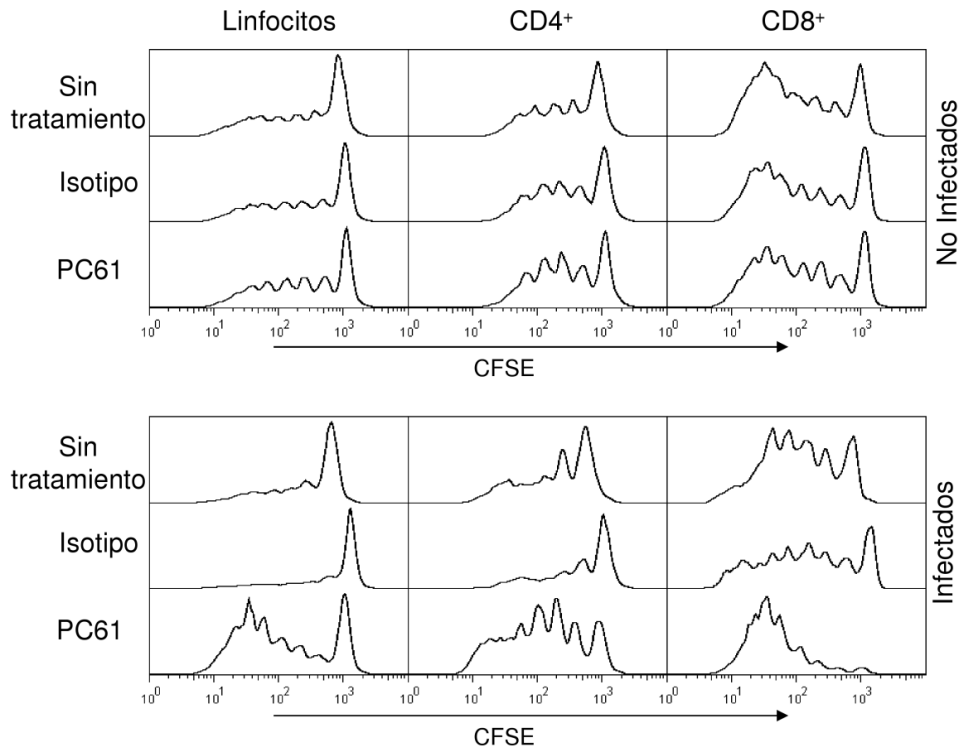


Figura 19 Proliferación de linfocitos T, CD4⁺ y CD8⁺ de ratones depletados con el mAb PC61 e infectados con *T. gondii*. Ratones C57BL/6J fueron inyectados i.p. con 200 μ g de mAb PC61 o de mAb control de isotipo e infectados dos días después. Siete días después de la infección se obtuvieron los esplenocitos y fueron teñidos con CFSE y estimulados con ConA. Después de 72 h se recuperaron las células, se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8 y 7AAD, se capturaron en el FACS y se analizaron como se indica en la Fig. 12.

Además de evaluar la capacidad proliferativa de los esplenocitos después del tratamiento con el mAb PC61 estudiamos la expresión de Foxp3 y CD25 en linfocitos CD4⁺ para verificar si en este punto de la infección habíamos eliminado principalmente células T_{reg}. En la figura 20 observamos que 9 días después de la depleción los ratones no infectados tienen solamente 2.9% de células T_{reg} CD25⁺ y que la mayor parte de las células T_{reg} restantes no expresan CD25. En estos animales, también se eliminó casi el 50% de las células T_{conv} son CD25⁻. En el caso de los animales infectados encontramos que hay una gran cantidad de células T_{conv} que expresan CD25 (>30%) y que el porcentaje de células T_{reg} CD25⁺ se mantuvo, mientras que en los animales tratados con el mAb hubo una drástica reducción de células T_{conv} CD25⁺ y una reducción modesta de células T_{reg}. Estos datos demuestran que en los animales infectados el tratamiento con el mAb PC61

elimina principalmente células T_{conv} activadas y por lo tanto es imposible determinar si la reversión en la supresión descrita anteriormente es realmente inducida por células T_{reg} .

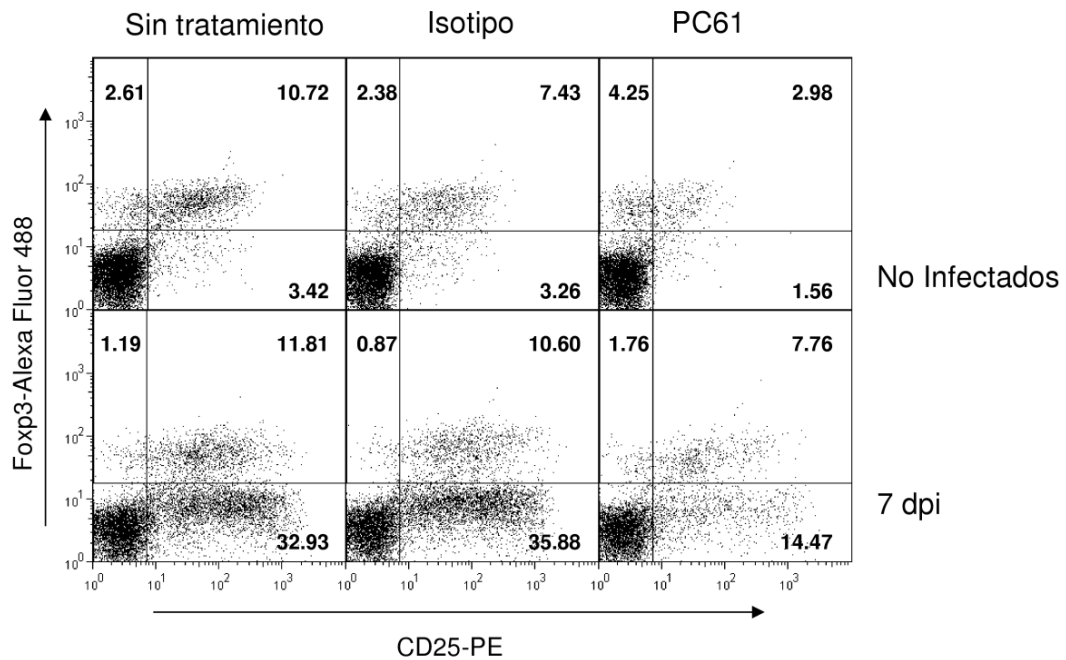


Figura 20 Efecto de la depleción con mAb PC61 en células T_{reg} y T_{conv} durante la infección con *T. gondii*. Ratones C57BL/6J fueron inyectados i.p. con 200 μ g de mAb PC61 o de mAb control de isotipo e infectados dos días después. Siete días después de la infección se obtuvieron los esplenocitos y fueron teñidos con anticuerpos anti-CD4, anti-Foxp3 y anti-CD25 y se capturaron en el FACS. La región de linfocitos se definió por características de FSC y SSC y se analizó la coexpresión de Foxp3 y CD25 en la subpoblación $CD4^+$.

3.3. Las células T_{reg} son importantes para la resistencia a la infección con *T. gondii*

Resumen de los hallazgos publicados en el artículo: **Reduction of Foxp3⁺ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*.** Tenorio, E. P., Olguin, J. E., Fernandez, J., Vieyra, P., and Saavedra, R. J. *Biomed. Biotechnol.* 2010. DOI: 10.1155/2010/786078.

Paralelamente al análisis de la depleción con anti-CD25 en el modelo de infección con *T. gondii* en la cepa C57BL/6J evaluamos el efecto de la depleción antes de la infección en la cepa BALB/c, ya que nos interesaba conocer el papel de las células T_{reg} en la resistencia a la infección con este parásito.

Se ha reportado que la resistencia del modelo BALB/c depende en parte del tamaño del inóculo con que se infecta a los animales [103, 105]. Con el objetivo de determinar cuál era el número de quistes apropiado para establecer un modelo de resistencia evaluamos la mortalidad y el efecto de la depleción en animales que fueron infectados con diferentes cargas parasitarias. La figura 21 muestra que la sobrevivencia se redujo de manera dosis dependiente, ya que en los animales infectados con 20 quistes hubo una sobrevivencia del 80%; en los infectados con 50 quistes sobrevivió el 40% y en el grupo de los infectados con 100 quistes murieron todos los animales. En el caso de los animales infectados con 20 y 50 quistes observamos también que el tratamiento con el mAb anti-CD25 redujo la sobrevivencia a la infección; debido a estos datos, el resto de los experimentos se hicieron infectando a los animales con 20 quistes. Estos resultados demuestran que la depleción con anti-CD25 elimina la resistencia de los ratones BALB/c, lo que sugiere fuertemente que las células T_{reg} participan en la protección durante la infección con *T. gondii*.

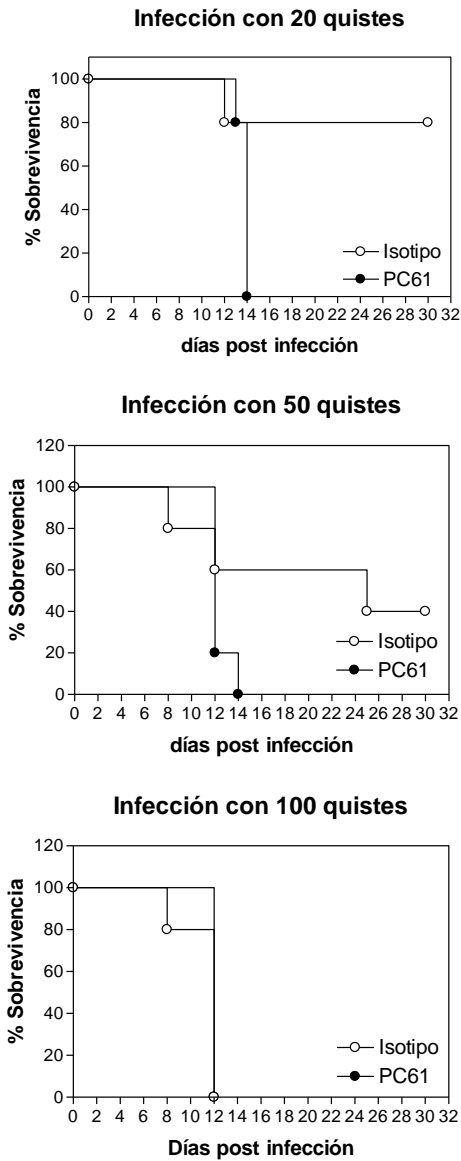


Figura 21 Efecto de la depleción en la infección con *T. gondii* usando diferentes cargas parasitarias. Ratones de la cepa BALB/c fueron inyectados i.p. con 200 µg de mAb de la clona PC61 o con al mAb control de isotipo. Dos días después se infectaron con 20, 50 o 100 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii*. La mortalidad de los animales se registró durante 30 días.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la depleción en células T_{reg} y T_{conv} activadas en ratones infectados se tomaron muestras de sangre periférica de estos animales a diferentes tiempos. En la Figura 22 se puede observar que en los animales tratados con el mAb control de isotipo e infectados con el parásito hubo una ligera reducción en las células T_{reg} a los días 8 y 12 post infección, mientras que en los animales depletados/infectados el tratamiento con el anticuerpo llevó eliminó las células $T_{reg} CD25^+$. Estas células se

recuperaron ligeramente durante la infección pero nunca alcanzaron los niveles observados en los animales no infectados. Por otro lado encontramos un porcentaje de células $T_{reg} CD25^-$ que se mantuvo después de la depleción pero que se redujo conforme avanzaba la infección, lo cual demuestra que durante la infección con *T. gondii* las células T_{reg} están siendo eliminadas eficientemente por el mAb anti-CD25.

En el caso de las células $T_{conv} CD25^+$ observamos que en los animales No depletados/infectados el porcentaje de esta población se duplicó al día 12 post infección (2.3% vs 1.1%). En los animales depletados/infectados el porcentaje de $T_{conv} CD25^+$ se redujo con la inyección del mAb y se mantuvo bajo hasta el día 8 post infección (<0.3%), sin embargo, esta población se incrementó claramente al día 12 dpi, y el porcentaje fue aún mayor que el observado en los animales no depletados (6.7% vs 2.3%). Estos datos demuestran que durante la infección con *T. gondii* el tratamiento con el mAb PC61 elimina eficientemente a las T_{regs} pero permite la activación de células T_{conv} (Fig. 22). Estos resultados fueron confirmados en esplenocitos de ratón a los 10 dpi. Nuestros resultados indican que en ratones BALB/c el tratamiento con el mAb anti-CD25 elimina preferencialmente T_{regs} , generando un desbalance entre las poblaciones de células T_{regs} y T_{conv} activadas. Este desbalance elimina la resistencia de los animales a la infección y nos sugieren fuertemente que las células T_{reg} son esenciales para la protección durante la fase aguda de la infección con *T. gondii*.

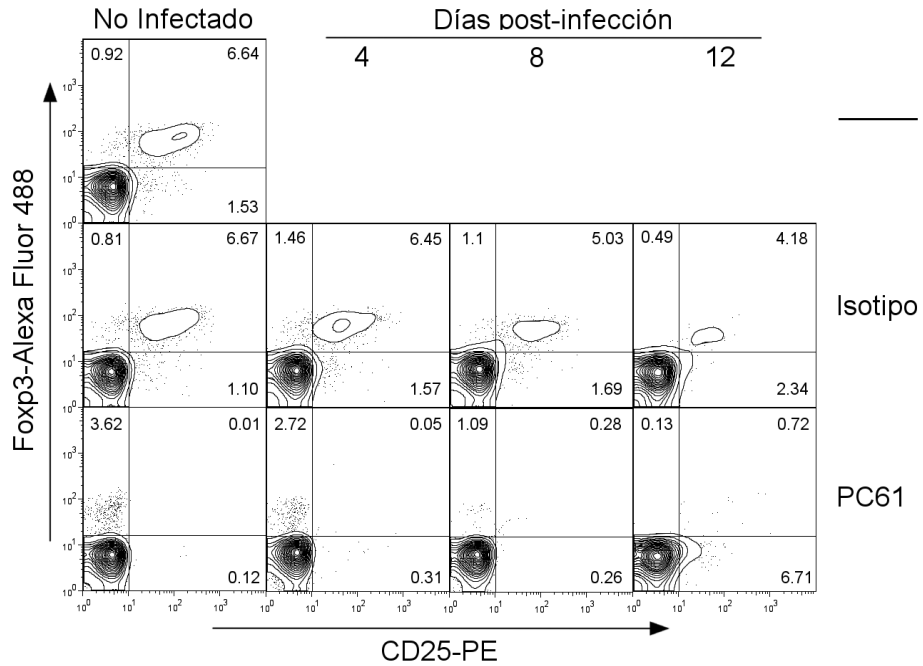


Figura 22. Efecto de la depleción y la infección en linfocitos sangre periférica. Ratones de la cepa BALB/c fueron inyectados i.p. con 200 µg del mAb PC61 o con el mAb control de isotipo. Dos días después se infectaron con 20 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii*. A los días indicados se tomaron muestras de sangre, las células se tiñeron con anti-CD4, anti-Fxp3 y anti-CD25 y se analizaron inmediatamente en el FACS. La región de los linfocitos se definió por características de FSC y SSC y posteriormente se analizó la expresión de Fxp3 y CD25 en la población CD4⁺.

Research Article

Reduction of Foxp3⁺ Cells by Depletion with the PC61 mAb Induces Mortality in Resistant BALB/c Mice Infected with *Toxoplasma gondii*

Eda Patricia Tenorio, Jonadab Efraín Olguín, Jacqueline Fernández, Pablo Vieyra, and Rafael Saavedra

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, C.U., CP 04510, Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to Rafael Saavedra, saavedra@servidor.unam.mx

Received 30 June 2009; Revised 9 September 2009; Accepted 14 September 2009

Academic Editor: Luis I. Terrazas

Copyright © 2010 Eda Patricia Tenorio et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Regulatory T cells (Tregs) are CD4⁺Foxp3⁺ cells that modulate autoimmune responses. Tregs have been shown to be also involved during the immune response against infectious agents. The aim of this work is to study the role of Tregs during the infection with the intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. Resistant BALB/c mice were injected with 200 µg of anti-CD25 mAb (clone PC61) and 2 days later they were infected with 20 cysts of the ME49 strain of *T. gondii*. We observed that depleted mice showed 50–60% mortality during the acute infection. When FACS analysis was carried out, we observed that although injection of PC61 mAb eliminated 50% of Tregs, infected-depleted mice showed a similar percentage of CD25⁺Foxp3⁻ (activated T cells, Tact) to those observed in infected nondepleted animals, demonstrating that in our depletion/infection system, injection of PC61 mAb did not hamper T cell activation while percentage of Tregs was reduced by 75% 10 days post infection. We concluded that Tregs are essential during protection in the acute phase of *T. gondii* infection.

1. Introduction

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is an intracellular parasite and the etiological agent of toxoplasmosis. Although the infection is asymptomatic in most immunocompetent individuals, toxoplasmosis may cause severe complications in immunocompromised individuals [1, 2]. If *T. gondii* infection occurs during pregnancy, transplacental transmission can occur, leading to abortion or congenital malformations [2–5].

The immune response against *T. gondii* has been largely characterized and it has been demonstrated that cell mediated immunity is essential to control infection [2, 6, 7], involving synergy between CD4⁺ and CD8⁺ T cells [8, 9]. *T. gondii* triggers the production of IL-12, mainly by dendritic cells [10–12], which stimulate NK cells and T lymphocytes to secrete large amounts of IFN-γ, a key cytokine for protection against this parasite [10, 13, 14]. Thus, protection against *T.*

gondii is dependent on a TH1 response [15]. However IL-10 is also required for prevention of development of IFN-γ mediated pathology [16].

Regulatory T cells (Tregs) are a subset of CD4⁺ T cells that control the immune response by suppressing many lymphocyte effector functions [17–19]. Natural Tregs constitutively express CD25 (the α chain of the IL-2 receptor) [20], CTLA-4 [21], and the forkhead family transcription factor Foxp3 [22, 23], which is required for their development and function [22]. Although initially described for preventing autoimmune responses [20, 24, 25], it has also been demonstrated that they can regulate the immune response against infectious agents [26–29]. For example, in vivo depletion of CD25⁺ cells leads to an increase in the production of IFN-γ in animals infected with *Plasmodium chabaudi adami* [30] and *Trypanosoma congolense* [31], or in animals infected with *Schistosoma mansoni* to an increased production of IFN-γ, IL-4, IL-5, and IL-13 [32], indicating that Tregs can

control both TH1 and TH2 responses. During infection with *Plasmodium berghei* [33] or *Litomosoides sigmodontis* [34], depletion of Tregs leads to control or elimination of the parasites, respectively.

The aim of this paper is to study the role of Tregs during the acute infection of *T. gondii* in the resistant BALB/c strain of mice. We carried out depletion experiments by injection of the PC61 mAb in mice followed by infection with the type II strain ME49, and analyzed mortality. Since PC61 mAb injection could also eliminate other cell subtypes expressing CD25, mainly activated T cells (Tact), we also studied the CD4⁺ T cell subsets affected by injection of the PC61 mAb.

2. Materials and Methods

2.1. Mice. Six—eight-week-old female BALB/cAnN mice, weighing 18–20 g, and Swiss mice, were bred in our animal house and maintained in pathogen-free conditions. All protocols depicted in this paper were approved by the local Bioethics Committee for Animal Research.

2.2. Parasites. The ME49 strain of *T. gondii* was maintained in Swiss mice as previously described [35]. Briefly, brains from infected mice were removed and homogenized in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS); the number of cysts was enumerated and mice were infected intraperitoneally with 10 cysts; this procedure was carried out every 2–4 months. For peroral infection, mice anesthetized with Sevorane (ABBOTT, Mexico City, Mexico) were infected with 20 cysts by gavage in 0.1 mL DPBS.

2.3. Hybridomas and mAbs. The PC61 hybridoma secreting rat IgG1 against murine CD25 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The F41D1 hybridoma, secreting an unrelated rat IgG1 mAb (isotype control), was a kind gift of Dr. Olivier Denis (Institut Scientifique de Santé Publique, Brussels, Belgium). Hybridomas were grown on CD Hybridoma Medium (GIBCO, Grand Island, NY, USA) and mAbs were obtained after ammonium sulfate (45% w/v) precipitation. After extensive dialysis against PBS, antibody concentration was determined by spectrophotometry at 280 nm. Antibodies were resuspended in PBS at 1–2 mg/mL and stored at –20°C until used.

