



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

**Efecto de linfocitos T CD4+PD-1+ sobre macrófagos  
alternativamente activados por la infección con *Taenia  
crassiceps*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**BIÓLOGA**

PRESENTA:

**DIANA LETICIA MARTÍNEZ SAUCEDO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS**



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 fue realizado en el laboratorio 8 de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la FES-Iztacala, UNAM.

Durante la realización de este trabajo fui apoyada con una beca de titulación del Programa de Becas para la Educación Superior.

Durante la realización del mismo se contó con el apoyo de PAPIIT-IN212909 y PAPCA-23 FES-Iztacala.

Los avances de este proyecto se presentaron en el XIX Congreso Nacional de Parasitología, Mazatlán, Sin; Septiembre de 2011.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Luis Ignacio Terrazas** por el apoyo y confianza que siempre me ha brindado.

A la **UNAM** y a la **FES-Iztacala** por la oportunidad profesional.

A la profesora **Ma. Eugenia Vázquez Peredo** quien creyó en mí, no estaría donde estoy sin ese impulso inicial.

A mis sinodales: **M. en C. Martha Salcedo, Dra. Emma Bertha Gutiérrez-Cirlos Madrid, Dr. José Rafael Jiménez** y al **Dr. Erasmo Negrete** por sus valiosas sugerencias con respecto al presente trabajo.

A la **M. en C. Yadira Ledesma Soto** por su apoyo en el laboratorio.

A todos **mis compañeros** del Laboratorio de Inmunoparasitología.

## DEDICATORIAS

### **A mis Padres, Lety y Nacho:**

Que siempre me han dado lo mejor de ellos, me han apoyado y me impulsan a seguir.

### **Mamá Tana:**

Gracias por tu inmenso amor.

### **Nuri:**

Siempre has estado a mi lado. Te quiero.

### **A mis abuelos:**

**Cristina y Joaquín.** Gracias por su cariño

**Yiyos:** Que siempre me han dado su amor sin condiciones.

### **A mis amigos:**

**Adrián, Alfredo, Yussel y Víctor,** que han estado conmigo desde hace muchos años, siempre logran sacarme una sonrisa.

**Priss,** gracias por estar a mi lado.

**Javier, Germán, Saúl, Jessy y Abril,** estuvimos juntos a lo largo de la carrera, las cosas que hemos vivido se quedarán conmigo siempre.

**Dodo ♥**

# CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>I. I. Respuesta inmunitaria</b> .....	<b>7</b>
<b>I. I. I. Inmunidad innata</b> .....	<b>8</b>
<b>I. I. II. Inmunidad adaptativa</b> .....	<b>9</b>
<b>I. II. Citocinas</b> .....	<b>11</b>
<b>I. II. I. Citocinas Pro-inflamatorias</b> .....	<b>12</b>
<b>I. II. II. Citocinas anti-inflamatorias</b> .....	<b>13</b>
<b>I. III. Macrófagos</b> .....	<b>14</b>
<b>I. III. I. Activación macrófagos</b> .....	<b>15</b>
<i>Activación clásica</i> .....	<i>16</i>
<i>Activación alternativa</i> .....	<i>17</i>
<b>I. IV. PD-1/PD-Ls</b> .....	<b>19</b>
<b>I. IV. I. PD-Ls en infecciones por helmintos</b> .....	<b>20</b>
<b>I. V. Modelo de cisticercosis experimental por <i>Taenia crassiceps</i></b> .....	<b>21</b>
<b>I. V. I. Respuesta a <i>T. crassiceps</i></b> .....	<b>22</b>
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>25</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>25</b>
<b>Estrategia experimental</b> .....	<b>26</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>IV. I. Animales experimentales</b> .....	<b>27</b>
<i>Infección y mantenimiento de la cepa del parásito <i>Taenia crassiceps</i> en el laboratorio</i> .....	<i>27</i>
<b>IV. II Sacrificio de ratones BALB/c</b> .....	<b>27</b>
<i>Obtención de macrófagos</i> .....	<i>27</i>
<i>Obtención de linfocitos T CD4<sup>+</sup></i> .....	<i>28</i>
<b>IV. II. I. Estimulación de macrófagos</b> .....	<b>29</b>
<b>IV. III. Obtención de RNA de Mφ peritoneales</b> .....	<b>29</b>
<b>IV. IV. Citometría de flujo para detección de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en Mφ y linfocitos T CD4<sup>+</sup></b> .....	<b>29</b>
<b>IV. V. Ensayo de RT-PCR para determinar el estado de activación de los macrófagos</b> .....	<b>31</b>
<i>Transcripción reversa para la elaboración de DNA complementario (cDNA)</i> .....	<i>31</i>
<i>Amplificación de cDNA</i> .....	<i>32</i>
<i>Electroforesis del gen amplificado</i> .....	<i>32</i>
<i>Sensibilización de la placa</i> .....	<i>33</i>
<i>Muestras y curva</i> .....	<i>33</i>
<i>Revelado del ELISA</i> .....	<i>33</i>