2.4. CD25⁺ T Cells Depletion In Vivo and Infection. Unless otherwise stated, mice were injected intraperitoneally (ip) with 200 µg of purified PC61 mAb or control isotype at day –2. Two days later (day 0), mice were infected perorally as described above. Depletion was confirmed by analyzing CD4⁺CD25⁺ or CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells, in peripheral blood samples when mice were infected. Weight and cumulative mortality were recorded daily; survival curves were compared by the logrank test using the Prism software (GraphPad, San Diego, CA).

2.5. Immunofluorescence. Spleen cells (1×10^6) were incubated (30 minutes, 4°C) with anti-CD4-FITC or -TC (clone RM4-5, Caltag, Burlingame, CA), anti-CD4-PerCP (Biolegend, San Diego CA), anti-CD25-PE or –APC (clone PC61

5.3, Caltag), or anti-CD25-PE (Clone 7D4, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) in 100 µL of washing buffer (DPBS + 1% FCS + 0.1% NaN₃). After washing 3 times, cells were suspended in DPBS and analyzed immediately. For Foxp3 detection, we used the Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA) with anti-Foxp3-Alexa Fluor 488 (clone FJK-16s, eBioscience) following the indications provided by the manufacturer.

2.6. Flow Cytometry. Flow cytometry analysis was performed on a FACScalibur or a FACScan cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA), running the Cell Quest program (Becton Dickinson). Lymphocytes were identified by forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) characteristics, gated and further analyzed. Detailed analysis of each experiment is indicated in each figure legend. Samples were analyzed using the FlowJo software V. 5.7.2 (Tree Star, Ashland OR).

3. Results and Discussion

We carried out depletion studies by injection of the PC61 mAb to analyze the role of Tregs in the resistant BALB/c strain of mice during the infection with the type II strain ME49 of *T. gondii*. In the literature we found many protocols for Tregs depletion using the PC61 mAb in different models, using a wide range of mAb concentrations, from 100 µg to 1 mg [32, 33, 36–41], or even several injections of the PC61 mAb before and during infection [30, 42]. To reduce the possibility of Tact elimination due to high antibody concentrations, we tested the lowest doses reported of PC61 mAb (100 µg and 200 µg) by ip injection. Two days later we analyzed CD4⁺CD25⁺ cells to determine if depletion was achieved, since mice would be infected at this time point. We used the PC61 mAb in the FACS analysis because McNeill et al. [37], using Foxp3-GFP transgenic mice, demonstrated that detection of CD25⁺ cells in PC61-depleted mice using either the 7D4 or the PC61 mAbs showed similar results [37]. As can be seen in Figure 1, injection of either 100 (Figure 1(b)) or 200 µg (Figure 1(c)) of the PC61 mAb leads to similar levels of depletion of CD4⁺CD25⁺ cells in the spleen. Even though depletion efficiency was the same by the day we intended to infect the animals, we were concerned about how long would the depletion lasted. During the first week after injection of the PC61 mAb (Figure 2), depletion efficiency was very similar using both doses, but at 10 days post-depletion, a higher number of CD4⁺CD25⁺ cells were observed in animals treated with 100 µg when compared to cells from animals treated with 200 µg. At 14 days post depletion, about 83% of cells were already detected in both groups of animals. These results show that injection with 200 µg leads to a depletion of CD25⁺ cells for at least 10 days. Recovery of CD4⁺CD25⁺ is slightly faster in animals treated with 100 µg mAb; at 14 days, CD4⁺CD25⁺ cells from both groups reached almost normal levels. We thus chose 200 µg of PC61 mAb for the subsequent experiments.

In order to study the role of Tregs during infection with *T. gondii*, resistant BALB/c mice were depleted of CD25⁺ cells, and 2 days later they were perorally infected with 20 cysts of the ME49 strain. Since CD25 is a molecule expressed

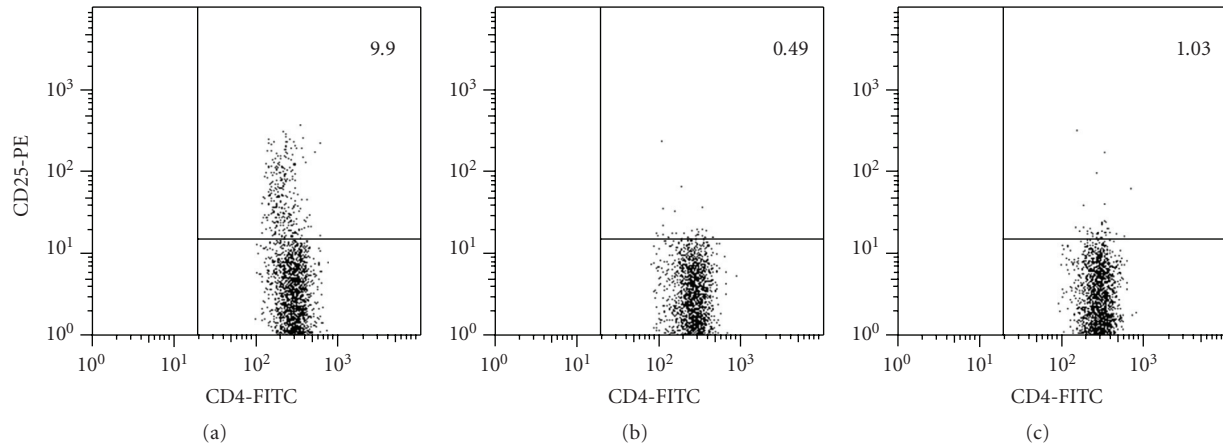


FIGURE 1: Injection of PC61 mAb depletes CD4⁺CD25⁺ cells. BALB/c mice (2 animals per group) were injected ip with DPBS (a), 100 μ g (b), or 200 μ g (c) of purified anti-CD25 mAb (PC61). Two days later, spleen cells were obtained; immunofluorescence was carried out using anti-CD4-FITC and anti-CD25-PE mAbs, and cells were analyzed by FACS. The lymphocyte region was first identified by FSC and SSC characteristics, gated, and 10,000 gated events were captured. Numbers indicate % of CD4⁺CD25⁺ cells within the CD4⁺ population.

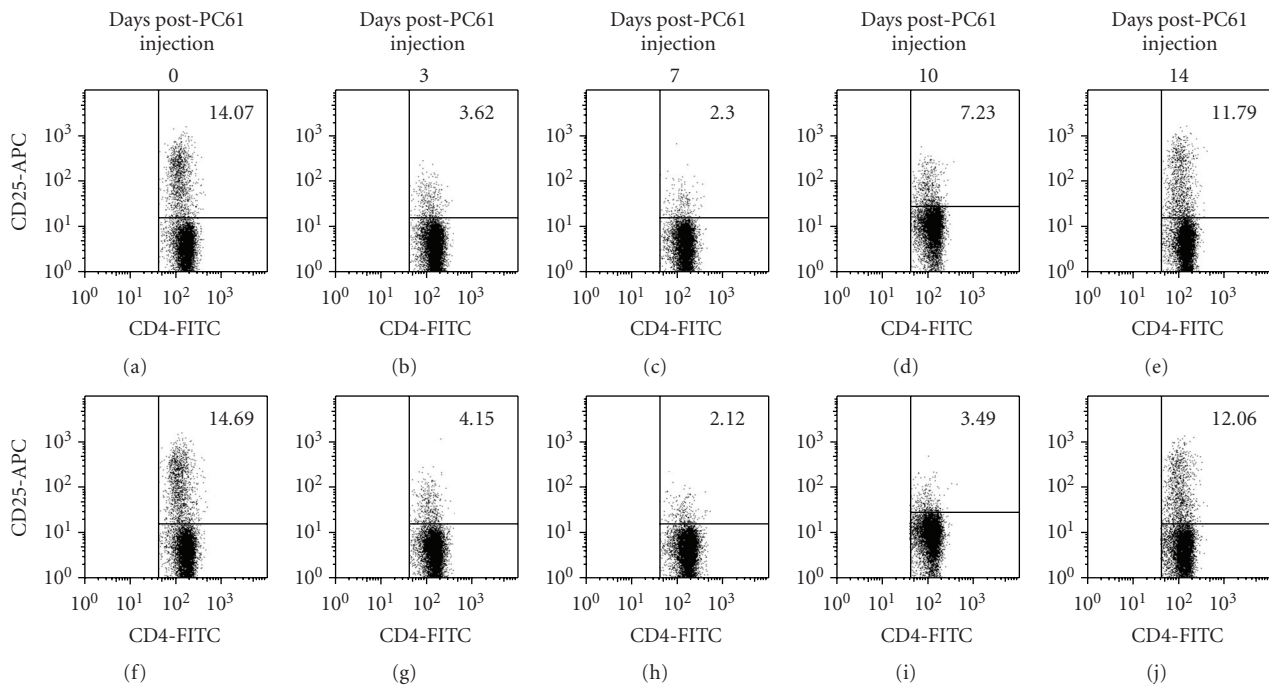


FIGURE 2: Kinetics analysis of the depletion of CD4⁺CD25⁺ cells. BALB/c mice were injected ip with 100 μ g ((a)–(e)) or 200 μ g ((f)–(j)) of PC61 mAb. Spleen cells were obtained at different time points and immunofluorescence was carried out as described in Figure 1 using anti-CD4-FITC and anti-CD25-APC mAbs. The lymphocyte region was first identified and gated by FSC and SSC characteristics, the CD4⁺ region was subgated and 10,000 CD4⁺ events were captured. Numbers indicate % of CD4⁺CD25⁺ cells within the CD4⁺ population.

by other cell types, including activated CD4⁺ T cells, and Foxp3 is exclusively expressed by Tregs and is required for their development and function [22], we thus analyzed the depletion of Foxp3⁺ cells (Tregs) the day of infection (2 days after depletion). We found that only 53% of Foxp3⁺ cells were eliminated by injection of the PC61 mAb (Figure 3), confirming results previously reported [37].

Weight changes and mortality were analyzed for 25 days after depletion and infection (Figure 4). All mice lost up to 25% weight due to the parasite; it has to be noted that depleted mice lost 5% less weight compared to isotype treated mice. After 15 days the latter started to gain weight (Figures 4(a) and 4(b)), but did not reach their initial weight.

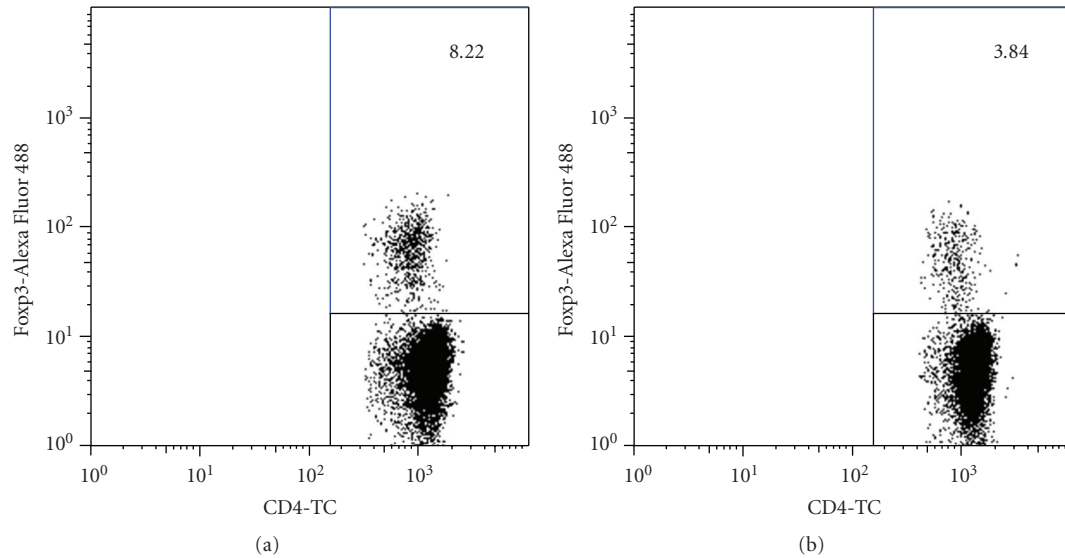


FIGURE 3: Depletion with PC61 mAb partially eliminates Foxp3⁺ cells. BALB/c mice were injected with 200 μ g of isotype (a) or PC61 (b) mAb ip. Two days later, before infection, animals were bled and immunofluorescence for detection of Foxp3 was carried out. The lymphocyte region was first identified and gated by FSC and SSC characteristics, the CD4⁺ region was subgated, and 10,000 CD4⁺ events were captured. Numbers indicate % of Foxp3⁺ cells within the CD4⁺ population. A representative analysis from one mouse per group is shown.

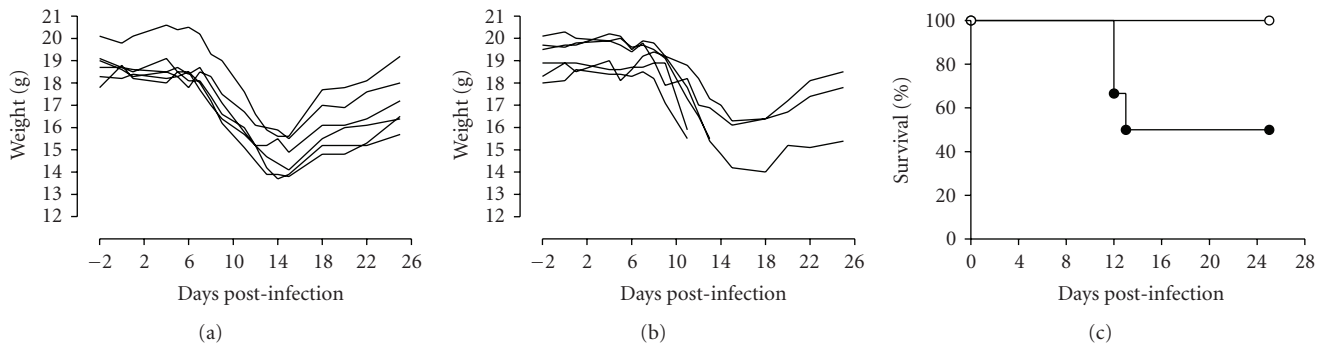


FIGURE 4: Depletion of CD25⁺ cells induces mortality in BALB/c mice infected with *T. gondii*. Animals ($n = 6$) were injected ip with 200 μ g of either isotype mAb (a) (\circ in (c)) or PC61 mAb (b) (\bullet in (c)) and 2 days later they were infected perorally with 20 cysts of the ME49 strain of *T. gondii*. Weight ((a),(b)) and cumulative mortality (c) were recorded daily for 25 days. In (a) and (b), each line corresponds to one mouse.

When mortality was analyzed, isotype-treated mice survived during the 25 day experiment, but 50% of PC61-treated mice died <13 days post infection (dpi) (Figure 4(c)), although this result was not statistically significant ($P = .0549$). A similar result was observed when mice were infected with 50 cysts, although we observed a higher mortality rate (data not shown).

Analysis of blood samples of the same animals from this experiment showed that although CD25⁺ cells were eliminated, including Foxp3⁺ and Foxp3⁻ cells, at later time points, a marked increase in CD25⁺Foxp3⁻ cells (Tact) was observed in depleted animals, while the percentage of Foxp3⁺ cells (Tregs) was still decreased (data not shown). Therefore, we carried out an experiment to confirm these observations. We depleted and infected mice as described above, they were killed 10 days pi, when animals showed symptoms of

toxoplasmosis (2–4 days before death) and an exhaustive analysis of spleen cells was performed.

Analysis of Tregs and Tact cells from infected animals at this time point (Figure 5) showed that infection induced an expansion of Tact cells (3.76 versus 24.79). Depleted infected animals, however, showed a dramatic expansion of Tact when compared to depleted/noninfected animals (0.94 versus 25.79), but no difference was detected between Tact from infected nondepleted or depleted mice (24.79 versus 25.79), demonstrating that depletion did not prevent activation of T cells. On the other hand, a nearly 50% reduction in percentage of Tregs was observed in infected-nondepleted animals, when compared to control mice (8.32 versus 16.35); depleted noninfected animals still showed a 50% decrease in Tregs at this time point (8.34 versus 16.35), while depleted infected animals had 4.85% of Tregs, which

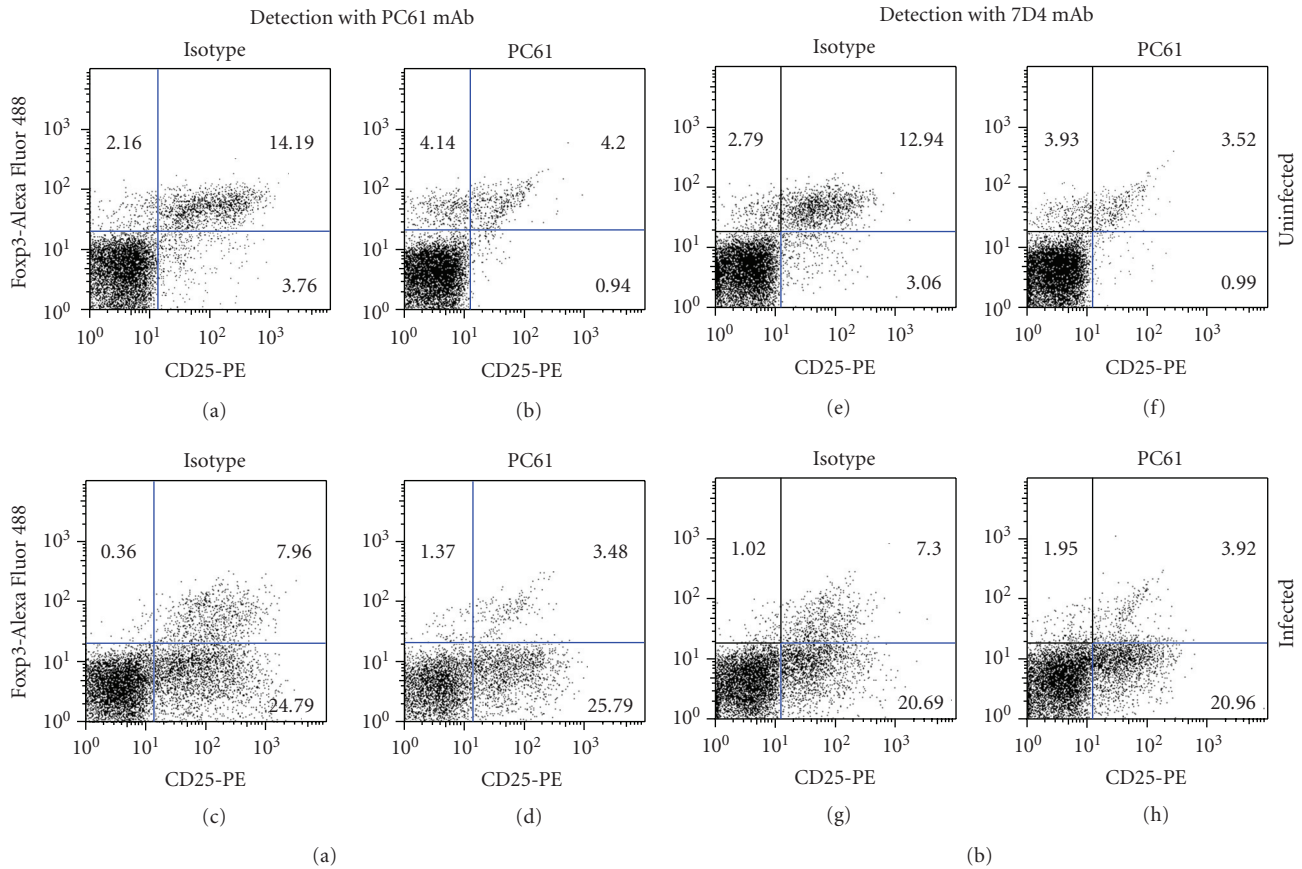


FIGURE 5: Analysis of Tregs and Tact cells after PC61 injection and infection with *T. gondii*. Animals were depleted and infected as described in Figure 4. At 10 dpi spleens were obtained and immunofluorescence was carried out using anti-CD4-PerCP, anti-Foxp3-Alexa Fluor 488 and anti-CD25-PE mAb, either PC61 (a)–(d) or 7D4 clone (e)–(h). The lymphocyte region was first identified and gated by FSC and SSC characteristics, the CD4⁺ region was subgated, and 10,000 CD4⁺ events were captured. Numbers indicate % of cells from the CD4⁺ gating. A representative analysis from one mouse per group is shown.

represents a 50% reduction when compared to noninfected-depleted mice (4.85 versus 8.34). All these results were similar when mAb 7D4 was used to detect CD25 cells (Figure 5), demonstrating no interference in the detection of CD25 with PC61 mAb.