<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>V. II. Análisis de las células T CD4<sup>+</sup> de bazo y células peritoneales en la fase crónica de la infección. ....</b>	<b>35</b>
<b>V. III. Determinación del perfil de citocinas de los Mφ posterior a la interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> .....</b>	<b>40</b>
<b>V. IV. Análisis de los marcadores de activación alternativa posterior a la interacción linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>.....</b>	<b>42</b>
<b>VI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>VIII. REFERENCIAS.....</b>	<b>52</b>
<b>IX. APÉNDICE I (Soluciones).....</b>	<b>54</b>
<i>Solución hemolizante.....</i>	<i>54</i>
<i>Buffer de PBS (solución salina amortiguada con fosfatos) para 10 litros y pH 7.4.....</i>	<i>54</i>
<i>Buffer TBE 1x .....</i>	<i>54</i>
<i>Buffer de pegado (ELISA) .....</i>	<i>54</i>
<i>Solución de lavado (ELISA) .....</i>	<i>54</i>
<i>Solución de lavado (ELISA) .....</i>	<i>54</i>
<i>Solución de bloqueo (ELISA).....</i>	<i>54</i>
<i>Sustrato ABTS para revelado (ELISA) .....</i>	<i>55</i>
<i>Sustrato ABTS para revelado (ELISA) .....</i>	<i>55</i>
<i>Buffer para FACS.....</i>	<i>55</i>
<i>Bromuro de etidio. ....</i>	<i>55</i>
<b>X. APÉNDICE II .....</b>	<b>56</b>
<i>Secuencias de primers.....</i>	<i>56</i>

## ABREVIATURAS

aaMφ	Macrófagos alternativamente activados (Alternatively activated macrophages).
ABTS	2,2'-azino-di [3-ethylbenziazoline-6-sulfónico] (2,2'-azino- di [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic]).
Ag	Antígeno.
APC	Aloficocianina (allophycocyanin).
APCs	Células Presentadoras de antígeno (Antigen Presenting Cells).
Arg1	Arginasa 1.
caMφ	Macrófagos clásicamente activados (Classically activated macrophages).
CD-	Grupo de diferenciación (Cluster of differentiation).
DCs	Células dendríticas.
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid).
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato (Deoxynucleoside triphosphates).
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay).
FACS	Técnica de citometría de flujo (Fluorescence activated cell sorting).
FITC	Fluoresceína isothiocianato (Fluorescein isothiocyanate).
FIZZ1	Encontrado en la zona de inflamación (Found in inflammatory zone 1).
i.p	Intraperitoneal.
Ig	Inmunoglobulina.
IL-	Interleucina.
IFN-γ	Interferón gama.
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible (Inducible nitric oxide synthase).
NO	Óxido nítrico (Nitric oxide).
PBS	Amortiguador de fosfatos (Phosphate buffered saline).
PD-1	Receptor de muerte programada (Programmed death receptor-1).
PD-L	Ligando del receptor PD-1 (Programmed death ligand).

PE	Ficoeritrina (Phycoeritrin).
PECs	Células totales de exudado peritoneal (Peritoneal exudate cells).
p.i.	Post-infección.
Relm $\alpha$	Molécula similar a resistina (Resistin-like molecule alfa).
RNA	Ácido ribonucleíco (Ribonucleic acid).
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (Reverse transcriptase polymerase chain reaction).
T <sub>H</sub>	Linfocitos T cooperadores (T helper cell).

## RESUMEN

Los helmintos parásitos modulan la respuesta inmune para sobrevivir dentro de su hospedero mediante la generación de una respuesta tipo  $T_H2$  que provoca el reclutamiento de macrófagos alternativamente activados (aaM $\phi$ ), los cuales tienen efectos supresores sobre linfocitos T activados, lo cual depende de la sobreexpresión de PD-L1 (Programmed death ligand-1) y PD-L2 (Programmed death ligand-2) sobre su membrana. Los PD-Ls son ligandos de PD-1 (Programmed death-1) el cual se expresa en diversos tipos celulares incluidos los linfocitos T. Durante la infección con *T. crassiceps* se reclutan aaM $\phi$  que suprimen la proliferación de linfocitos T activados; sin embargo, no existen reportes sobre lo que sucede durante ésta interacción en los aaM $\phi$ .

Para evaluar el efecto de esta interacción se aislaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> que fueron cocultivados con aaM $\phi$  peritoneales en proporciones 1:0, 1:4 y 1:8 durante 18 horas. Mediante citometría de flujo se confirmó la presencia de PD-1 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, molécula que fue sobreexpresada durante la infección con *T. crassiceps*. Los aaM $\phi$  fueron examinados en busca de PD-1, PD-L1 y PD-L2 también por medio de esta técnica, encontramos que PD-1 se expresó en los aaM $\phi$ ; mientras que PD-L1 se encontró expresado de forma constitutiva, aunque posterior a la infección su expresión aumentó de forma considerable; la expresión de PD-L2 comenzó después de dicha infección. Esto nos sugirió que debido a estas grandes cantidades del receptor y los ligandos su interacción era posible e incluso los efectos que ocurrieran en los aaM $\phi$  podían deberse a ellos.

Para saber si la presencia de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> afectaban el perfil de secreción de citocinas de los aaM $\phi$  se recuperó el sobrenadante y fue examinado por medio de la técnica de ELISA (Sandwich), no se detectaron diferencias significativas entre los grupos para las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12; sin embargo, IL-6 aumentó de forma progresiva en los grupos control en los que los M $\phi$  estuvieron en contacto con los linfocitos CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>, y los macrófagos al ser estimulados por el anticuerpo anti-PD-1 tuvieron un incremento en la secreción de esta citocina. Este mismo efecto se observó a las seis semanas post-infección, mientras que a las 8 semanas p.i. en las proporciones 1:8 y con el anticuerpo anti-PD-1 su producción decreció de manera significativa.

Por último, se investigó mediante RT-PCR la presencia de Ym1, Fizz1 y Arg1 en los aaMφ, los cuales son marcadores de activación alternativa en los macrófagos, así mismo se buscaron transcritos de iNOS el cual se asocia a la activación clásica de los macrófagos. Observamos que la expresión de Fizz1 no tuvo diferencias significativas en las relaciones 1:0 y 1:4, sin embargo, Ym1 y Arg1 bajaron su expresión en aquellos macrófagos alternativamente activados que interactuaron con los linfocitos T CD4+PD-1+ en la proporción 1:4, esto nos indica que la interacción entre estas poblaciones celulares sí provoca un efecto sobre los aaMφ.

Estos resultados sugieren que la interacción de linfocitos T CD4+PD-1+ con aaMφ sí tiene efectos en el comportamiento de los macrófagos, ya que se regulan los marcadores de activación alternativa y se promueve la síntesis de IL-6, esto es probable que ocurra a través de la interacción de PD-1 con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 localizados en los macrófagos.