A summary of the results obtained from all mice studied is depicted in Figure 6. Analysis shows that at 10 dpi (12 days post depletion) 50% of Tregs are still lacking in depleted noninfected animals. Interestingly, infection induces a 50% reduction of Tregs, but depleted infected animals have 50% less Tregs than nondepleted infected mice, and only 25% of Tregs when compared to control noninfected mice. Analysis of Tact cells confirmed that infection leads to a dramatic expansion of this subset, which is not altered by depletion, since mean percentage of Tact cells was unaffected, although a high dispersion in data was observed (Figure 6).

When the ratio of Tact/Tregs cells was calculated (Figure 7), we found that in noninfected animals, whether depleted or nondepleted, ratios remained nearly unchanged (≤ 0.28). In infected mice, a higher ratio was observed (1.2–4.0), indicating a expansion of Tact cells due to the parasite. In depleted/infected mice, however, the ratio was 0.5–12.7

(Figure 7(a)): a group of 4 mice showed a very high ratio (>5.0), while another group presented a low ratio (0.5–1.15). The day we carried out this experiment, one animal was moribund, and its spleen cells showed the highest proportion of Tact/Tregs (ratio = 12.7, Figure 7(a)). It has to be noted that in this experiment, an additional group of mice was used to evaluate mortality (Figure 7(b)), and we found that 60% of animals died 15 days pi, which correlates to the percentage of mice with the higher proportion of Tact/Tregs (Figure 7(a)). All these experiments show that although the generation of Tact cells due to infection is not altered by depletion, the percentage of Tregs remained very low, turning susceptible a resistant strain of mice.

In the present work we analyzed the role of Tregs during infection with *T. gondii* in the resistant BALB/c strain of mice. We observed that infected animals showed a decreased number of Treg cells, a result which agrees with that reported by Ge et al. [43], who showed that in pregnant and nonpregnant mice, infection with *T. gondii* induced a reduction in Foxp3 mRNA expression levels in spleen and a reduction in both percentage and absolute number of Tregs. Thus, this parasite induces a decline in Tregs percentage [43]. These

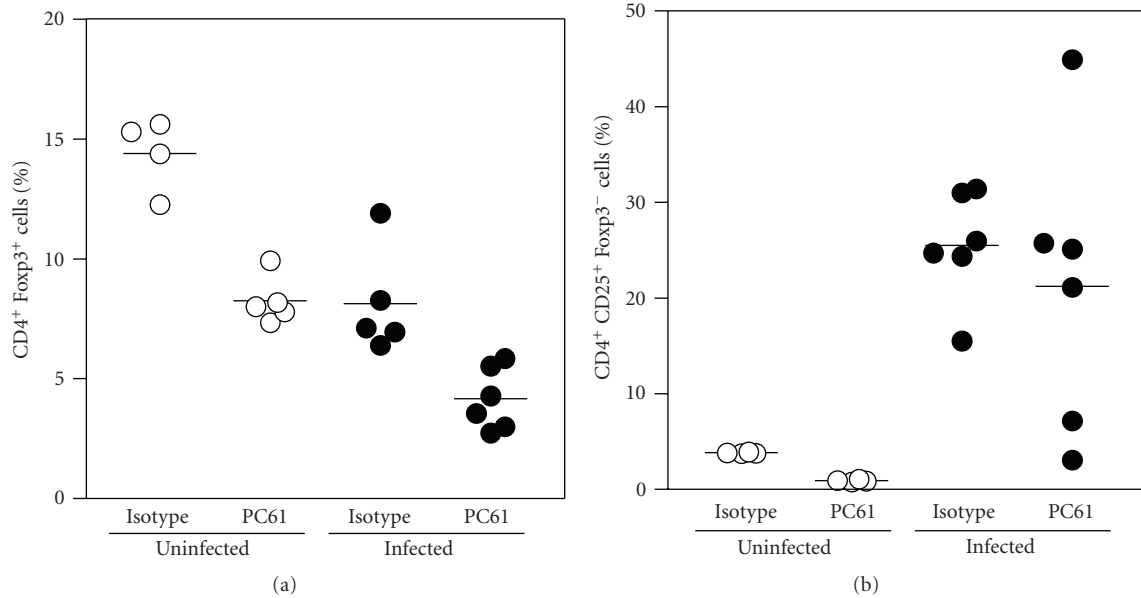


FIGURE 6: Summary of the Treg and Tact cell detection in mice after PC61 injection and infection with *T. gondii*. Percentage of Tregs (CD4⁺ Fosp3⁺) and Tact cells (CD4⁺ CD25⁺ Fosp3⁻) within the CD4⁺ gate obtained from all the animals described in Figure 5 is shown.

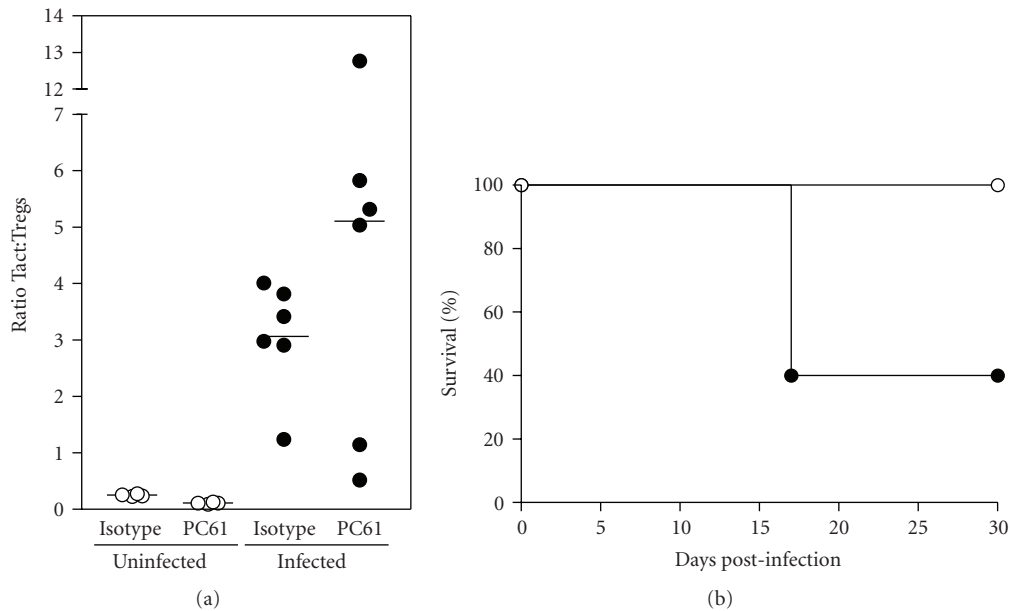


FIGURE 7: Infection with *T. gondii* induces an imbalance in Tact:Tregs cell ratio and is exacerbated by depletion. (a) Ratio of Tact:Tregs (CD4⁺ CD25⁺ Fosp3⁻ cells : CD4⁺ Fosp3⁺ cells) was calculated from data obtained from Figure 6. (b) An additional group of mice ($n = 5$) treated with isotype (○) or PC61 (●) was used to evaluate cumulative mortality for 30 days.

results differ from those observed during the acute phase of other infections (*P. berghei*, *S. mansoni*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium yoelii*, *Brugia malayi*, and *L. sigmodontis*), in which an increase in Fosp3⁺ cell number is observed [32, 39, 44–48]. In *T. gondii* infection, it is possible that Tregs die or migrate to other sites in order to control the immune response locally, as it has been shown during *P. berghei* infection [39]. It has to be

noted that *T. gondii* can infect all cell types and disseminates to most organs [49, 50]. The fate of Tregs during *T. gondii* infection, however, remains currently unknown.

Injection of PC61 to deplete CD25⁺ cells has been widely used to study the role of Tregs in different models [32, 36, 37, 39, 42, 51, 52]. In our depletion experiments, we observed that 50–60% of BALB/c mice died during the acute phase of infection, an observation that suggests that Tregs play an

important role in toxoplasmosis. However, since CD25 is also expressed by other cell types, injection of the mAb leads also to the depletion of Tact cells and interpretation of results should be taken carefully.

We used a low single dose (200 μ g) of PC61 mAb, which was enough to eliminate 50% of Tregs. These observations agree with those reported previously [37], in which a partial depletion of Tregs cells is observed after injection of PC61 mAb.

Injection of PC61 mAb initially eliminates 50% of Tregs, but in infected mice this reduction is exacerbated due to the infection, reaching 75% Tregs reduction in these animals at 10 days pi, when compared to nondepleted-noninfected mice. However, depletion did not hinder the activation of T cells after *T. gondii* infection. In fact, levels of CD69 expression and percentage of CD69⁺ cells were similar in Foxp3⁻ cells from nondepleted infected and depleted infected mice (data not shown), demonstrating that both groups generate the same proportion of Tact cells.

While this work was carried out, Couper et al. [41] reported that depletion using 1 mg of the PC61 mAb leads to an increased susceptibility of male C57BL/6J mice to the ME49 strain of *T. gondii*. Although the results in mortality obtained in our work are similar, we used the highly resistant BALB/c strain of mice, in contrast to the highly susceptible C57BL/6J strain. Moreover, we depleted animals with a lower concentration of PC61 mAb to lessen undesirable effects in other cell populations; a single dose of mAb (200 μ g), 2 days before infection was enough to achieve a 50% elimination of Tregs. We avoided the use of higher concentrations of PC61 mAb because we think that this would induce a broad and long lasting depletion of CD25⁺ cells (both Tact and Tregs) making more difficult the interpretation of the results.

The use of a suitable concentration of the PC61 mAb allowed us to detect a difference in the proportions of Tact and Treg cells 10 days pi. Thus, the amount of PC61 antibody did not prevent the generation of Tact cells due to the infection. The levels of Treg, however, remained low during infection, leading to the loss of resistance of the BALB/c strain. These results show that the absence of Tregs alters the protective immune response against *T. gondii* and thus mice become susceptible.

T. gondii induces the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells that are crucial to control infection [53]. These cells could in turn be controlled by Tregs, as it has been demonstrated in the *T. congolense* infection [31]. Our results show that Tregs play an important role in the modulation of the protective immune response against *T. gondii*. Since infection with this parasite drives a powerful TH1 immune response [53], it is tempting to speculate that the absence of Tregs induces an uncontrolled inflammatory response by Tact cells. The specific molecules and cells directly responsible for the death of animals, however, remain to be established.

Acknowledgments

This work was supported by Grant IN-200608 from PAPIIT (DGAPA, UNAM, Mexico), and by Grants 79775 and 102399

from CONACYT (Mexico). The authors are grateful to MVZ Georgina Díaz, MVZ Alfonso Malagón, and MVZ Jorge Omar García for their expert advice and help in the care of the animals. J. E. Olgún is a recipient of a scholarship from DGAPA. E. P. Tenorio is recipient of a PhD scholarship from CONACYT (Registro 199991) and part of the Biomedical Sciences PhD Program of the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- [1] H. P. Hughes, "Toxoplasmosis: the need for improved diagnostic techniques and accurate risk assessment," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 120, pp. 105–139, 1985.
- [2] J. G. Montoya and O. Liesenfeld, "Toxoplasmosis," *The Lancet*, vol. 363, no. 9425, pp. 1965–1976, 2004.
- [3] R. McCabe and J. S. Remington, "Toxoplasmosis: the time has come," *The New England Journal of Medicine*, vol. 318, no. 5, pp. 313–315, 1988.
- [4] J. S. Remington and J. L. Krahenbuhl, "Immunology of *Toxoplasma gondii*," in *Immunology of Human Infection, Part II*, p. 327, Plenum, New York, NY, USA, 1982.
- [5] S.-Y. Wong and J. S. Remington, "Toxoplasmosis in pregnancy," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 18, no. 6, pp. 853–861, 1994.
- [6] J. K. Frenkel, "Adoptive immunity to intracellular infection," *The Journal of Immunology*, vol. 98, no. 6, pp. 1309–1319, 1967.
- [7] J. Aliberti, "Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*," *Nat.Rev.Immunol.*, vol. 5, no. 2, pp. 162–170, 2005.
- [8] R. T. Gazzinelli, F. T. Hakim, S. Hieny, G. M. Shearer, and A. Sher, "Synergistic role of CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine," *The Journal of Immunology*, vol. 146, no. 1, pp. 286–292, 1991.
- [9] Y. Suzuki and J. S. Remington, "Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2⁺ and Lyt-1⁺, L3T4⁺ T cells in mice," *The Journal of Immunology*, vol. 140, no. 11, pp. 3943–3946, 1988.
- [10] R. T. Gazzinelli, D. Amichay, T. Sharton-Kersten, E. Grunwald, J. M. Farber, and A. Sher, "Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 219, pp. 127–139, 1996.
- [11] R. T. Gazzinelli, M. Wysocka, S. Hayashi, et al., "Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*," *The Journal of Immunology*, vol. 153, no. 6, pp. 2533–2543, 1994.
- [12] C.-H. Liu, Y.-T. Fan, A. Dias, et al., "Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice," *The Journal of Immunology*, vol. 177, no. 1, pp. 31–35, 2006.
- [13] Y. Suzuki, M. A. Orellana, R. D. Schreiber, and J. S. Remington, "Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*," *Science*, vol. 240, no. 4851, pp. 516–518, 1988.
- [14] Y. Suzuki and J. S. Remington, "The effect of anti-IFN- γ antibody on the protective effect of Lyt-2⁺ immune T cells against toxoplasmosis in mice," *The Journal of Immunology*, vol. 144, no. 5, pp. 1954–1956, 1990.

- [15] E. Y. Denkers and R. T. Gazzinelli, "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11, no. 4, pp. 569–588, 1998.
- [16] Y. Suzuki, A. Sher, G. Yap, et al., "IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*," *The Journal of Immunology*, vol. 164, no. 10, pp. 5375–5382, 2000.
- [17] D. K. Sojka, Y.-H. Huang, and D. J. Fowell, "Mechanisms of regulatory T-cell suppression—a diverse arsenal for a moving target," *Immunology*, vol. 124, no. 1, pp. 13–22, 2008.
- [18] D. A. A. Vignali, L. W. Collison, and C. J. Workman, "How regulatory T cells work," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 7, pp. 523–532, 2008.
- [19] Q. Tang and J. A. Bluestone, "The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation," *Nature Immunology*, vol. 9, no. 3, pp. 239–244, 2008.
- [20] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda, "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases," *The Journal of Immunology*, vol. 155, no. 3, pp. 1151–1164, 1995.
- [21] T. Takahashi, T. Tagami, S. Yamazaki, et al., "Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, no. 2, pp. 303–310, 2000.
- [22] J. D. Fontenot, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky, "Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells," *Nature Immunology*, vol. 4, no. 4, pp. 330–336, 2003.
- [23] R. Khattri, T. Cox, S.-A. Yasayko, and F. Ramsdell, "An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells," *Nature Immunology*, vol. 4, no. 4, pp. 337–342, 2003.
- [24] S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono, "Regulatory T cells and immune tolerance," *Cell*, vol. 133, no. 5, pp. 775–787, 2008.
- [25] J. M. Kim, J. P. Rasmussen, and A. Y. Rudensky, "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice," *Nature Immunology*, vol. 8, no. 2, pp. 191–197, 2007.
- [26] B. T. Rouse and S. Suvas, "Regulatory cells and infectious agents: détente cordiale and contraire," *The Journal of Immunology*, vol. 173, no. 4, pp. 2211–2215, 2004.
- [27] Y. Belkaid and K. Tarbell, "Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions," *Annual Review of Immunology*, vol. 27, pp. 551–589, 2009.
- [28] Y. Belkaid and B. T. Rouse, "Natural regulatory T cells in infectious disease," *Nature Immunology*, vol. 6, no. 4, pp. 353–360, 2005.
- [29] K. H. G. Mills, "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, no. 11, pp. 841–855, 2004.
- [30] M. Cambos, B. Bélanger, A. Jacques, A. Roulet, and T. Scorza, "Natural regulatory (CD4⁺CD25⁺FOXP⁺) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi* adami infection and do not contribute to immune evasion," *International Journal for Parasitology*, vol. 38, no. 2, pp. 229–238, 2008.
- [31] M. Williams, G. Oldenhove, W. Noel, et al., "African trypanosomiasis: naturally occurring regulatory T cells favor trypanotolerance by limiting pathology associated with sustained type 1 inflammation," *The Journal of Immunology*, vol. 179, no. 5, pp. 2748–2757, 2007.
- [32] J. J. Taylor, M. Mohrs, and E. J. Pearce, "Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population," *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 10, pp. 5839–5847, 2006.
- [33] F. H. Amante, A. C. Stanley, L. M. Randall, et al., "A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria," *The American Journal of Pathology*, vol. 171, no. 2, pp. 548–559, 2007.
- [34] M. D. Taylor, L. LeGoff, A. Harris, E. Malone, J. E. Allen, and R. M. Maizels, "Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo," *The Journal of Immunology*, vol. 174, no. 8, pp. 4924–4933, 2005.
- [35] C. Piña-Vázquez, R. Saavedra, and P. Héron, "A quantitative competitive PCR method to determine the parasite load in the brain of *Toxoplasma gondii*-infected mice," *Parasitology International*, vol. 57, no. 3, pp. 347–353, 2008.
- [36] K. M. Quinn, R. S. McHugh, F. J. Rich, et al., "Inactivation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells during early mycobacterial infection increases cytokine production but does not affect pathogen load," *Immunology & Cell Biology*, vol. 84, no. 5, pp. 467–474, 2006.
- [37] A. McNeill, E. Spittle, and B. T. Bäckström, "Partial depletion of CD69^{low}-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 65, no. 1, pp. 63–69, 2007.
- [38] T. T. A. Long, S. Nakazawa, S. Onizuka, M. C. Huaman, and H. Kanbara, "Influence of CD4⁺CD25⁺ T cells on *Plasmodium berghei* NK65 infection in BALB/c mice," *International Journal for Parasitology*, vol. 33, no. 2, pp. 175–183, 2003.
- [39] A. M. Vigário, O. Gorgette, H. C. Dujardin, et al., "Regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria," *International Journal for Parasitology*, vol. 37, no. 8-9, pp. 963–973, 2007.
- [40] K. N. Couper, D. G. Blount, J. B. de Souza, I. Suffia, Y. Belkaid, and E. M. Riley, "Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3⁺ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice," *The Journal of Immunology*, vol. 178, no. 7, pp. 4136–4146, 2007.
- [41] K. N. Couper, P. A. Lanthier, G. Perona-Wright, et al., "Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection," *The Journal of Immunology*, vol. 182, no. 7, pp. 3985–3994, 2009.
- [42] C. Q. Nie, N. J. Bernard, L. Schofield, and D. S. Hansen, "CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T-cell function and inhibit the development of *Plasmodium berghei*-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis," *Infection and Immunity*, vol. 75, no. 5, pp. 2275–2282, 2007.
- [43] Y. Y. Ge, L. Zhang, G. Zhang, et al., "In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4⁺CD25⁺-regulatory T cells," *Parasite Immunology*, vol. 30, no. 9, pp. 471–481, 2008.
- [44] C. A. M. Finney, M. D. Taylor, M. S. Wilson, and R. M. Maizels, "Expansion and activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection," *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 7, pp. 1874–1886, 2007.

- [45] J. P. Scott-Browne, S. Shafiani, G. Tucker-Heard, et al., "Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 9, pp. 2159–2169, 2007.
- [46] K. N. Couper, D. G. Blount, M. S. Wilson, et al., "IL-10 from CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻CD127⁻ adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection," *PLoS Pathogens*, vol. 4, no. 2, Article ID e1000004, 2008.
- [47] H. J. McSorley, Y. M. Harcus, J. Murray, M. D. Taylor, and R. M. Maizels, "Expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*," *The Journal of Immunology*, vol. 181, no. 9, pp. 6456–6466, 2008.
- [48] M. D. Taylor, N. van der Werf, A. Harris, et al., "Early recruitment of natural CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection," *European Journal of Immunology*, vol. 39, no. 1, pp. 192–206, 2009.
- [49] L. Zenner, F. Darcy, A. Capron, and M.-F. Cesbron-Delauw, "*Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats," *Experimental Parasitology*, vol. 90, no. 1, pp. 86–94, 1998.
- [50] M. H. Sumyuen, Y. J. F. Garin, and F. Derouin, "Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain," *Journal of Parasitology*, vol. 81, no. 2, pp. 327–329, 1995.
- [51] H. Hisaeda, Y. Maekawa, D. Iwakawa, et al., "Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 1, pp. 29–30, 2004.
- [52] A. P. Kohm, J. S. McMahon, J. R. Podojil, et al., "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells," *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 6, pp. 3301–3305, 2006.
- [53] E. Y. Denkers and R. T. Gazzinelli, "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11, no. 4, pp. 569–588, 1998.