# I. INTRODUCCIÓN

La inmunidad es la protección frente a las enfermedades, más específicamente, contra una enfermedad infecciosa. Las células y moléculas responsables de su ejecución forman el sistema inmunitario. La reacción conjunta y coordinada frente a sustancias ajenas es la respuesta inmunitaria (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa contra microorganismos infecciosos, sin embargo, sustancias de carácter no infeccioso pueden provocar una respuesta inmune. Además, estos mecanismos en algunas circunstancias, son capaces de provocar lesiones tisulares y enfermedades. Por lo que, una definición más completa de la respuesta inmunitaria, es una reacción a componentes de microorganismos y a macromoléculas tales como proteínas y lipopolisacáridos que sean reconocidos como ajenos, independientemente de las consecuencias fisiológicas o patológicas de esta reacción (Abbas, Lichtman *et al.* 2009; Murphy, Travers *et al.* 2009). La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y reacciones tardías de la inmunidad adaptativa (Montero Barrera 2006). Las células del sistema inmunitario innato desempeñan un papel esencial en la iniciación y posterior dirección de la respuesta inmunitaria adaptativa (Murphy, Travers *et al.* 2009).

Entre las primeras células de inmunidad innata en responder contra microorganismos se encuentran los macrófagos (M $\phi$ ) (Murphy, Travers *et al.* 2009), que son células derivadas de monocitos sanguíneos, con papeles bien establecidos en la respuesta primaria a patógenos. También participan en el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos, coordinando la respuesta inmune adaptativa, la inflamación y la reparación de tejidos (Martinez, Helming *et al.* 2009) mediante la secreción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas efectoras como el óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés). Estas sustancias liberadas permiten atacar a patógenos extracelulares de gran tamaño que no pueden ser fagocitados, como los helmintos (Noël, Raes *et al.* 2004), pero esta respuesta no puede mantenerse constante, ya que puede destruir tejido del hospedero (Murphy, Travers *et al.* 2009). En ocasiones, los M $\phi$  no pueden eliminar a los agentes infecciosos ya que no son capaces de reconocerlos, por lo que los linfocitos T, pertenecientes al sistema inmune adaptativo, han evolucionado para incrementar los niveles de protección frente a posibles re-infecciones por el mismo patógeno (Murphy, Travers *et al.* 2009).

Los linfocitos T, se han sub-dividido en varios subtipos como los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se clasifican en dos subpoblaciones principalmente, T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2, dependiendo de las citocinas sintetizadas y sus funciones efectoras. El interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) es la citocina característica de los linfocitos T<sub>H</sub>1, mientras que las interleucinas (IL)-4, IL-5 e IL-13 son citocinas definitorias de los linfocitos T<sub>H</sub>2 (Abbas, Lichtman *et al.* 2009). La respuesta T<sub>H</sub>2 se produce en respuesta a los alérgenos y helmintos, debido a un estímulo continuo, pero no intenso por parte de los antígenos (Abbas, Lichtman *et al.* 2009), esto lleva a los macrófagos a cambiar su fenotipo a un estado antiinflamatorio conocido como macrófagos alternativamente activados (aaM $\phi$ , derivado del inglés) (Rodríguez-Sosa, David *et al.* 2002), respondiendo a citocinas tipo T<sub>H</sub>2, a diferencia de los macrófagos clásicamente activados que responden a IFN- $\gamma$  (Gordon and Martinez 2010).

En trabajos previos, se ha utilizado el modelo de cisticercosis experimental causado por *Taenia crassiceps*, y se ha observado que ratones susceptibles a este parásito (BALB/c) generan una respuesta inmune tipo T<sub>H</sub>1 en la fase temprana de la infección (<3 semanas), y al pasar a un estado crónico, el parásito induce un ambiente de citocinas de tipo T<sub>H</sub>2 en el hospedero, lo cual genera aaM $\phi$  (Reyes and Terrazas 2007).

Los efectos supresores de esta población de macrófagos dependen de la sobreexpresión de las moléculas PD-L1 (Programmed Death Ligand-1) y PD-L2 las cuales se unen a PD-1 (Programmed Death-1) expresado en algunos tipos celulares (Terrazas, Montero *et al.* 2005; Reyes and Terrazas 2007). Se ha demostrado que la expresión de PD-L1 y PD-L2 en aaM $\phi$  está regulada diferencialmente por las citocinas tipo T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 (Loke and Allison 2003), lo cual sugiere que tienen diferentes funciones en la regulación de estas respuestas (Sharpe, Wherry *et al.* 2007). PD-1 es un receptor proteico transmembranal de la familia Ig, se expresa en células T, células B, células NK y en algunas células del linaje mieloides después de su activación (Sharpe, Wherry *et al.* 2007; Franceschini, Paroli *et al.* 2009) y su efecto al unirse a PD-L1 o PD-L2 es la inactivación de las células T (Reyes and Terrazas 2007).

Los PD-Ls difieren en su expresión, mientras PD-L1 se expresa constitutivamente en células hematopoyéticas como células B, células T, células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés) y macrófagos, también en células no hematopoyéticas; la expresión de PD-L2 está limitada a ciertos tipos celulares como mastocitos, DCs y macrófagos después de su activación (Collins, Ling *et al.*

2005; Dong and Chen 2006; Sharpe, Wherry *et al.* 2007; Franceschini, Paroli *et al.* 2009; Wherry 2011).

Durante la presentación del antígeno, al bloquear alguno de estos dos ligandos en los aaM $\phi$ , la proliferación de los linfocitos se restaura (Terrazas, Montero *et al.* 2005; Huber, Hoffmann *et al.* 2010), por lo que la vía PD-1/PD-Ls está involucrada en la tolerancia inmunológica periférica, al regular de forma negativa la expresión de citocinas pro-inflamatorias e inducir la anergia en los linfocitos T (Fife and Pauken 2011). Terrazas *et al.* (2005) demostraron que durante la infección con *T. crassiceps* los aaM $\phi$  suprimen la proliferación de los linfocitos T. Sin embargo, no existen reportes sobre lo que sucede durante ésta interacción en los aaM $\phi$ .

En este trabajo se usaron diferentes técnicas para evaluar la respuesta del M $\phi$  al interactuar con linfocitos T CD4+PD-1<sup>+</sup> o con el anticuerpo PD-1. Se analizaron moléculas de membrana como TLR, PD-1, PD-L1 y PD-L2 mediante citometría de flujo, también se analizó la expresión de RNA mensajero para Arginasa1, Ym1, Fizz1 e iNOS por RT-PCR, a través de la técnica de ELISA se midió la síntesis de citocinas en muestras de sobrenadante como IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ .

## **I. I. Respuesta inmunitaria.**

La inmunidad es un sistema integral encargado de defender al huésped, en el que funcionan numerosas células y moléculas de modo conjunto. Debido a este amplio repertorio se tiene una ilimitada capacidad de reconocer y reaccionar ante antígenos exógenos, lo que aumenta el riesgo de desencadenar reacciones patológicas a alérgenos inocuos y/o autoantígenos (Maizels 2005), esto puede provocar lesiones hísticas y enfermedades como hipersensibilidad y autoinmunidad (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

La defensa contra los microorganismos patógenos tiene lugar a través de la inmunidad innata, que es la primera línea de defensa. La constituyen mecanismos de defensa celulares y bioquímicos presentes incluso antes de contraerse la infección; la inmunidad adaptativa es específica y <<recuerda>> a los microorganismos para ser más eficaz en exposiciones posteriores al patógeno, sus componentes principales son linfocitos y sus productos de secreción como los anticuerpos (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