3.4. Efecto de la depleción en ratones BALB/c y C57BL/6J infectados con *T. gondii*

Resumen de los hallazgos publicados en el artículo: **Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly Tregs in BALB/c mice but activated cells in C57BL/6J mice.** Tenorio, E. P., Fernandez, J., Olguin, J. E., and Saavedra, R. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011. 62: 362-367.

Los resultados descritos previamente demuestran que el tratamiento con el mAb anti-CD25 antes de la infección elimina principalmente células T_{reg} en la cepa BALB/c y principalmente células T_{conv} en la cepa C57BL/6J. Cabe recordar que CD25 también se expresa después de la activación en otras poblaciones, como células CD8⁺, B y NK [238]. Por lo tanto la evaluación del efecto de la depleción sobre diferentes poblaciones celulares activadas durante la infección con *T. gondii* es esencial para la interpretación adecuada de los datos obtenidos de experimentos con animales depletados de células CD25⁺. Con el objetivo de evaluar el efecto de la depleción en diferentes poblaciones de células activadas durante la infección con *T. gondii* inyectamos i.p. ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6J con 200 µg del mAb PC61 y dos días después los infectamos con 20 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii*. Siete días después de la infección obtuvimos los bazo y evaluamos el porcentaje de células CD25⁺ en las subpoblaciones CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ y NK. Nuestros resultados indican que el efecto del tratamiento con el mAb PC61 es contrastante entre la cepa resistente y la susceptible a la infección. En la cepa BALB/c el tratamiento con el mAb eliminó principalmente células T_{reg} mientras que en los ratones C57BL/6J el mismo tratamiento eliminó otros subtipos de células activadas, principalmente células NK. Por lo tanto, los resultados obtenidos de experimentos con depleciones de células CD25⁺ deben ser interpretados siempre con la conciencia de que el tratamiento no llevará a la eliminación específica de células T_{reg}. Más aún, estos resultados demuestran que en el modelo de infección con *T. gondii*, el uso de la depleción con PC61 en la cepa C57BL/6J es completamente inviable para el estudio de las T_{regs}, mientras que en el caso de los BALB/c es indicativo del papel dichas células durante la infección.

Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly Tregs in BALB/c mice, but activated cells in C57BL/6J mice

Eda Patricia Tenorio, Jacqueline Fernández, Jonadab Efraín Olgún & Rafael Saavedra

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Correspondence: Rafael Saavedra, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70228, Ciudad Universitaria, CP 04510, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 555 622 3832; fax: +52 555 550 3982; e-mail: saavedra@servidor.unam.mx

Received 10 December 2010; revised 17 March 2011; accepted 4 April 2011.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00805.x

Editor: Willem van Eden

Keywords

Toxoplasma gondii; regulatory T cells; activated T cells; CD25 depletion; mouse strains.

Abstract

Analysis of regulatory T cells (Tregs) *in vivo* during infection is crucial for the understanding of immune response modulation. Depletion experiments using anti-CD25 monoclonal antibody (mAb) in order to eliminate Tregs have been widely used for this purpose despite the fact that this approach may also lead to the elimination of activated T cells. We show in this paper that treatment with anti-CD25 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates a different pattern of cell subsets in the resistant BALB/c and the susceptible C57BL/6J mouse strain. Injection with PC61 mAb leads to the elimination of most Tregs in BALB/c mice, while in C57BL/6J animals, treatment depletes other activated subsets [natural killer (NK), B and CD4⁺ T cells]. This difference is a consequence of the dramatic cell activation observed in the latter, but not in the former strain. The different effect of the depletion reported here demonstrates that careful analysis in each model is mandatory in order to avoid misleading conclusions.

Regulatory T cells (Tregs) are a subtype of CD4⁺ T lymphocytes important for homeostasis of the immune system (Sakaguchi *et al.*, 2008). These cells express CD25 constitutively, the α -chain of the interleukin-2 receptor, which has been used as a target molecule to eliminate Tregs with monoclonal antibodies (mAbs) for studying the role of these cells *in vivo* and *in vitro* (Sakaguchi *et al.*, 1995; Nie *et al.*, 2007).

The expression of CD25, however, is upregulated upon T-cell activation and is thus expressed by recently activated conventional CD4⁺ T cells (Tact) (Smith, 1988). When depletion experiments are carried out while Tact cells arise, for example during infection models, injection of the anti-CD25 mAb could also lead to the elimination of these cells, and the role of Tregs *in vivo* is thus difficult to elucidate using this approach.

Previous reports demonstrate that treatment with PC61 mAb before infection with *Toxoplasma gondii* reduces the survival rate of mice (Couper *et al.*, 2009; Tenorio *et al.*, 2010). However, in C57BL/6J mice, PC61 treatment eliminated mainly effector T cells (Couper *et al.*, 2009), while in BALB/c mice, it led to the elimination of mainly Tregs

(Tenorio *et al.*, 2010). The contrasting results between these reports could be explained by the different amounts of PC61 mAb used for depletion (1 mg in C57BL/6J vs. 200 μ g in BALB/c). However, since it has been reported that susceptibility of C57BL/6J mice is related to the necrosis of the small intestine mediated by interferon- γ and resistance of BALB/c is highly dependent on this cytokine (Liesenfeld *et al.*, 1996), it is tempting to speculate that the outcome of depletion could also be modified by the mouse strain used for analysis.

In this paper, we evaluated the effect of depletion with PC61 mAb before infection with *T. gondii* in the resistant BALB/c and the susceptible C57BL/6J mice. Our results demonstrate that *T. gondii* infection induces a divergent expansion of several activated cell populations between these strains. Consequently, the eliminated subtypes in each strain after depletion/infection differ.

Mice handling and experimental protocols used in this study were approved by the local Bioethics Committee for Animal Research. The methodology used for all experiments was described previously (Tenorio *et al.*, 2010). Female BALB/c and C57BL/6J mice (6–8 weeks old, weighing

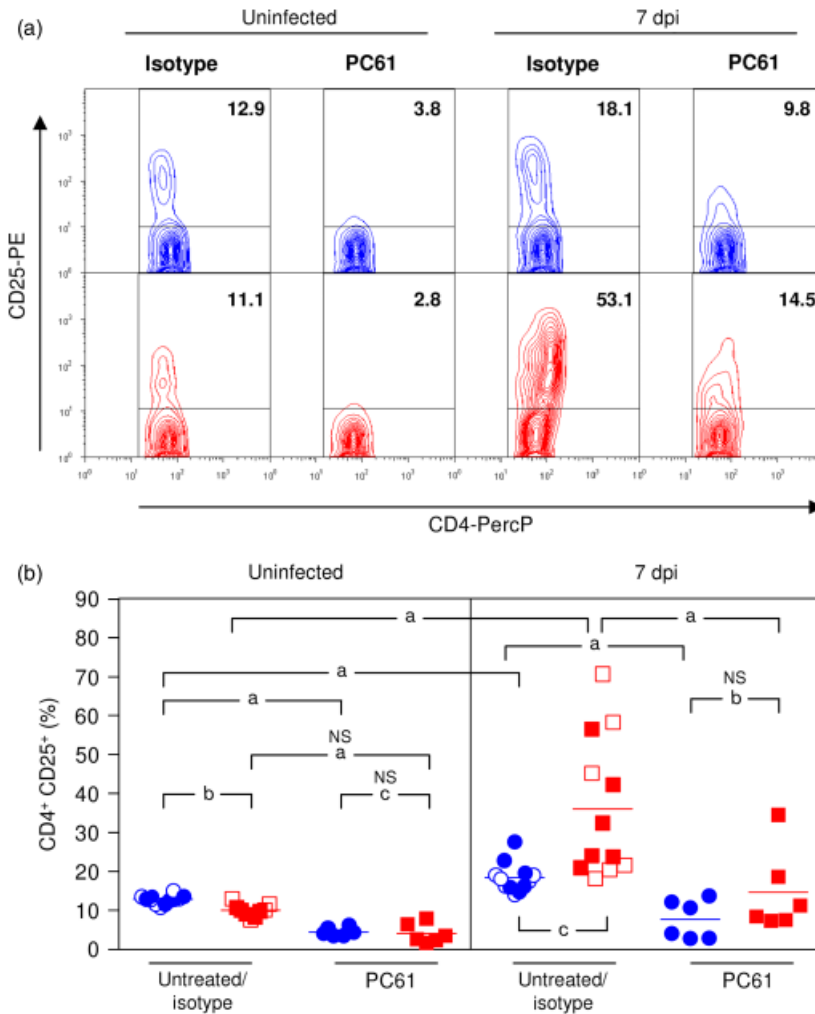


Fig. 1. Differential effect of depletion with PC61 mAb on CD4⁺CD25⁺ cells in BALB/c and C57BL/6J mice during *Toxoplasma gondii* infection. BALB/c and C57BL/6J mice were injected intraperitoneally with PC61 mAb or a control isotype mAb and, 2 days later, they were perorally infected with the ME49 strain of *T. gondii*. Splenocytes were obtained 7 days later, immunofluorescence using anti-CD4-PerCP, anti-CD25-PE, anti-CD19-FITC and anti-CD8-Alexa Fluor 647 mAbs was carried out and cells were analyzed by FACS. The lymphocyte region was first identified by FSC and SSC characteristics, and results from the CD4 gate are shown. (a) Representative analysis of CD25 expression within the CD4 subset; numbers represent the percentage of CD4⁺CD25⁺ cells. Upper panel: BALB/c. Lower panel: C57BL/6J. (b) Results from two independent experiments, with at least two mice per group shown. Symbols represent data from individual animals (●, ○: BALB/c; ■, □: C57BL/6J). Open symbols represent untreated animals and closed symbols represent isotype or PC61-treated mice. Statistical significance was determined using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test in the indicated groups within BALB/c or C57BL/6J mice (^a*P* < 0.05) and Student's *t*-test (^b*P* < 0.05) or Student's *t*-test with Welch's correction (^c*P* < 0.05) to compare between strains in each treatment. NS, not significant.

18–20 g) were injected intraperitoneally with 200 µg of purified PC61 mAb and 2 days later they were orally infected with 20 cysts of the avirulent ME49 strain of *T. gondii*. On the day of infection, blood samples were analyzed to verify the depletion efficiency. The mean percentage of reduction of CD4⁺CD25⁺ cells was 95.8% in BALB/c and 94.5% in B6 mice (data not shown), demonstrating that a high and similar efficiency of depletion is achieved in both strains.

We previously demonstrated that the highest percentage of CD4⁺CD25⁺ cells depletion is observed 7–10 days after mAb injection (Tenorio *et al.*, 2010). Therefore, we analyzed the effect of the treatment at 7 days postinfection (dpi) only, which corresponds to 9 days after depletion. A representative CD4⁺CD25⁺ FACS analysis of spleen cells is shown in Fig. 1a. The results from several experiments (Fig. 1b) in uninfected mice showed that the CD4⁺CD25⁺ levels were slightly lower in B6 mice (10%) than in BALB/c animals (12.9%, *P* < 0.001); these observations correlated with previously reported data (Chen *et al.*, 2005). At this time point

(9 days postdepletion), uninfected/depleted BALB/c and B6 mice showed a similar reduction of CD4⁺CD25⁺ cells (64.5% vs. 59%).

After infection, BALB/c mice showed an increase in CD4⁺CD25⁺ cells (18.4%), which contrasts with the higher expansion detected in B6 animals (36.1%) (Fig. 1b). No significant difference was observed in CD25 expression in cells from both strains (data not shown). Although depleted/infected BALB/c mice showed lower levels of CD4⁺CD25⁺ cells than depleted/infected B6 animals (7.7% vs. 14.6%) (Fig. 1b), the reduction percentage of CD4⁺CD25⁺ cells in both strains was similar when compared with infected nondepleted animals (58.2% in BALB/c vs. 59.7% in B6), demonstrating that depletion efficiency is similar in infected animals from both strains.

The CD4⁺CD25⁺ population described in Fig. 1, however, includes Tregs and CD4⁺ Tact. We thus analyzed CD25 and Foxp3 to discriminate between CD25⁺ Tregs (CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺) and Tact (CD4⁺Foxp3⁻CD25⁺)

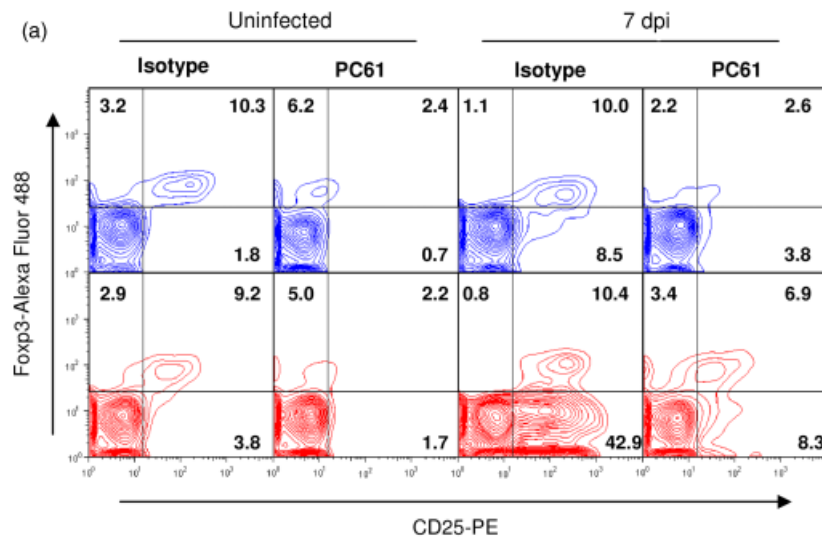
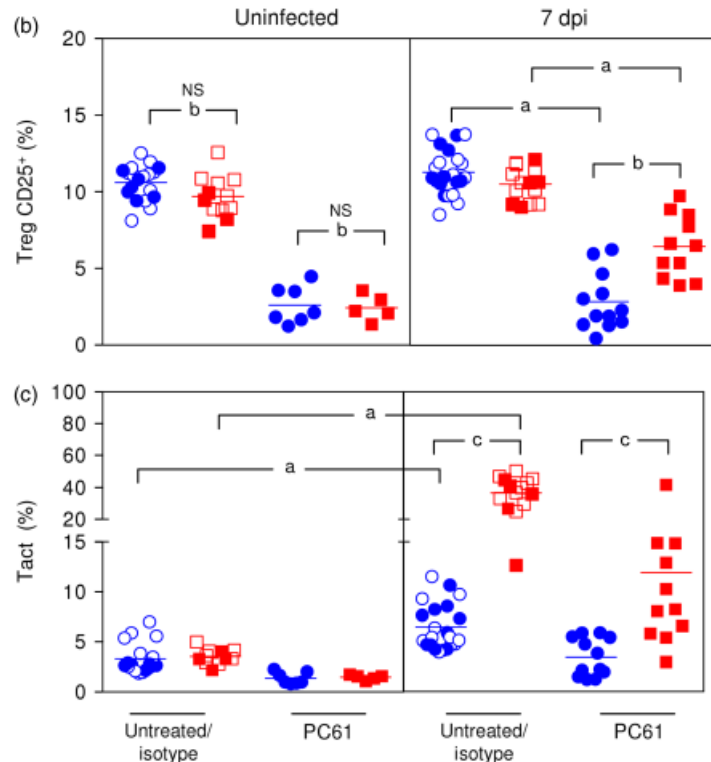


Fig. 2. Injection of PC61 mAb depletes mainly Tact in C57BL/6J and CD25⁺ Tregs in BALB/c mice. BALB/c and C57BL/6J mice were treated and infected as described in Fig. 1. At 7 days postinfection (dpi), splenocytes were obtained, stained with anti-CD4-TC, anti-CD25-PE and anti-Fopx3-Alexa Fluor 488 mAbs and analyzed by FACS. The lymphocyte region was first identified by FSC and SSC characteristics, and the results from the CD4 gate are shown. (a) Representative analysis of CD25 and Fopx3 expression within the CD4⁺ population. Numbers indicate the percentage of cells in each quadrant. Upper panel: BALB/c. Lower panel: C57BL/6J. (b) Results obtained from three to four independent experiments, with at least two mice per group, are shown. Symbols represent data from individual animals (●, ○: BALB/c; ■, □: C57BL/6J). Open symbols represent untreated animals and closed symbols represent isotype or PC61-treated mice. In some experiments using BALB/c mice, the mAbs combination was anti-CD4-FITC, anti-Fopx3-PE and anti-CD25-APC. Statistical significance was determined using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test in the indicated groups within BALB/c or C57BL/6J mice (^a*P* < 0.05) and Student's *t*-test (^b*P* < 0.05) or Student's *t*-test with Welch's correction (^c*P* < 0.05) to compare between strains in each treatment. NS, not significant.



after depletion. As can be observed in Fig. 2a and b, analogous proportions of CD25⁺ Tregs were detected in uninfected animals from both strains and a similar reduction was detected after depletion (up to 75% reduction). It has to be noted that the CD25⁻ Treg population increased after depletion in both strains (Fig. 2a); this increase has been described previously and is discussed elsewhere (Zelenay & Demengeot, 2006).

After infection, the percentage of eliminated Tregs in BALB/c mice was similar to that observed in uninfected animals

(75%), whereas in B6 mice, this proportion declined to 38.1% (Fig. 2a and b); thus, a higher proportion of CD25⁺ Tregs was eliminated in infected BALB/c than in infected B6 mice. Given that B6 mice generated 5.7 times more Tact than BALB/c mice (Fig. 2a and c), the differential effect of depletion can be easily explained by the divergent expansion of Tact between mouse strains due to *T. gondii* infection. Therefore, this disparity led to an increased Tact cell elimination by the mAb in B6 mice (67%), whereas in BALB/c animals, the same treatment led to the elimination of 45.3% of Tact.