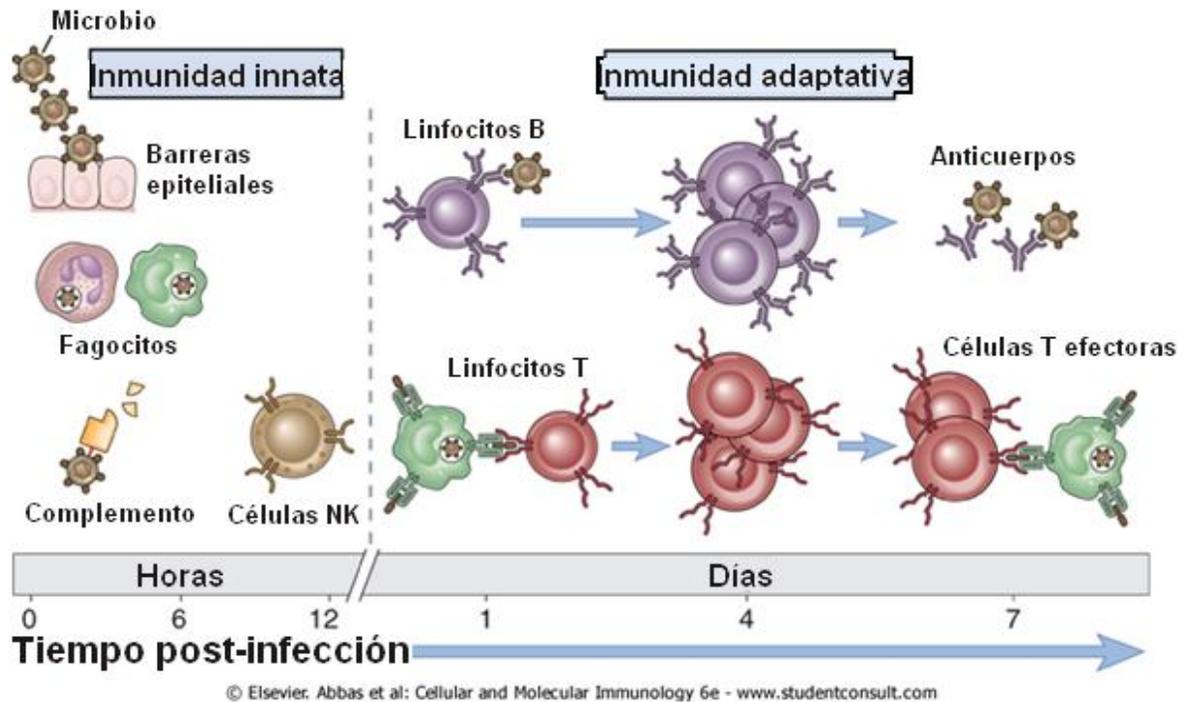
### **I. I. I. Inmunidad innata.**

El sistema inmunitario innato es un sistema rápido, universal y antiguo, con especificidad limitada, carente de memoria, que obstaculiza la entrada y limita o elimina el crecimiento de muchos microorganismos. Se caracteriza por estar presente incluso antes de la infección, reaccionar sólo a microorganismos y no a sustancias no infecciosas (alérgenos) y por responder de igual forma a infecciones repetidas (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

Los mecanismos que esta respuesta utiliza para la defensa del huésped se basan en medios físicos, bioquímicos y celulares: a) barreras físicas y químicas, como epitelios y sustancias antimicrobianas en ellos; b) células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos); c) proteínas sanguíneas, como los factores del sistema del complemento que eliminan por medio de la lisis a posibles patógenos; y d) citocinas, que a través de receptores y diferentes cascadas de señalización regulan y coordinan muchas de las actividades celulares de esta respuesta como la inducción y/o inhibición de expresión de genes. Estos mecanismos son específicos para estructuras comunes en los microbios y no distinguen diferencias sutiles, pero sí reaccionan de modo diferente contra bacterias y/o virus, por ejemplo (Abbas, Lichtman *et al.* 2009; Murphy, Travers *et al.* 2009).