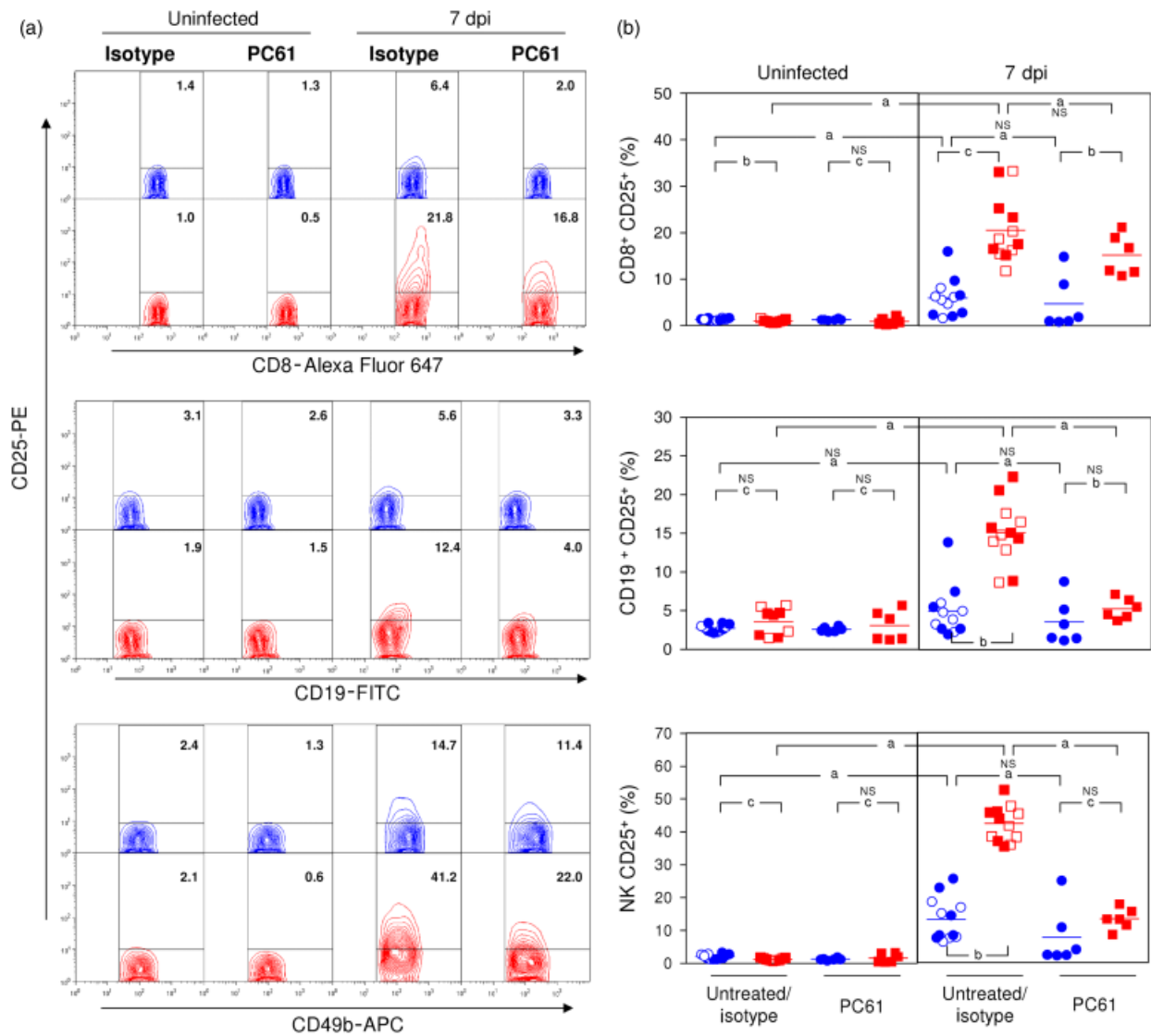


Fig. 3. Differential effect of depletion with PC61 mAb on activated CD8⁺, CD19⁺ and NK cells in BALB/c and C57BL/6J mice during *Toxoplasma gondii* infection. Cells from the animals depicted in Fig. 1 were stained with either anti-CD3-FITC, anti-CD25-PE and anti-CD49b-APC, or with the mAbs described in Fig. 1. For FACS analysis, the lymphocyte region was first identified by FSC and SSC characteristics and the results from the CD8, CD19 and NK (CD3⁻ CD49b⁺) gates are shown. (a) Representative analysis of CD25 expression within the CD8, CD19 and NK cell subsets; numbers show the percentage of CD25⁺ cells within each population. Upper panels: BALB/c. Lower panels: C57BL/6J. (b) Results obtained from two independent experiments, with at least two mice per group, are shown. Symbols represent data from individual animals (●, ○: BALB/c; ■, □: C57BL/6J). Open symbols represent untreated animals and closed symbols represent isotype or PC61-treated mice. Statistical significance was determined using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test in the indicated groups within BALB/c or C57BL/6J mice (^a*P* < 0.05) and Student's *t*-test (^b*P* < 0.05) or Student's *t*-test with Welch's correction (^c*P* < 0.05) to compare between strains in each treatment. NS, not significant.

Because CD25 expression is not restricted to Tregs or Tact, we analyzed CD8⁺, CD19⁺ and natural killer (NK) cells, which are also activated during *T. gondii* infection and could be eliminated after depletion. As can be observed in Fig. 3, in uninfected animals from both strains, the proportion of these activated subsets was very low (< 3.6%), and after depletion, a slight nonsignificant reduction was detected. At the time point of infection analyzed, the proportion of these activated

populations was dramatically increased in B6, but not in BALB/c mice (Fig. 3), a pattern similar to that observed in the CD4⁺ subset (Fig. 1). Despite the slight increase of activated CD8⁺, CD19⁺ and NK cells in BALB/c mice after infection, treatment with PC61 before infection did not modify these proportions significantly (Fig. 3). However, depleted/infected B6 mice showed a significantly reduced proportion of activated CD19⁺ and NK cells. Therefore,

Table 1. Effect of depletion on different activated cell types after *Toxoplasma gondii* infection

Cell subset	Uninfected				Infected				
	BALB/c		C57BL/6J		BALB/c		C57BL/6J		
	Untreated/ isotype	PC61	Reduction* (%)	Untreated/ isotype	PC61	Reduction (%)	Untreated/ isotype	PC61	Reduction (%)
Tregs (Foxp3 ⁺ CD25 ⁺)	10.6 ± 1.1*	2.6 ± 1.1	75.5	9.7 ± 1.4	2.4 ± 0.5	75.3	11.3 ± 1.5	2.8 ± 1.9	75.2
Tact (CD4 ⁺ Foxp3 ⁻ CD25 ⁺)	3.3 ± 1.5	1.4 ± 0.6	NS	3.5 ± 0.7	1.5 ± 0.3	NS	6.4 ± 2.3	3.5 ± 1.9	45.3
CD8 ⁺ CD25 ⁺	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	NS	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.7	NS	6.0 ± 4.0	4.8 ± 5.9	NS
CD19 ⁺ CD25 ⁺	2.7 ± 0.5	2.6 ± 0.3	NS	3.6 ± 1.8	3.1 ± 1.9	NS	5.0 ± 3.3	3.6 ± 3.0	NS
NK CD25 ⁺	2.0 ± 0.7	1.2 ± 0.3	NS	1.2 ± 0.4	1.6 ± 1.3	NS	13.3 ± 6.6	7.8 ± 9.0	NS

*Mean percentages ± SD were obtained from results of two to four experiments including at least two mice per group. When statistically significant differences between untreated/isotype and PC61-treated animals were found, the percentage of reduction is indicated and underlined. NS, not significant.

PC61 treatment before infection eliminates other activated cells, and the different pattern of depletion observed between strains is a consequence of the contrasting expansion and activation of effector cells.

A summary of the effect of depletion on all cell types analyzed is shown in Table 1. Because of the potent immune response generated in B6 mice, the injection of PC61 mAb eliminates a very high proportion of most activated cell subtypes (up to 69%), but only low levels of Tregs (38.1%). Hence, it is impossible to analyze the role of Tregs in *T. gondii*-infected B6 animals using classical CD25 depletion experiments, and any interpretation drawn from this model, including mortality rates, could be more related to a role of activated cells than to the role of Tregs.

Our results agree with a previous report (Couper *et al.*, 2009) and extend the current knowledge on the effect of depletion in other cell types using an infectious model. Our results were obtained using a single low dose of mAb (200 µg); therefore, it is clear that repeated injections of the mAb or the use of higher concentrations are unnecessary and would lead to the complete elimination of all subtypes expressing CD25. Even though other activated cell subtypes are also eliminated in BALB/c mice using the same treatment, Tregs are the largest eliminated cell subtype in this strain. Thus, the results obtained by Tregs depletion with anti-CD25 mAbs could provide an insight into the role of Tregs during *T. gondii* infection only in the BALB/c strain.

As a consequence of the contrasting immune response against the same pathogen generated by two mice strains of different haplotype, the depleted cell subtypes differ. The proportion of each CD25⁺ cell subset that remained after depletion in each strain is directly related to the amount of activated cells generated during infection. Thus, depletion experiments using anti-CD25 mAbs for the study of the role of Tregs during infection models should be thoroughly evaluated in order to avoid misleading conclusions.

Acknowledgements

This work was supported by grant IN-200608 from PAPIIT (DGAPA, UNAM, Mexico), and by grants 79775, 102399 and 102984 from CONACYT (Mexico). We are grateful to MVZ Georgina Díaz and MVZ Jorge Omar García for their expert advice and help in the care of the animals. E.P.T. is recipient of a PhD fellowship from CONACYT (Registro 199991). This work was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD Program of Doctorado en Ciencias Biomédicas of E.P.T. at the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

Chen X, Oppenheim JJ & Howard OM (2005) BALB/c mice have more CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and show greater

- susceptibility to suppression of their CD4+. *J Leukocyte Biol* **78**: 114–121.
- Couper KN, Lanthier PA, Perona-Wright G, Kummer LW, Chen W, Smiley ST, Mohrs M & Johnson LL (2009) Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* **182**: 3985–3994.
- Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS & Suzuki Y (1996) Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* **184**: 597–607.
- Nie CQ, Bernard NJ, Schofield L & Hansen DS (2007) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress CD4+ T-cell function and inhibit the development of *Plasmodium berghei*-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. *Infect Immun* **75**: 2275–2282.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M & Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**: 1151–1164.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T & Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**: 775–787.
- Smith KA (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**: 1169–1176.
- Tenorio EP, Olguin JE, Fernandez J, Vieyra P & Saavedra R (2010) Reduction of Foxp3+ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 786078. DOI:10.1155/2010/786078.
- Zelenay S & Demengeot J (2006) Comment on 'Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells'. *J Immunol* **177**: 2036–2037.

VI. Discusión

El objetivo de este trabajo fue determinar si las células T_{reg} participan en el periodo de inmunosupresión observado durante la fase aguda de la infección con *T. gondii*; el cual se caracteriza por la incapacidad de linfocitos T de responder a estímulos mitogénicos. El primer objetivo consistió en reproducir los datos previamente descritos, es decir la reducción en la proliferación utilizando ensayos por incorporación de [3 H]-Timidina y la reducción de la viabilidad celular y en los porcentajes de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ [106]. Nosotros reprodujimos dichos experimentos y ampliamos las observaciones reportadas al utilizar como método de evaluación de la proliferación la dilución del colorante CFSE. Este método nos permitió analizar las subpoblaciones $CD4^+$, $CD8^+$ y $CD19^+$, y demostramos que la inmunosupresión afecta únicamente a los linfocitos T pero no a los linfocitos B. Al comparar la supresión en animales susceptibles y resistentes a la infección, también confirmamos que la intensidad de la supresión de linfocitos T es menor en la cepa BALB/c que en la C57BL/6J [106]. Previos reportes indicaban que la población $CD4^+$ se encontraba suprimida durante este periodo [219], pero ésta es la primera vez que se demuestra que los linfocitos $CD8^+$ también se encuentran suprimidos. Nuestros análisis demuestran que durante la fase aguda hay una drástica reducción en el porcentaje y en la viabilidad de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$, lo cual concuerda con datos previamente reportados [218, 219, 223, 239]; sin embargo, el porcentaje y la viabilidad de los linfocitos B no se modificaron durante la infección. Todos estos resultados muestran que en nuestras manos la inmunosupresión se reproduce de acuerdo reportes anteriores permitiéndonos realizar los análisis de nuestro interés.

Como se describió anteriormente, las células y moléculas involucradas durante la inmunosupresión no han sido claramente definidas. Dado que las células T_{reg} tienen la capacidad de modular la proliferación de otras poblaciones celulares nos propusimos determinar si estas células participaban en la supresión observada durante la infección con *T. gondii* utilizando la cepa susceptible al parásito. Por lo tanto el siguiente objetivo fue el de caracterizar a las células T_{reg} durante la fase aguda de la infección. Paradójicamente, nuestros datos muestran que la inmunosupresión coincide con una reducción en la proporción y el número de células T_{reg} .

Esta reducción ya se había reportado y se ha sugerido que los animales infectados con este parásito tienen una menor capacidad de generar iT_{regs} en el intestino lo cual induce un desbalance en la homeostasis y en la cantidad de T_{regs} [197]. Recientemente, se describió que Helios es un factor de transcripción que permite distinguir entre la población de nT_{regs} e iT_{regs} [240]. Nuestros análisis de dicha molécula indican que al día 7 post infección, la proporción de T_{regs} naturales e inducidas es comparable a la de un ratón normal, sugiriendo que la reducción observada en este punto de la infección no se relaciona con un desbalance entre estas poblaciones. Al día 14 post infección, sin embargo, se observa un ligero incremento en el porcentaje de iT_{regs} . Estas observaciones sugieren que la reducción en T_{regs} no se debe a una reducción en la capacidad de generar iT_{regs} . Cabe mencionar que estos datos requieren ser confirmados, pues a pesar de que Helios se ha utilizado como un marcador para distinguir estas poblaciones [241-243], existen reportes indicando que su expresión se relaciona con la manera en que las T_{regs} son activadas [244].

El mecanismo subyacente responsable de la reducción de células T_{reg} parece ser en realidad la disminución de IL-2 que ocurre durante la infección, ya que en los animales infectados y tratados con complejos IL-2/anti-IL-2 mAb no se observa la reducción en T_{regs} [197]. Esto concuerda con otros reportes que han descrito que la IL-2 es necesaria para mantener la viabilidad y el fenotipo de las células T_{reg} , incluyendo la expresión de Foxp3 [150, 151, 245, 246]. Recientemente, se reportó que en un modelo de infección con *P. chabaudi* hay un incremento en el número de células T_{reg} seguido por una súbita reducción de las mismas; una cinética semejante se observa en el porcentaje y número de linfocitos $CD4^+$ productores de IL-2 en animales infectados. En esta infección la reducción de T_{regs} ocurre a los 8 días de infección, y también puede ser revertida con el tratamiento con complejos IL-2/anti-IL-2 mAb [176]. Estos reportes sugieren que la homeostasis de las células T_{reg} durante las infecciones depende en gran medida de la IL-2.

Parece paradójico que la inmunosupresión pueda ser mediada por una población celular que si bien tiene propiedades supresoras, se encuentra disminuida. Nuestros experimentos muestran que durante la infección con *T. gondii* las T_{regs} se activan, pues se incrementa la expresión de CD25, CTLA-4, CD69, pierden la expresión de CD62L, producen IL-10 e incrementan su capacidad supresora, sugiriendo que la eficiencia de las células T_{reg} compensa su reducción. Si bien estas características coinciden con lo reportado durante

otras infecciones parasitarias [177, 180, 190, 191], resulta interesante que no encontramos un incremento en la expresión de CD103, una integrina que se ha reportado como importante para células T_{reg} activadas y de memoria. Esto probablemente se deba a que CD103 es importante para inducir la migración y la retención de células T_{reg} en el sitio de la infección. Sin embargo, al tener *T. gondii* la capacidad de infectar cualquier célula no se localiza en un sitio particular como es el caso de las infecciones con, *L. major* [168], *L. infantum* [247], *H. polygyrus* [190-192] y *B. malayi* [188] que son los modelos donde se ha descrito el incremento en la expresión de dicha molécula y el porcentaje de T_{regs} CD103⁺ en el sitio de la infección o en los nódulos linfáticos adyacentes.

El incremento en la capacidad supresora observada en nuestros experimentos no concuerda con lo reportado por Oldenhove et al. [197]. Esto puede deberse a diferencias metodológicas como el tamaño del inóculo, el sexo de los animales o el método utilizado para determinar la proliferación. Probablemente se relacione también con el origen de las células utilizadas para realizar los ensayos, ya que nosotros utilizamos solamente esplenocitos y ellos utilizan una mezcla de T_{regs} de bazo y nódulos linfáticos. Esto podría influenciar el resultado de los ensayos de supresión ya que se ha reportado que la inmunosupresión ocurre en células de bazo pero no en nódulos mesentéricos [217], lo cual sugiere que las T_{regs} de cada sitio podrían tener propiedades diferentes.

La activación de las células T_{reg} observada a los 7 dpi sugería a que a pesar del 16.3% de reducción de T_{regs} las células restantes podrían ser capaces de inducir la supresión. Esta hipótesis fue confirmada cuando al eliminar las células T_{reg} los linfocitos T recuperaron por completo la capacidad proliferativa *in vitro*, demostrando que las células T_{reg} son las células responsables de la inmunosupresión observada durante a infección aguda con *T. gondii*. Esta es la primera vez que se revierte totalmente la inmunosupresión, pues experimentos analizando otras células y moléculas revertían la supresión sólo parcialmente; idealmente, estos resultados deben ser confirmados utilizando un modelo de eliminación específica de T_{regs} *in vivo*. Estudios anteriores sugerían los macrófagos eran responsables de la supresión [83, 220, 224] ya que las células adherentes de ratones infectados inducían supresión en células de ratones no infectados. Sin embargo, posteriormente se demostró que los protocolos de purificación utilizados para aislar macrófagos o

células adherentes como la unión a cajas de Petri, a *nylon wool* o a *sephadex* G-10 son poco específicas, pues existen diversas poblaciones de linfocitos T que pueden quedarse pegadas a las células que se unían a estos materiales [248]. En otros experimentos se determinó que la población no adherente también era capaz de inducir la supresión [220], y se demostró que células enriquecidas en linfocitos T estaban igualmente suprimidas [201] demostrando que la presencia de macrófagos es dispensable para la supresión. La propuesta de que los macrófagos sean las células mediadoras de la supresión parece ser en realidad consecuencia de problemas metodológicos inherentes a la época en que se realizaron estos estudios.

Una vez determinado que las células T_{reg} eran la población encargada de modular la inmunosupresión quedaba por averiguar el mecanismo de supresión utilizado por las mismas. Lo primero que evaluamos fue si existía alguna relación entre estas células y las moléculas que se describieron como moduladoras de la supresión: los NRI, la IL-10 y la IL-2 [106, 217, 220-223]. Reportes anteriores habían descrito que los NRI producidos por los macrófagos se incrementan durante la infección con *T. gondii* y que la neutralización de dicha molécula lleva a una reversión parcial de la supresión [83, 220, 224]. En nuestros experimentos no observamos que los NRI se incrementaran después de la infección y la eliminación de T_{regs} en el cultivo tampoco modificó la producción de los mismos. Esta observación fue inesperada, ya que los NRI son un factor mencionado de manera recurrente en los estudios de la inmunosupresión durante la infección con *T. gondii* pero también con otros parásitos [83, 202, 204, 210, 213, 220, 224]. Sin embargo, al analizar detalladamente la literatura, encontramos que el incremento de los NRI en SN de cultivo se relaciona con la densidad celular de los cultivos. Haque et al. demostraron que la cantidad de NRI se incrementa con la densidad celular utilizada en los experimentos. Es probable que en modelos de alta densidad celular los NRI participen en la supresión, sin embargo, esto no ocurre en sistemas donde se usan cultivos con baja concentración celular ($\leq 2 \times 10^6$ células/cm²) [220]; nuestros datos concuerdan con este reporte, ya que también utilizamos cultivos con baja densidad celular (1×10^6 células/cm²). Además, ratones IRF^{-/-} que son incapaces de producir NRI muestran el mismo periodo de inmunosupresión que ratones normales después de ser infectados con *T. gondii*, demostrando que los NRI no inducen la supresión.

Existen diferentes reportes que indican que la IL-10 participa en la inmunosupresión, pues se ha demostrado que durante este periodo existe un incremento en la producción de esta citocina [219-221, 223]. No obstante, el verdadero papel de la IL-10 ha sido controvertido, pues por un lado algunos reportes indican que la neutralización de IL-10 induce la reversión parcial de la supresión y depende del día de la infección en que se administre [220, 221, 226], pero por el otro los ratones IL-10^{-/-} infectados con el parásito están inmunosuprimidos al igual que los ratones normales [83]. Nosotros encontramos que las células T_{reg} incrementan su producción de IL-10 durante la infección y que al eliminar las T_{regs} se reduce la acumulación de esta citocina en cultivo, lo cual sugería que la IL-10 producida por las T_{regs} podría inducir la inmunosupresión. Sin embargo, al neutralizar la IL-10 en cultivo con un mAb no se revirtió la supresión, lo cual demuestra que la IL-10 no es el mecanismo utilizado por las T_{regs} para mediar la supresión y concuerda con la inmunosupresión observada en los ratones IL-10^{-/-} infectados [83].

Finalmente, evaluamos la posibilidad de que las células T_{reg} modularan la supresión a través de un mecanismo dependiente de IL-2. Chan et al, ya habían propuesto que la inmunosupresión observada durante la infección con *T. gondii* se debía a un defecto que adquirirían los linfocitos T durante la infección aguda que los incapacitaba para producir IL-2, ya que la adición exógena de esta citocina incrementaba notablemente la proliferación de los linfocitos T obtenidos de animales infectados [201]; el mismo efecto se observó en linfocitos T CD4⁺ [219]. Nuestros análisis confirman que durante la infección aguda hay una reducción >60% en la producción de IL-2 [197, 201, 220, 221] y demuestran que la adición exógena de esta citocina induce la recuperación total de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, demostrando que la inmunosupresión ocurre como consecuencia de la falta de disponibilidad de IL-2.

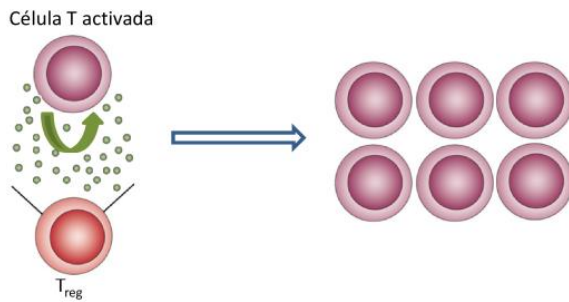
Nuestros datos muestran que existen dos maneras de revertir la inmunosupresión: eliminando las células T_{reg} y agregando rIL-2 a los cultivos celulares. Por lo tanto, este fenómeno es consecuencia de la falta de IL-2 pero es modulado por las células T_{reg}. Esta observación nos lleva a proponer que el mecanismo utilizado por las T_{regs} para inducir la inmunosupresión es la privación de IL-2. Nuestros resultados muestran que al eliminar las células T_{reg} se recupera la proliferación pero no la acumulación de IL-2, sugiriendo que la poca IL-2 disponible puede ser consumida por el resto de los linfocitos T en lugar de las T_{regs} (Fig. 23).

También encontramos que la capacidad de producir IL-2 a niveles normales no se recupera después de la eliminación de las T_{regs} , sugiriendo que estas células no son las responsables de inhibir la producción de dicha citocina, lo cual concuerda con datos previamente reportados que indican que las células T_{reg} no modulan la expresión del mRNA de IL-2, ni la producción de dicha citocina por células T_{conv} [153]. Reportes recientes indican que las células T_{reg} son capaces de “engullir” más IL-2 que las células T_{conv} , particularmente cuando están activadas y que el resultado de la privación de IL-2 es la muerte celular de las células T_{conv} . Los resultados aquí presentados concuerdan con estas observaciones, ya que después de la infección las células T_{reg} se encuentran activadas y la adición exógena de rIL-2 favorece la viabilidad celular. Finalmente, nuestros datos concuerdan con un modelo matemático reportado recientemente donde los autores predicen que la privación de IL-2 por parte de las T_{regs} ocurre en sistemas donde hay baja disponibilidad de IL-2 [249]. Todo esto nos lleva a proponer que la falta de IL-2 propicia un ambiente que favorece la competencia por dicha citocina entre T_{regs} y T_{conv} ; en nuestro modelo de infección las células T_{reg} ganan esta competencia y por lo tanto, se observa la inmunosupresión (Fig. 23). Resulta interesante que recientemente Berreta et al. propusieron que el consumo de IL-2 por T_{regs} podría estar relacionado con la supresión observada durante la infección con *P. chabaudi* [176].

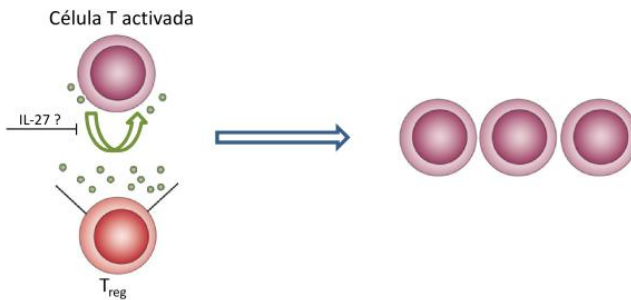
Nosotros creemos que la inmunosupresión es un intento por parte del sistema inmune para controlar la respuesta inmune inducida por la infección, lo cual concuerda con la gran cantidad de células y moléculas inmunomoduladoras observadas en esta fase de la infección. Recientemente, se reportó que durante la infección aguda con *T. gondii* la producción de IL-2 es modulada por la IL-27. Se ha sugerido que la IL-27 es producida por las mismas células APC productoras de IL-12 con el objetivo de reducir la excesiva respuesta tipo T_{H1} [250]. Estos datos apoyan la idea de que las células T_{reg} no están involucradas en la modulación de la producción de IL-2. En nuestros experimentos eliminamos únicamente a las células T_{reg} , por lo que las células productoras de IL-27 podrían haber quedado en el cultivo inhibiendo la producción de IL-2, propiciando un ambiente de competencia entre las T_{regs} y el resto de las células T que tiene como consecuencia la inmunosupresión. Este modelo explicaría por qué al eliminar las T_{regs} observamos una

recuperación de la proliferación pero no de la producción de IL-2 y también por qué al agregar rIL-2 exógena se observa una recuperación de la proliferación a pesar de la presencia de las T_{regs} en el cultivo (Fig. 23).

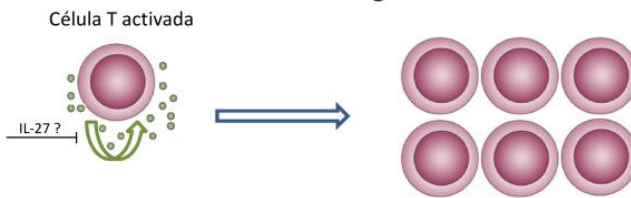
Ratón normal



Ratón Infectado



Ratón Infectado sin T_{regs}



Ratón Infectado con rIL-2 exógena

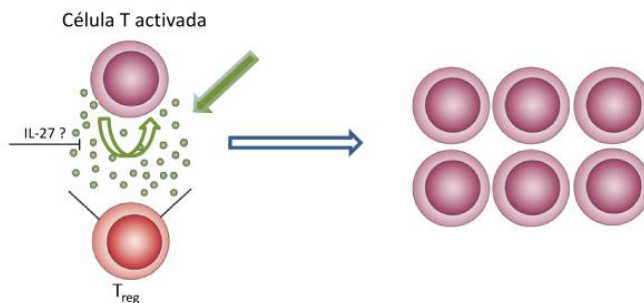


Figura 23 Modelo de la privación de IL-2 como mecanismo supresor de las células T_{reg} durante la inmunosupresión.

La inmunosupresión es un fenómeno en que los linfocitos T de animales infectados con *T. gondii* pierden la capacidad de proliferar *in vitro* en respuesta a estímulos mitogénicos y antigénicos. Nuestros experimentos muestran que la eliminación *ex vivo* de T_{regs} por FACS antes de la estimulación revierte la supresión, demostrando que las células T_{reg} son las encargadas de modular la inmunosupresión. También encontramos que la inmunosupresión se revierte al agregar IL-2 exógena al cultivo. Estos experimentos sugieren que el mecanismo utilizado por las células T_{reg} para modular la supresión es la privación de IL-2. Nosotros proponemos que al eliminar selectivamente las T_{regs} la poca IL-2 disponible puede ser consumida por el resto de los linfocitos T permitiéndoles proliferar; cuando agregamos IL-2 exógena hay suficiente IL-2 para ser consumida tanto por las T_{regs} como por el resto de los linfocitos T permitiéndoles proliferar.

La depleción con el mAb anti-CD25 es una herramienta utilizada comúnmente para eliminar las células T_{reg} . Nosotros implementamos este sistema porque nos interesaba evaluar si al eliminar esta población *in vivo* se revertía la inmunosupresión. Al estandarizar la depleción utilizamos una única dosis dos días antes de la infección con una concentración baja de mAb (200 μ g) con el objetivo de reducir la probabilidad de eliminar los linfocitos T_{conv} que se activan durante la infección. Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con el mAb en ratones C57BL/6J revertía la supresión, sin embargo, el análisis detallado de la población $CD4^+$ demostró que el tratamiento con el mAb antes de la infección elimina principalmente células T_{conv} , por lo que era imposible determinar si las células T_{reg} inducían la inmunosupresión utilizando este enfoque metodológico. Paralelamente analizamos el efecto de la depleción/infección en un modelo resistente a la infección con *T. gondii* y encontramos que la depleción con el mAb anti-CD25 reduce la sobrevivencia de los ratones a la infección. Nuestros datos muestran que el tratamiento con el mAb elimina principalmente la población de células T_{reg} , pero permite la generación de células T_{conv} causando un desbalance entre dichas poblaciones. Estos datos sugieren fuertemente que las células T_{reg} son importantes para la resistencia a la infección con este parásito, sin embargo, es indispensable utilizar un modelo de eliminación específica de T_{regs} para corroborar estos resultados.

Resulta interesante que el mismo protocolo de depleción tenga un efecto tan contrastante en los modelos de resistencia y susceptibilidad a la infección con *T. gondii*, análisis más detallados de las poblaciones afectadas por el mAb demostraron que en el caso de los ratones BALB/c la población que se elimina principalmente es la de las células T_{reg} mientras que en los ratones C57BL/6J el tratamiento elimina otras poblaciones activadas, principalmente células NK. La posibilidad de eliminar otras poblaciones celulares además de las células T_{reg} al depletar con el mAb anti-CD25 ya había sido considerada por diversos autores y existes reportes con diversos protocolos para evitar en lo posible la eliminación de células T_{conv} activadas. Por ejemplo, en el modelo de *P. berghei*, Amante implementó una estrategia de depleción con inyección del mAb anti-CD25 tres semanas antes de la infección con el objetivo de eliminar a las células T_{reg} y evitar que el mAb circulara en el animal para el día de la infección [184]. En este mismo modelo Viagrio et al. depletan los animales con una dosis baja de anticuerpo (300 μ g) 30 días y un día antes de la infección [177]. En el

modelo de infección con *T. congolense* Wei et al. demuestran que inyectar una sola dosis de 45 μg 2 días antes de la infección es suficiente para eliminar solamente la población $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$, que supuestamente es la más enriquecida en células Foxp3^+ [175]. Estos autores y algunos otros discuten la importancia de recordar que el tratamiento con el mAb anti CD25 en modelos infecciosos no es específico de T_{regs} , pues podría eliminar también otras poblaciones de linfocitos T activados y que esto no debe de obviarse al momento de interpretar los resultados [185, 186, 195, 205]. Sin embargo, existe un gran número de reportes donde a pesar de utilizar grandes cantidades de mAb ($\geq 1\text{mg}$) y varias inyecciones antes y durante la infección, los autores concluyen que el efecto observado es consecuencia de la eliminación específica de células T_{reg} ; un problema semejante ocurre en reportes donde se inyecta a los animales con mAbs anti-GITR o anti-CTLA-4 [194, 237, 251-254]. Los experimentos aquí presentados son los primeros en describir el efecto de la depleción en la población de células T_{reg} y en otras poblaciones de células activadas durante el transcurso de una infección. Nuestros datos demuestran que cada modelo experimental debe ser evaluado cuidadosamente para determinar si la eliminación de células CD25^+ será realmente indicativa del papel de las células T_{reg} durante la infección e ilustran perfectamente que para la interpretación adecuada de los datos obtenidos con depleciones con mAb anti-CD25 es necesaria una evaluación exhaustiva de cada modelo.

En resumen, los estudios presentados en este trabajo dan un panorama amplio y detallado de lo que ocurre en la población de células T_{reg} durante la infección aguda con el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*. Además de esta caracterización, demostramos que esta población celular modula la inmunosupresión, un fenómeno cuyo mecanismo permaneció como un misterio por más de 30 años. Demostramos también que las células T_{reg} modulan este proceso independientemente de la IL-10 pero que es consecuencia de la falta de IL-2, lo cual sugiere que el mecanismo utilizado por estas células es la privación de dicha citocina. Nuestros resultados muestran por primera vez que las células T_{reg} participan en el periodo de inmunosupresión y sugieren que estas células son importantes para la resistencia a la infección. Estos datos contribuyen ampliamente al conocimiento de la inmunomodulación en la infección con *T. gondii* y demuestran que la clave de un proceso inmune exitoso depende del balance correcto entre la activación y supresión del mismo.

VII. Conclusiones

La hipótesis propuesta originalmente se confirmó, ya que:

Las células T reguladoras son responsables de la inmunosupresión observada durante la infección aguda con *T. gondii*.

En el proceso de confirmar esta hipótesis se cumplieron con todos los objetivos propuestos y encontramos que:

- Las poblaciones afectadas durante la inmunosupresión son los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ pero no los linfocitos B.
- La cinética e intensidad de la inmunosupresión depende de la susceptibilidad de la cepa de ratón que se analice.
- Durante la infección aguda se observa una reducción en el porcentaje y número de células T_{reg}.
- Durante la infección aguda, las células T_{reg} restantes se activan e incrementan su capacidad supresora.
- Las células T_{reg} modulan la inmunosupresión observada durante la infección aguda con *T. gondii*.
- La inmunosupresión es consecuencia de la falta de IL-2 pero es modulada por las células T_{reg}.
- El mecanismo que utilizan las células T_{reg} es independiente de IL-10 y de NRI.
- Las células T_{reg} modulan la inmunosupresión a través de un mecanismo dependiente de IL-2, probablemente por privación de la misma.
- El análisis de las células T_{reg} utilizando sistemas de depleción con el mAb anti-CD25 debe ser interpretado cuidadosamente.
- El tratamiento con el mAb anti-CD25 antes de la infección en animales C57BL/6J elimina principalmente poblaciones de linfocitos activados como NK, B, CD4⁺ y CD8⁺ pero no T_{regs}.
- La depleción con anti-CD25 antes de la infección en ratones de la cepa BALB/c elimina principalmente células T_{reg}.
- El mAb anti CD25 como herramienta de depleción de células T_{reg} para el estudio de estas células durante la infección con *T. gondii* es útil únicamente en el modelo de la cepa BALB/c.
- Los animales BALB/c depletados con el mAb anti-CD25 son menos resistentes a la infección con *T. gondii*. Sugiriendo que las células T_{reg} son importantes para la protección.

VIII. Perspectivas

- Evaluar el papel de la IL-27 durante el periodo de inmunosupresión.
- Confirmar con un sistema de eliminación específico de T_{reg} *in vivo* si al eliminar dichas células desde el principio de la infección la inmunosupresión se revierte.
- Confirmar que las células T_{reg} compiten con las células T_{act} por la IL-2.
- Demostrar si la inmunosupresión ocurre *in vivo* y evaluar si es modulada por las mismas células y moléculas involucradas en el modelo *in vitro*.
- Evaluar si los mecanismos que modulan la inmunosupresión en la cepa susceptible son los mismos en la cepa resistente.
- Determinar si las células T_{reg} también modulan la inmunosupresión observada durante otras infecciones parasitarias.
- Determinar cuáles moléculas de *T. gondii* activan a las células T_{reg} y evaluar sus posibilidades terapéuticas.

IX. Referencias

1. Nicolle, C. and Manceaux, L. H. **On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. 1908.** *Int J Parasitol.* 2009. 39: 863-864.
2. Splendor, A. **A new protozoan parasite in rabbits.** *Int J Parasitol.* 2009. 39: 861-862.
3. Morrisette, N. S. and Ajioka, J. W. **The early years of Toxoplasma research: What's past is prologue.** *Int J Parasitol.* 2009. 39: 865-869.
4. Dubey, J. P. **The history of Toxoplasma gondii--the first 100 years.** *J Eukaryot Microbiol.* 2008. 55: 467-475.
5. Innes, E. A. **A brief history and overview of Toxoplasma gondii.** *Zoonoses Public Health.* 2010. 57: 1-7.
6. Ho-Yen, D. O., **Infection in the immunocompetent.** In *Toxoplasmosis. a comprehensive clinical guide.* Cambridge : Cambridge University Press., 2001, pp 125-146.
7. Joynton D.H.M. and Wreghitt T.G., **Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide.** Cambridge University Press, 2001.
8. Mariuz, P. and Steigbigel, R. T., **Toxoplasma infection in HIV-infected patients.** In *Toxoplasmosis. a comprehensive clinical guide.* Cambridge : Cambridge University Press, 2001, pp 147-177.
9. Wreghitt T.G. and Joynton D.H.M., **Toxoplasma infection in the immunosuppressed (HIV-negative) patients.** In *Toxoplasmosis. a comprehensive clinical guide.* Cambridge : Cambridge University Press., 2001, pp 178-192.
10. Barratt, J. L., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T., and Stark, D. **Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people.** *Clin Microbiol Rev.* 2010. 23: 795-836.
11. Montoya, J. G. and Liesenfeld, O. **Toxoplasmosis.** *Lancet.* 2004. 363: 1965-1976.
12. Thulliez, P., **Maternal and foetal Infection.** In *Toxoplasmosis. a comprehensive clinical guide.* Cambridge : Cambridge University Press., 2001, pp 193-213.
13. Montoya, J. G. and Remington, J. S. **Management of Toxoplasma gondii infection during pregnancy.** *Clin Infect Dis.* 2008. 47: 554-566.
14. Elbez-Rubinstein, A., Ajzenberg, D., Darde, M. L., Cohen, R., Dumetre, A., Yera, H., Gondon, E., Janaud, J. C., and Thulliez, P. **Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review.** *J Infect Dis.* 2009. 199: 280-285.
15. Weiss, L. M. and Dubey, J. P. **Toxoplasmosis: A history of clinical observations.** *Int J Parasitol.* 2009. 39: 895-901.
16. Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M. E. **Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis.** *Int J Parasitol.* 2009. 39: 1385-1394.
17. Roch, E. and Varela, G. **Diversos aspectos de la investigación sobre toxoplasmosis en México. Resultados de 29 883 reacciones de Sabin y Feldman efectuados de 1953 a 1965.** *Rev Invest Salud Publica.* 1966. 26: 31-49.

18. Velasco-Castrejon, O., Salvatierra-Izaba, B., Valdespino, J. L., Sedano-Lara, A. M., Galindo-Virgen, S., Magos, C., Llausas, A., Tapia-Conyer, R., Gutierrez, G., and Sepulveda, J. **Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México.** *Salud Publica Mex.* 1992. 34: 222-229.
19. Dubey, J. P., Lindsay, D. S., and Speer, C. A. **Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.** *Clin Microbiol Rev.* 1998. 11: 267-299.
20. Petersen, E. and Dubey, J. P., **Biology of Toxoplasmosis.** In *Toxoplasmosis. a comprehensive clinical guide.* Cambridge : Cambridge University Press., 2001, pp 1-42.
21. Lyons, R. E., McLeod, R., and Roberts, C. W. ***Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion.** *Trends Parasitol.* 2002. 18: 198-201.
22. Jackson, M. H. and Hutchison, W. M. **The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment.** *Adv Parasitol.* 1989. 28: 55-105.
23. Dubey, J. P. **History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*.** *Int J Parasitol.* 2009. 39: 877-882.
24. Ferguson, D. J. **Identification of faecal transmission of *Toxoplasma gondii*: Small science, large characters.** *Int J Parasitol.* 2009. 39: 871-875.
25. Luo, S., Vieira, M., Graves, J., Zhong, L., and Moreno, S. N. **A plasma membrane-type Ca²⁺-ATPase co-localizes with a vacuolar H⁺-pyrophosphatase to acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*.** *EMBO J.* 2001. 20: 55-64.
26. Dubey, J. P. **Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*.** *Int J Parasitol.* 1998. 28: 1019-1024.
27. Ferguson, D. J. ***Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra?** *Trends Parasitol.* 2002. 18: 355-359.
28. Gazzinelli, R. T., Hieny, S., Wynn, T. A., Wolf, S., and Sher, A. **Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993. 90: 6115-6119.
29. Gazzinelli, R. T., Wyszocka, M., Hayashi, S., Denkers, E. Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., and Sher, A. **Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*.** *J Immunol.* 1994. 153: 2533-2543.
30. Reis e Sousa, Hieny, S., Schariton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N., and Sher, A. **In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas.** *J Exp Med.* 1997. 186: 1819-1829.
31. Bliss, S. K., Butcher, B. A., and Denkers, E. Y. **Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection.** *J Immunol.* 2000. 165: 4515-4521.
32. Denkers, E. Y. **From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003. 39: 193-203.
33. Liu, C. H., Fan, Y. T., Dias, A., Esper, L., Corn, R. A., Bafica, A., Machado, F. S., and Aliberti, J. **Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice.** *J Immunol.* 2006. 177: 31-35.
34. Aliberti, J., Reis e Sousa, Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G. B., and Sher, A. **CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 α^+ dendritic cells.** *Nat Immunol.* 2000. 1: 83-87.

35. Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., and Sher, A. **TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein.** *Science*. 2005. 308: 1626-1629.
36. Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M. F., Sher, A., and Soldati-Favre, D. **Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response.** *Cell Host Microbe*. 2008. 3: 77-87.
37. Hunter, C. A., Subauste, C. S., Van Cleave, V. H., and Remington, J. S. **Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha.** *Infect Immun*. 1994. 62: 2818-2824.
38. Hunter, C. A., Candolfi, E., Subauste, C., Van, C., V, and Remington, J. S. **Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis.** *Immunology*. 1995. 84: 16-20.
39. Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., and Remington, J. S. **Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*.** *Science*. 1988. 240: 516-518.
40. Suzuki, Y., Conley, F. K., and Remington, J. S. **Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice.** *J Immunol*. 1989. 143: 2045-2050.
41. Gazzinelli, R. T., Amichay, D., Sharton-Kersten, T., Grunwald, E., Farber, J. M., and Sher, A. **Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*.** *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996. 219: 127-139.
42. Lykens, J. E., Terrell, C. E., Zoller, E. E., Divanovic, S., Trompette, A., Karp, C. L., Aliberti, J., Flick, M. J., and Jordan, M. B. **Mice with a selective impairment of IFN- γ signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN- γ -activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections *in vivo*.** *J Immunol*. 2010. 184: 877-885.
43. Langermans, J. A., Van der Hulst, M. E., Nibbering, P. H., Hiemstra, P. S., Fransen, L., and Van, F. R. **IFN- γ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α .** *J Immunol*. 1992. 148: 568-574.
44. Gazzinelli, R. T., Eltoun, I., Wynn, T. A., and Sher, A. **Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF- α and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation.** *J Immunol*. 1993. 151: 3672-3681.
45. Sibley, L. D., Adams, L. B., Fukutomi, Y., and Krahenbuhl, J. L. **Tumor necrosis factor- α triggers antitoxoplasmal activity of IFN- γ primed macrophages.** *J Immunol*. 1991. 147: 2340-2345.
46. Shrestha, S. P., Tomita, T., Weiss, L. M., and Orlofsky, A. **Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages *in vivo* is associated with diminished oxygen radical production in the host cell.** *Int J Parasitol*. 2006. 36: 433-441.
47. Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M. C., Goubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S., and Ricquier, D. **Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production.** *Nat Genet*. 2000. 26: 435-439.
48. Murray, H. W., Juangbhanich, C. W., Nathan, C. F., and Cohn, Z. A. **Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates.** *J Exp Med*. 1979. 150: 950-964.
49. Butcher, B. A., Greene, R. I., Henry, S. C., Annecharico, K. L., Weinberg, J. B., Denkers, E. Y., Sher, A., and Taylor, G. A. **p47 GTPases regulate *Toxoplasma gondii* survival in activated macrophages.** *Infect Immun*. 2005. 73: 3278-3286.

50. Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G., and Howard, J. C. **Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases.** *PLoS Pathog.* 2005. 1: e24.
51. Pfefferkorn, E. R. **Interferon- γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984. 81: 908-912.
52. Fujigaki, S., Takemura, M., Hamakawa, H., Seishima, M., and Saito, K. **The mechanism of interferon-gamma induced anti *Toxoplasma gondii* by indoleamine 2,3-dioxygenase and/or inducible nitric oxide synthase vary among tissues.** *Adv Exp Med Biol.* 2003. 527: 97-103.
53. MacKenzie, C. R., Heseler, K., Muller, A., and Daubener, W. **Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines.** *Curr Drug Metab.* 2007. 8: 237-244.
54. Andrade, R. M., Wessendarp, M., Portillo, J. A., Yang, J. Q., Gomez, F. J., Durbin, J. E., Bishop, G. A., and Subauste, C. S. **TNF receptor-associated factor 6-dependent CD40 signaling primes macrophages to acquire antimicrobial activity in response to TNF-alpha.** *J Immunol.* 2005. 175: 6014-6021.
55. Andrade, R. M., Portillo, J. A., Wessendarp, M., and Subauste, C. S. **CD40 signaling in macrophages induces activity against an intracellular pathogen independently of gamma interferon and reactive nitrogen intermediates.** *Infect Immun.* 2005. 73: 3115-3123.
56. Andrade, R. M., Wessendarp, M., Gubbels, M. J., Striepen, B., and Subauste, C. S. **CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes.** *J Clin Invest.* 2006. 116: 2366-2377.
57. Subauste, C. S. and Wessendarp, M. **CD40 restrains in vivo growth of *Toxoplasma gondii* independently of gamma interferon.** *Infect Immun.* 2006. 74: 1573-1579.
58. Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., and Sher, A. **Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*.** *J Immunol.* 1992. 149: 175-180.
59. Beaman, M. H., Araujo, F. G., and Remington, J. S. **Protective reconstitution of the SCID mouse against reactivation of toxoplasmic encephalitis.** *J Infect Dis.* 1994. 169: 375-383.
60. Suzuki, Y. and Remington, J. S. **Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2⁺ and Lyt-1⁺, L3T4⁺ T cells in mice.** *J Immunol.* 1988. 140: 3943-3946.
61. Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. **Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine.** *J Immunol.* 1991. 146: 286-292.
62. Suzuki, Y. and Remington, J. S. **The effect of anti-IFN- γ antibody on the protective effect of Lyt-2⁺ immune T cells against toxoplasmosis in mice.** *J Immunol.* 1990. 144: 1954-1956.
63. Shirahata, T., Yamashita, T., Ohta, C., Goto, H., and Nakane, A. **CD8⁺ T lymphocytes are the major cell population involved in the early gamma interferon response and resistance to acute primary *Toxoplasma gondii* infection in mice.** *Microbiol Immunol.* 1994. 38: 789-796.
64. Casciotti, L., Ely, K. H., Williams, M. E., and Khan, I. A. **CD8⁺-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4⁺ T cells.** *Infect Immun.* 2002. 70: 434-443.

65. Lutjen, S., Soltek, S., Virna, S., Deckert, M., and Schluter, D. **Organ- and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells.** *Infect Immun.* 2006. 74: 5790-5801.
66. Hakim, F. T., Gazzinelli, R. T., Denkers, E., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. **CD8⁺ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells.** *J Immunol.* 1991. 147: 2310-2316.
67. Subauste, C. S., Koniaris, A. H., and Remington, J. S. **Murine CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells.** *J Immunol.* 1991. 147: 3955-3959.
68. Blanchard, N., Gonzalez, F., Schaeffer, M., Joncker, N. T., Cheng, T., Shastri, A. J., Robey, E. A., and Shastri, N. **Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum.** *Nat Immunol.* 2008. 9: 937-944.
69. Goldszmid, R. S., Coppens, I., Lev, A., Caspar, P., Mellman, I., and Sher, A. **Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells.** *J Exp Med.* 2009. 206: 399-410.
70. Hunter, C. A., Bermudez, L., Beernink, H., Waegell, W., and Remington, J. S. **Transforming growth factor- β inhibits interleukin-12-induced production of interferon- γ by natural killer cells: a role for transforming growth factor- β in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*.** *Eur J Immunol.* 1995. 25: 994-1000.
71. Bermudez, L. E., Covaro, G., and Remington, J. **Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors.** *Infect Immun.* 1993. 61: 4126-4130.
72. Langermans, J. A., Nibbering, P. H., Van Vuren-Van Der Hulst ME, and Van, F. R. **Transforming growth factor-beta suppresses interferon-gamma-induced toxoplasmastatic activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor-alpha production.** *Parasite Immunol.* 2001. 23: 169-175.
73. D'Angelillo, A., De, L. E., Romano, S., Bisogni, R., Buffolano, W., Gargano, N., Del, P. P., Del, V. L., Petersen, E., and Romano, M. F. ***Toxoplasma gondii* Dense Granule Antigen 1 stimulates apoptosis of monocytes through autocrine TGF-beta signaling.** *Apoptosis.* 2011. 16: 551-562.
74. Seabra, S. H., de, S. W., and Damatta, R. A. ***Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2004. 324: 744-752.
75. Buzoni-Gatel, D., Debbabi, H., Mennechet, F. J., Martin, V., Lepage, A. C., Schwartzman, J. D., and Kasper, L. H. **Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes.** *Gastroenterology.* 2001. 120: 914-924.
76. Mennechet, F. J., Kasper, L. H., Rachinel, N., Minns, L. A., Luangsay, S., Vandewalle, A., and Buzoni-Gatel, D. **Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4⁺ T cells.** *Eur J Immunol.* 2004. 34: 1059-1067.
77. Luangsay, S., Kasper, L. H., Rachinel, N., Minns, L. A., Mennechet, F. J., Vandewalle, A., and Buzoni-Gatel, D. **CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*-primed CD8 lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells.** *Gastroenterology.* 2003. 125: 491-500.
78. Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L., and Sher, A. **IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages.** *J Immunol.* 1992. 148: 1792-1796.

79. Lang, C., Gross, U., and Luder, C. G. **Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii***. *Parasitol Res.* 2007. 100: 191-203.
80. Wille, U., Nishi, M., Lieberman, L., Wilson, E. H., Roos, D. S., and Hunter, C. A. **IL-10 is not required to prevent immune hyperactivity during memory responses to *Toxoplasma gondii***. *Parasite Immunol.* 2004. 26: 229-236.
81. Wilson, E. H., Wille-Reece, U., Dzierszynski, F., and Hunter, C. A. **A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis**. *J Neuroimmunol.* 2005. 165: 63-74.
82. Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. **In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α** . *J Immunol.* 1996. 157: 798-805.
83. Neyer, L. E., Grunig, G., Fort, M., Remington, J. S., Rennick, D., and Hunter, C. A. **Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii***. *Infect Immun.* 1997. 65: 1675-1682.
84. Suzuki, Y., Sher, A., Yap, G., Park, D., Neyer, L. E., Liesenfeld, O., Fort, M., Kang, H., and Gufwoli, E. **IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii***. *J Immunol.* 2000. 164: 5375-5382.
85. Roers, A., Siewe, L., Strittmatter, E., Deckert, M., Schluter, D., Stenzel, W., Gruber, A. D., Krieg, T., Rajewsky, K., and Muller, W. **T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation**. *J Exp Med.* 2004. 200: 1289-1297.
86. Jankovic, D., Kullberg, M. C., Feng, C. G., Goldszmid, R. S., Collazo, C. M., Wilson, M., Wynn, T. A., Kamanaka, M., Flavell, R. A., and Sher, A. **Conventional T-bet⁺Foxp3⁻ Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection**. *J Exp Med.* 2007. 204: 273-283.
87. Perona-Wright, G., Mohrs, K., Szaba, F. M., Kummer, L. W., Madan, R., Karp, C. L., Johnson, L. L., Smiley, S. T., and Mohrs, M. **Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells**. *Cell Host Microbe.* 2009. 6: 503-512.
88. Hunter, C. A., Villarino, A., Artis, D., and Scott, P. **The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections**. *Immunol Rev.* 2004. 202: 106-114.
89. Tait, E. D. and Hunter, C. A. **Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii***. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009. 104: 201-210.
90. Villarino, A., Hibbert, L., Lieberman, L., Wilson, E., Mak, T., Yoshida, H., Kastelein, R. A., Saris, C., and Hunter, C. A. **The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection**. *Immunity.* 2003. 19: 645-655.
91. Villarino, A. V., Stumhofer, J. S., Saris, C. J., Kastelein, R. A., de Sauvage, F. J., and Hunter, C. A. **IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation**. *J Immunol.* 2006. 176: 237-247.
92. Aliberti, J., Hieny, S., Reis e Sousa, Serhan, C. N., and Sher, A. **Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity**. *Nat Immunol.* 2002. 3: 76-82.
93. Aliberti, J., Serhan, C., and Sher, A. **Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection**. *J Exp Med.* 2002. 196: 1253-1262.

94. Aliberti, J. **Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*.** *Nat Rev Immunol.* 2005. 5: 162-170.
95. Sibley, L. D. and Boothroyd, J. C. **Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage.** *Nature.* 1992. 359: 82-85.
96. Su, C., Howe, D. K., Dubey, J. P., Ajioka, J. W., and Sibley, L. D. **Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. 99: 10753-10758.
97. Sibley, L. D. and Ajioka, J. W. **Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps.** *Annu Rev Microbiol.* 2008. 62: 329-351.
98. Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J. P., Darde, M. L., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., and Sibley, L. D. **Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104: 14872-14877.
99. Howe, D. K. and Sibley, L. D. ***Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease.** *J Infect Dis.* 1995. 172: 1561-1566.
100. Howe, D. K., Honore, S., Derouin, F., and Sibley, L. D. **Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis.** *J Clin Microbiol.* 1997. 35: 1411-1414.
101. Guo, Z. G., Gross, U., and Johnson, A. M. ***Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction.** *Parasitol Res.* 1997. 83: 458-463.
102. Saeij, J. P., Boyle, J. P., and Boothroyd, J. C. **Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host.** *Trends Parasitol.* 2005. 21: 476-481.
103. Araujo, F. G., Williams, D. M., Grumet, F. C., and Remington, J. S. **Strain-dependent differences in murine susceptibility to toxoplasma.** *Infect Immun.* 1976. 13: 1528-1530.
104. Williams, D. M., Grumet, F. C., and Remington, J. S. **Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*.** *Infect Immun.* 1978. 19: 416-420.
105. Suzuki, Y., Orellana, M. A., Wong, S. Y., Conley, F. K., and Remington, J. S. **Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice.** *Infect Immun.* 1993. 61: 2284-2288.
106. McLeod, R., Eisenhauer, P., Mack, D., Brown, C., Filice, G., and Spitalny, G. **Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*.** *J Immunol.* 1989. 142: 3247-3255.
107. Fux, B., Rodrigues, C. V., Portela, R. W., Silva, N. M., Su, C., Sibley, D., Vitor, R. W., and Gazzinelli, R. T. **Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*.** *Infect Immun.* 2003. 71: 6392-6401.
108. Zhou, L., Chong, M. M., and Littman, D. R. **Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation.** *Immunity.* 2009. 30: 646-655.
109. Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W. E. **Differentiation of effector CD4 T cell populations.** *Annu Rev Immunol.* 2010. 28: 445-489.
110. O'Shea, J. J. and Paul, W. E. **Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells.** *Science.* 2010. 327: 1098-1102.
111. Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. **Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural**

- self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease.** *J Exp Med.* 1985. 161: 72-87.
112. Sugihara, S., Izumi, Y., Yoshioka, T., Yagi, H., Tsujimura, T., Tarutani, O., Kohno, Y., Murakami, S., Hamaoka, T., and Fujiwara, H. **Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1^{dull} L3T4^{bright} normal T cells for the induction of thyroiditis.** *J Immunol.* 1988. 141: 105-113.
 113. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.** *J Immunol.* 1995. 155: 1151-1164.
 114. Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. **Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation.** *J Exp Med.* 1996. 184: 387-396.
 115. Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. **Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation.** *J Exp Med.* 2000. 192: 295-302.
 116. Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., and Sakaguchi, S. **Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.** *J Exp Med.* 2000. 192: 303-310.
 117. Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. **Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance.** *Nat Immunol.* 2002. 3: 135-142.
 118. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S. A., and Ramsdell, F. **An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells.** *Nat Immunol.* 2003. 4: 337-342.
 119. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. **Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.** *Nat Immunol.* 2003. 4: 330-336.
 120. Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E. I., Huizinga, T. W., and Toes, R. E. **Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells.** *Eur J Immunol.* 2007. 37: 129-138.
 121. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., and Hafler, D. A. **FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system.** *Nat Rev Immunol.* 2010. 10: 490-500.
 122. Bettelli, E., Dastrange, M., and Oukka, M. **Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. 102: 5138-5143.
 123. Curotto de Lafaille, M. A. and Lafaille, J. J. **Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?** *Immunity.* 2009. 30: 626-635.
 124. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. **Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3.** *J Exp Med.* 2003. 198: 1875-1886.
 125. Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., and Powrie, F. **A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism.** *J Exp Med.* 2007. 204: 1757-1764.
 126. Haribhai, D., Williams, J. B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E. G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S. H., Relland, L. M., Wise, P. M., Chen, A., Zheng, Y. Q., Simpson, P. M., Gorski, J., Salzman, N. H., Hessner, M. J., Chatila, T. A., and Williams, C. B. **A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity.** *Immunity.* 2011. 35: 109-122.

127. Pacholczyk, R., Kern, J., Singh, N., Iwashima, M., Kraj, P., and Ignatowicz, L. **Nonsself-antigens are the cognate specificities of Foxp3⁺ regulatory T cells.** *Immunity*. 2007. 27: 493-504.
128. Pacholczyk, R. and Kern, J. **The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells.** *Immunology*. 2008. 125: 450-458.
129. Josefowicz, S. Z. and Rudensky, A. **Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance.** *Immunity*. 2009. 30: 616-625.
130. Hori, S. **Developmental plasticity of Foxp3⁺ regulatory T cells.** *Curr Opin Immunol*. 2010. 22: 575-582.
131. Sakaguchi, S. **Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.** *Nat Immunol*. 2005. 6: 345-352.
132. Belkaid, Y. and Tarbell, K. **Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions.** *Annu Rev Immunol*. 2009. 27: 551-589.
133. Thornton, A. M. and Shevach, E. M. **CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.** *J Exp Med*. 1998. 188: 287-296.
134. Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettgenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H. **Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood.** *J Exp Med*. 2001. 193: 1285-1294.
135. Piccirillo, C. A. and Shevach, E. M. **Cutting edge: control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells.** *J Immunol*. 2001. 167: 1137-1140.
136. Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. **How regulatory T cells work.** *Nat Rev Immunol*. 2008. 8: 523-532.
137. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. **An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation.** *J Exp Med*. 1999. 190: 995-1004.
138. Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., and Geginat, J. **Biology of interleukin-10.** *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010. 21: 331-344.
139. Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K. **Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans.** *Immunol Rev*. 2006. 212: 28-50.
140. Rubtsov, Y. P. and Rudensky, A. Y. **TGF- β signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity.** *Nat Rev Immunol*. 2007. 7: 443-453.
141. Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. **Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor- β .** *J Exp Med*. 2001. 194: 629-644.
142. Randolph, D. A. and Fathman, C. G. **CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and their therapeutic potential.** *Annu Rev Med*. 2006. 57: 381-402.
143. Gorelik, L. and Flavell, R. A. **Transforming growth factor-beta in T-cell biology.** *Nat Rev Immunol*. 2002. 2: 46-53.
144. Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., and Vignali, D. A. **The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function.** *Nature*. 2007. 450: 566-569.

145. Collison, L. W., Pillai, M. R., Chaturvedi, V., and Vignali, D. A. **Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner.** *J Immunol.* 2009. 182: 6121-6128.
146. Kobie, J. J., Shah, P. R., Yang, L., Rebhahn, J. A., Fowell, D. J., and Mosmann, T. R. **T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine.** *J Immunol.* 2006. 177: 6780-6786.
147. Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., and Robson, S. C. **Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression.** *J Exp Med.* 2007. 204: 1257-1265.
148. Dwyer, K. M., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T. B., and Robson, S. C. **CD39 and control of cellular immune responses.** *Purinergic Signal.* 2007. 3: 171-180.
149. Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staeger, M. S., Stassen, M., Jonuleit, H., and Schmitt, E. **Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression.** *J Exp Med.* 2007. 204: 1303-1310.
150. de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. **Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function.** *Eur J Immunol.* 2004. 34: 2480-2488.
151. Furtado, G. C., Curotto de Lafaille, M. A., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J. J. **Interleukin 2 signaling is required for CD4⁺ regulatory T cell function.** *J Exp Med.* 2002. 196: 851-857.
152. Barthlott, T., Moncrieffe, H., Veldhoen, M., Atkins, C. J., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. **CD25⁺ CD4⁺ T cells compete with naive CD4⁺ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production.** *Int Immunol.* 2005. 17: 279-288.
153. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M. J. **CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells.** *Nat Immunol.* 2007. 8: 1353-1362.
154. Tadokoro, C. E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A. C., Maraver, A., Lafaille, J. J., and Dustin, M. L. **Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo.** *J Exp Med.* 2006. 203: 505-511.
155. Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D., and Kaveri, S. V. **Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells.** *J Immunol.* 2004. 172: 4676-4680.
156. Taams, L. S., van Amelsfort, J. M., Tiemessen, M. M., Jacobs, K. M., de Jong, E. C., Akbar, A. N., Bijlsma, J. W., and Lafeber, F. P. **Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.** *Hum Immunol.* 2005. 66: 222-230.
157. Houot, R., Perrot, I., Garcia, E., Durand, I., and Lebecque, S. **Human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation.** *J Immunol.* 2006. 176: 5293-5298.
158. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. **CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function.** *Science.* 2008. 322: 271-275.
159. Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Futter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S., and Sansom, D. M. **Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4.** *Science.* 2011. 332: 600-603.

160. Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., and Puccetti, P. **Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.** *Nat Immunol.* 2003. 4: 1206-1212.
161. Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., and Noelle, R. J. **Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism.** *J Immunol.* 2005. 174: 1783-1786.
162. Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnicka-Worms, D. R., and Ley, T. J. **Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance.** *Immunity.* 2007. 27: 635-646.
163. Strauss, L., Bergmann, C., and Whiteside, T. L. **Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis.** *J Immunol.* 2009. 182: 1469-1480.
164. Paust, S., Lu, L., McCarty, N., and Cantor, H. **Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. 101: 10398-10403.
165. Feuerer, M., Hill, J. A., Mathis, D., and Benoist, C. **Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes.** *Nat Immunol.* 2009. 10: 689-695.
166. Aseffa, A., Gumy, A., Launois, P., MacDonald, H. R., Louis, J. A., and Tacchini-Cottier, F. **The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells.** *J Immunol.* 2002. 169: 3232-3241.
167. Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L. **CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity.** *Nature.* 2002. 420: 502-507.
168. Suffia, I., Reckling, S. K., Salay, G., and Belkaid, Y. **A role for CD103 in the retention of CD4⁺CD25⁺ Treg and control of *Leishmania major* infection.** *J Immunol.* 2005. 174: 5444-5455.
169. Yurchenko, E., Tritt, M., Hay, V., Shevach, E. M., Belkaid, Y., and Piccirillo, C. A. **CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence.** *J Exp Med.* 2006. 203: 2451-2460.
170. Mendez, S., Reckling, S. K., Piccirillo, C. A., Sacks, D., and Belkaid, Y. **Role for CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity.** *J Exp Med.* 2004. 200: 201-210.
171. Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J., and Sacks, D. **CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis.** *J Exp Med.* 2007. 204: 285-297.
172. Kautz-Neu, K., Noordegraaf, M., Dinges, S., Bennett, C. L., John, D., Clausen, B. E., and von, S. E. **Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response.** *J Exp Med.* 2011. 208: 885-891.
173. Guilliams, M., Oldenhove, G., Noel, W., Herin, M., Brys, L., Loi, P., Flamand, V., Moser, M., De Baetselier, P., and Beschin, A. **African trypanosomiasis: naturally occurring regulatory T cells favor trypanotolerance by limiting pathology associated with sustained type 1 inflammation.** *J Immunol.* 2007. 179: 2748-2757.
174. Guilliams, M., Bosschaerts, T., Herin, M., Hunig, T., Loi, P., Flamand, V., De Baetselier, P., and Beschin, A. **Experimental expansion of the regulatory T cell population increases resistance to African trypanosomiasis.** *J Infect Dis.* 2008. 198: 781-791.

175. Wei, G. and Tabel, H. **Regulatory T cells prevent control of experimental African trypanosomiasis.** *J Immunol.* 2008. 180: 2514-2521.
176. Berretta, F., St-Pierre, J., Piccirillo, C. A., and Stevenson, M. M. **IL-2 contributes to maintaining a balance between CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and effector CD4⁺ T cells required for immune control of blood-stage malaria infection.** *J Immunol.* 2011. 186: 4862-4871.
177. Vigario, A. M., Gorgette, O., Dujardin, H. C., Cruz, T., Cazenave, P. A., Six, A., Bandeira, A., and Pied, S. **Regulatory CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells expand during experimental *Plasmodium* infection but do not prevent cerebral malaria.** *Int J Parasitol.* 2007. 37: 963-973.
178. Couper, K. N., Blount, D. G., Wilson, M. S., Hafalla, J. C., Belkaid, Y., Kamanaka, M., Flavell, R. A., de Souza, J. B., and Riley, E. M. **IL-10 from CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁻ adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection.** *PLoS Pathog.* 2008. 4: e1000004.
179. Steeg, C., Adler, G., Sparwasser, T., Fleischer, B., and Jacobs, T. **Limited role of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the control of experimental cerebral malaria.** *J Immunol.* 2009. 183: 7014-7022.
180. Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K. J., Coban, C., Akira, S., Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., and Himeno, K. **Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells.** *J Immunol.* 2008. 180: 2496-2503.
181. Haque, A., Best, S. E., Amante, F. H., Mustafah, S., Desbarrieres, L., de, L. F., Sparwasser, T., Hill, G. R., and Engwerda, C. R. **CD4⁺ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo.** *PLoS Pathog.* 2010. 6: e1001221.
182. Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. **Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurvy-like disease.** *J Exp Med.* 2007. 204: 57-63.
183. Kim, J. M., Rasmussen, J. P., and Rudensky, A. Y. **Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice.** *Nat Immunol.* 2007. 8: 191-197.
184. Amante, F. H., Stanley, A. C., Randall, L. M., Zhou, Y., Haque, A., McSweeney, K., Waters, A. P., Janse, C. J., Good, M. F., Hill, G. R., and Engwerda, C. R. **A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria.** *Am J Pathol.* 2007. 171: 548-559.
185. Beiting, D. P., Gagliardo, L. F., Hesse, M., Bliss, S. K., Meskill, D., and Appleton, J. A. **Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF- β .** *J Immunol.* 2007. 178: 1039-1047.
186. Taylor, J. J., Mohrs, M., and Pearce, E. J. **Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population.** *J Immunol.* 2006. 176: 5839-5847.
187. Watanabe, K., Carter, J. M., Neely-Burnam, M., and Colley, D. G. **Relative imbalance between T regulatory cells and activated T cells in mice with differential morbidity in chronic *Schistosoma mansoni* infections.** *Parasite Immunol.* 2009. 31: 440-446.
188. McSorley, H. J., Harcus, Y. M., Murray, J., Taylor, M. D., and Maizels, R. M. **Expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*.** *J Immunol.* 2008. 181: 6456-6466.
189. Gillan, V. and Devaney, E. **Regulatory T cells modulate Th2 responses induced by *Brugia pahangi* third-stage larvae.** *Infect Immun.* 2005. 73: 4034-4042.

190. Finney, C. A., Taylor, M. D., Wilson, M. S., and Maizels, R. M. **Expansion and activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection.** *Eur J Immunol.* 2007. 37: 1874-1886.
191. Rausch, S., Huehn, J., Kirchhoff, D., Rzepecka, J., Schnoeller, C., Pillai, S., Loddenkemper, C., Scheffold, A., Hamann, A., Lucius, R., and Hartmann, S. **Functional analysis of effector and regulatory T cells in a parasitic nematode infection.** *Infect Immun.* 2008. 76: 1908-1919.
192. Rausch, S., Huehn, J., Loddenkemper, C., Hepworth, M. R., Klotz, C., Sparwasser, T., Hamann, A., Lucius, R., and Hartmann, S. **Establishment of Nematode Infection Despite Increased Th2 Responses and Immunopathology after Selective Depletion of Foxp3⁺ Cells.** *Eur J Immunol.* 2009.
193. Grainger, J. R., Smith, K. A., Hewitson, J. P., McSorley, H. J., Harcus, Y., Filbey, K. J., Finney, C. A., Greenwood, E. J., Knox, D. P., Wilson, M. S., Belkaid, Y., Rudensky, A. Y., and Maizels, R. M. **Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway.** *J Exp Med.* 2010. 207: 2331-2341.
194. Morampudi, V., De, C. S., Le, M. A., Detienne, S., Braun, M. Y., and D'Souza, S. **Partial depletion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice.** *Microbes Infect.* 2011. 13: 394-404.
195. Couper, K. N., Lanthier, P. A., Perona-Wright, G., Kummer, L. W., Chen, W., Smiley, S. T., Mohrs, M., and Johnson, L. L. **Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection.** *J Immunol.* 2009. 182: 3985-3994.
196. Ge, Y. Y., Zhang, L., Zhang, G., Wu, J. P., Tan, M. J., Hu, E., Liang, Y. J., and Wang, Y. **In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4⁺CD25⁺ -regulatory T cells.** *Parasite Immunol.* 2008. 30: 471-481.
197. Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E. A., Hall, J. A., Chou, D., Dos, S. L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., Kastenmayer, R., Hunter, C., Grigg, M. E., and Belkaid, Y. **Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection.** *Immunity.* 2009. 31: 772-786.
198. Luft, B. J., Kansas, G., Engleman, E. G., and Remington, J. S. **Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis.** *J Infect Dis.* 1984. 150: 761-767.
199. Yano, A., Norose, K., Yamashita, K., Aosai, F., Sugane, K., Segawa, K., and Hayashi, S. **Immune response to *Toxoplasma gondii*-analysis of suppressor T cells in a patient with symptomatic acute toxoplasmosis.** *J Parasitol.* 1987. 73: 954-961.
200. McLeod, R., Estes, R. G., Mack, D. G., and Cohen, H. **Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion.** *J Infect Dis.* 1984. 149: 234-244.
201. Chan, J., Siegel, J. P., and Luft, B. J. **Demonstration of T-cell dysfunction during acute toxoplasma infection.** *Cell Immunol.* 1986. 98: 422-433.
202. Taylor-Robinson, A. W. and Smith, E. C. **A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection.** *Immunol Lett.* 1999. 67: 1-9.
203. Correa, M., Narayanan, P. R., and Miller, H. C. **Suppressive activity of splenic adherent cells from *Plasmodium chabaudi*-infected mice.** *J Immunol.* 1980. 125: 749-754.
204. Ahvazi, B. C., Jacobs, P., and Stevenson, M. M. **Role of macrophage-derived nitric oxide in suppression of lymphocyte proliferation during blood-stage malaria.** *J Leukoc Biol.* 1995. 58: 23-31.

205. Nie, C. Q., Bernard, N. J., Schofield, L., and Hansen, D. S. **CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T-cell function and inhibit the development of *Plasmodium berghei*-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis.** *Infect Immun.* 2007. 75: 2275-2282.
206. Hayes, M. M. and Kierszenbaum, F. **Experimental Chagas' disease: kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *Trypanosoma cruzi* infection.** *Infect Immun.* 1981. 31: 1117-1124.
207. Pinge-Filho, P., Tadokoro, C. E., and Abrahamsohn, I. A. **Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection.** *Cell Immunol.* 1999. 193: 90-98.
208. Martins, G. A., Cardoso, M. A., Aliberti, J. C., and Silva, J. S. **Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** *Immunol Lett.* 1998. 63: 113-120.
209. Kierszenbaum, F. **Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi* infection): role of adherent, nonspecific esterase-positive splenic cells.** *J Immunol.* 1982. 129: 2202-2205.
210. Abrahamsohn, I. A. and Coffman, R. L. **Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection.** *J Immunol.* 1995. 155: 3955-3963.
211. Ramos, C., Schadtler-Siwon, I., and Ortiz-Ortiz, L. **Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice.** *J Immunol.* 1979. 122: 1243-1247.
212. Harel-Bellan, A., Joskowicz, M., Fradelizi, D., and Eisen, H. **Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983. 80: 3466-3469.
213. Beschin, A., Brys, L., Magez, S., Radwanska, M., and De, B. P. ***Trypanosoma brucei* infection elicits nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent suppressive mechanisms.** *J Leukoc Biol.* 1998. 63: 429-439.
214. Murray, H. W., Carriero, S. M., and Donnelly, D. M. **Presence of a macrophage-mediated suppressor cell mechanism during cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis.** *Infect Immun.* 1986. 54: 487-493.
215. Nickol, A. D. and Bonventre, P. F. **Visceral leishmaniasis in congenic mice of susceptible and resistant phenotypes: immunosuppression by adherent spleen cells.** *Infect Immun.* 1985. 50: 160-168.
216. Kizaki, T., Kobayashi, S., Ogasawara, K., Day, N. K., Good, R. A., and Onoe, K. **Immune suppression induced by protozoa of *Echinococcus multilocularis* in mice. Evidence for the presence of CD8^{dull} suppressor cells in spleens of mice intraperitoneally infected with *E. multilocularis*.** *J Immunol.* 1991. 147: 1659-1666.
217. Neyer, L. E., Kang, H., Remington, J. S., and Suzuki, Y. **Mesenteric lymph node T cells but not splenic T cells maintain their proliferative response to concanavalin-A following peroral infection with *Toxoplasma gondii*.** *Parasite Immunol.* 1998. 20: 573-581.
218. Begum-Haque, S., Haque, A., and Kasper, L. H. **Apoptosis in *Toxoplasma gondii* activated T cells: the role of IFN- γ in enhanced alteration of Bcl-2 expression and mitochondrial membrane potential.** *Microb Pathog.* 2009. 47: 281-288.
219. Khan, I. A., Matsuura, T., and Kasper, L. H. **Activation-mediated CD4⁺ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice.** *Int Immunol.* 1996. 8: 887-896.

220. Haque, S., Khan, I., Haque, A., and Kasper, L. **Impairment of the cellular immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin 2 production and macrophage-mediated inhibitory effects.** *Infect Immun.* 1994. 62: 2908-2916.
221. Candolfi, E., Hunter, C. A., and Remington, J. S. **Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis.** *Infect Immun.* 1995. 63: 751-756.
222. Haque, S., Haque, A., and Kasper, L. H. **A *Toxoplasma gondii*-derived factor(s) stimulates immune downregulation: an in vitro model.** *Infect Immun.* 1995. 63: 3442-3447.
223. Lee, Y. H., Channon, J. Y., Matsuura, T., Schwartzman, J. D., Shin, D. W., and Kasper, L. H. **Functional and quantitative analysis of splenic T cell immune responses following oral *Toxoplasma gondii* infection in mice.** *Exp Parasitol.* 1999. 91: 212-221.
224. Candolfi, E., Hunter, C. A., and Remington, J. S. **Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates.** *Infect Immun.* 1994. 62: 1995-2001.
225. Khan, I. A., Matsuura, T., and Kasper, L. H. **IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice.** *Parasite Immunol.* 1995. 17: 185-195.
226. Khan, I. A., Matsuura, T., Fonseka, S., and Kasper, L. H. **Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1^{-/-} mice.** *J Immunol.* 1996. 156: 636-643.
227. Lowenthal, J. W., Corthesy, P., Tougne, C., Lees, R., MacDonald, H. R., and Nabholz, M. **High and low affinity IL 2 receptors: analysis by IL 2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61.** *J Immunol.* 1985. 135: 3988-3994.
228. Lowenthal, J. W., Zubler, R. H., Nabholz, M., and MacDonald, H. R. **Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes.** *Nature.* 1985. 315: 669-672.
229. Montes, M., Jaensson, E. A., Orozco, A. F., Lewis, D. E., and Corry, D. B. **A general method for bead-enhanced quantitation by flow cytometry.** *J Immunol Methods.* 2006. 317: 45-55.
230. Foster, B., Prussin, C., Liu, F., Whitmire, J. K., and Whitton, J. L. **Detection of intracellular cytokines by flow cytometry.** *Curr Protoc Immunol.* 2007. Chapter 6: 6.24.1-6.24.21.
231. Tenorio, E. P., Fernandez, J., Castellanos, C., Olguin, J. E., and Saavedra, R. **CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10.** *Eur J Immunol.* 2011. DOI: 10.1002/eji.201141507.
232. Tenorio, E. P., Olguin, J. E., Fernandez, J., Vieyra, P., and Saavedra, R. **Reduction of Foxp3⁺ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*.** *J Biomed Biotechnol.* 2010. DOI: 10.1155/2010/786078.
233. Tenorio, E. P., Fernandez, J., Olguin, J. E., and Saavedra, R. **Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly Tregs in BALB/c mice but activated cells in C57BL/6J mice.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011. 62: 362-367.
234. Begum-Haque, S., Haque, A., and Kasper, L. H. **Apoptosis in *Toxoplasma gondii* activated T cells: the role of IFN γ in enhanced alteration of Bcl-2 expression and mitochondrial membrane potential.** *Microb Pathog.* 2009. 47: 281-288.
235. Tenorio, E. P. **Análisis del efecto del arsénico sobre las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ de linfocitos T humanos.** *Tesis para obtener el Título de Licenciada en Investigación Biomédica Básica.* 2004.

236. Lyons, A. B. **Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution.** *J Immunol Methods*. 2000. 243: 147-154.
237. Taylor, M. D., LeGoff, L., Harris, A., Malone, E., Allen, J. E., and Maizels, R. M. **Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo.** *J Immunol*. 2005. 174: 4924-4933.
238. Malek, T. R. **The biology of interleukin-2.** *Annu Rev Immunol*. 2008. 26: 453-479.
239. Chardes, T., Velge-Roussel, F., Mevelec, P., Mevelec, M. N., Buzoni-Gatel, D., and Bout, D. **Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice.** *Immunology*. 1993. 78: 421-429.
240. Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y., and Shevach, E. M. **Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells.** *J Immunol*. 2010. 184: 3433-3441.
241. Elkord, E., Sharma, S., Burt, D. J., and Hawkins, R. E. **Expanded subpopulation of Foxp3⁺ T regulatory cells in renal cell carcinoma co-express Helios, indicating they could be derived from natural but not induced Tregs.** *Clin Immunol*. 2011.
242. McClymont, S. A., Putnam, A. L., Lee, M. R., Esensten, J. H., Liu, W., Hulme, M. A., Hoffmuller, U., Baron, U., Olek, S., Bluestone, J. A., and Brusko, T. M. **Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes.** *J Immunol*. 2011. 186: 3918-3926.
243. Fujimoto, M., Nakano, M., Terabe, F., Kawahata, H., Ohkawara, T., Han, Y., Ripley, B., Serada, S., Nishikawa, T., Kimura, A., Nomura, S., Kishimoto, T., and Naka, T. **The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3⁺ regulatory T cells.** *J Immunol*. 2011. 186: 32-40.
244. Verhagen, J. and Wraith, D. C. **Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells".** *J Immunol*. 2010. 185: 7129.
245. Scheffold, A., Huhn, J., and Hofer, T. **Regulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity: it takes (IL-) two to tango.** *Eur J Immunol*. 2005. 35: 1336-1341.
246. Brandenburg, S., Takahashi, T., de la Rosa, M., Janke, M., Karsten, G., Muzzulini, T., Orinska, Z., Bulfone-Paus, S., and Scheffold, A. **IL-2 induces in vivo suppression by CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.** *Eur J Immunol*. 2008. 38: 1643-1653.
247. Rodrigues, O. R., Marques, C., Soares-Clemente, M., Ferronha, M. H., and Santos-Gomes, G. M. **Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection.** *Immunobiology*. 2009. 214: 101-111.
248. Uzonna, J. E., Kaushik, R. S., Zhang, Y., Gordon, J. R., and Tabel, H. **Experimental murine *Trypanosoma congolense* infections. II. Role of splenic adherent CD3⁺Thy1.2⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁻ $\gamma\delta$ ⁻ CD4⁺8⁻ and CD3⁺Thy1.2⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁻ $\gamma\delta$ ⁻ CD4⁻8⁻ cells in the production of IL-4, IL-10, and IFN- γ and in trypanosome-elicited immunosuppression.** *J Immunol*. 1998. 161: 6189-6197.
249. Busse, D., de la Rosa, M., Hobiger, K., Thurley, K., Flossdorf, M., Scheffold, A., and Hofer, T. **Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. 107: 3058-3063.
250. Tait Wojno, E. D., Hosken, N., Stumhofer, J. S., O'Hara, A. C., Mauldin, E., Fang, Q., Turka, L. A., Levin, S. D., and Hunter, C. A. **A Role for IL-27 in Limiting T Regulatory Cell Populations.** *J Immunol*. 2011. 187: 266-273.

251. Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno, K., Kishihara, K., Tsukumo, S., and Yasutomo, K. **Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells.** *Nat Med.* 2004. 10: 29-30.
252. Taylor, M. D., Harris, A., Babayan, S. A., Bain, O., Culshaw, A., Allen, J. E., and Maizels, R. M. **CTLA-4 and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo.** *J Immunol.* 2007. 179: 4626-4634.
253. Walsh, C. M., Smith, P., and Fallon, P. G. **Role for CTLA-4 but not CD25⁺ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice.** *Parasite Immunol.* 2007. 29: 293-308.
254. Mariano, F. S., Gutierrez, F. R., Pavanelli, W. R., Milanezi, C. M., Cavassani, K. A., Moreira, A. P., Ferreira, B. R., Cunha, F. Q., Cardoso, C. R., and Silva, J. S. **The involvement of CD4⁺CD25⁺ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection.** *Microbes Infect.* 2008. 10: 825-833.