Los neutrófilos y macrófagos son células características de este tipo de respuesta. Sin embargo, diferentes poblaciones celulares también participan como las células citotóxicas, granulocíticas y DCs, estas últimas consideradas centinelas y parte fundamental de la unión de la respuesta inmune innata con la respuesta inmune adaptativa, ya que se encargan de procesar y presentar antígenos a las células T. Todas estas poblaciones celulares innatas están equipadas con receptores codificados en la línea germinal y no requieren de re-arreglo genético, el cual es esencial para el reconocimiento mediado por la respuesta inmune adaptativa (Paul 1999; Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

Muchos microorganismos patógenos han evolucionado hasta hacerse resistentes a la inmunidad innata y su eliminación exige mecanismos más potentes, por lo que estimula a la inmunidad adaptativa e influencia la naturaleza de esta respuesta para que sea óptima contra los diversos patógenos. Este estímulo de una respuesta a otra se logra gracias a la secreción de citocinas y la participación de ciertas poblaciones celulares (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).



**Figura 1.** Inmunidad innata y adaptativa. Los mecanismos de la inmunidad innata aportan la primera línea de defensa contra las infecciones. La respuesta inmunitaria adaptativa surge más tarde y conlleva a la activación de los linfocitos. La cinética de ambas respuestas en una aproximación y varía en las diferentes infecciones (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

## I. I. II. Inmunidad adaptativa.

La respuesta inmune adaptativa recibe este nombre debido a que tiene la capacidad de responder adaptándose al tipo de infección y de distinguir entre diferentes microorganismos y moléculas (reconoce  $10^7$  distintos antígenos), esta capacidad se llama especificidad. Otra característica sobresaliente es la memoria inmunológica, ya que después de la eliminación o contacto con el antígeno, un grupo de células adaptadas para dicho estímulo se mantienen circulantes o se almacenan en órganos especializados como en médula ósea (Abbas, Lichtman *et al.* 2009; Murphy, Travers *et al.* 2009).

Existen dos tipos de linfocitos específicos de esta respuesta que expresan receptores específicos para antígenos, los linfocitos T y los linfocitos B. Los linfocitos T se generan en la médula ósea, pero requieren de un proceso de maduración llevado a cabo en el timo, a diferencia de los linfocitos B que se generan y maduran en la médula ósea; en ambas poblaciones celulares el reconocimiento está mediado por los receptores específicos de antígeno, los cuales son: receptor de

la célula T (TCR por T Cell Receptor) y receptor de la célula B (BCR por B Cell Receptor) (Paul 1999; Medzhitov 2007). Los linfocitos B son la única población capaz de secretar diferentes isotipos de inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos, las cuales son moléculas capaces de reconocer a antígenos microbianos, neutralizar su capacidad infecciosa y eliminarlos por medio del estímulo de la fagocitosis o activando mediadores de la inflamación por parte de leucocitos, pero además poseen la capacidad de presentar antígeno a los linfocitos T. Sin embargo, existen virus y algunas bacterias que sobreviven en el interior de los fagocitos u otras células con lo que quedan fuera del alcance de los anticuerpos, para esto los linfocitos T eliminan a los microorganismos y a las células infectadas para deshacerse de los reservorios de infección.

Los linfocitos T se dividen en dos tipos: linfocitos T citotóxicos (LTC) que expresan la molécula de membrana CD8 y están encargados de eliminar a células infectadas o posibles células tumorígenicas, y en linfocitos T cooperadores ( $T_H$  por T Helper) que coordinan la respuesta celular por medio de la producción de citocinas y con la expresión de CD4 en su membrana. Tanto los linfocitos T  $CD4^+$  como los T  $CD8^+$  sólo pueden reconocer a los antígenos cuando otras células se los presentan, para esto las células presentadoras de antígeno (CPA) expresan en su membrana a proteínas especializadas conocidas como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Existen dos tipos principales, el MHC clase I y el MHC clase II. El primero reconoce antígenos proteínicos y citosólicos, mientras que el segundo antígenos extracelulares que han sido endocitados. Por otro lado, el MHC clase I presenta antígenos a los linfocitos T  $CD8^+$  y el MHC clase II a los linfocitos T  $CD4^+$  (Abbas, Lichtman *et al.* 2009). Este grupo de células cooperadoras T  $CD4^+$  es subdividido en células  $T_{H1}$ , caracterizadas por la alta secreción de IFN- $\gamma$ ;  $T_{H2}$ , las cuales producen altos niveles de IL-4 e IL-13 (Mosmann and Sad 1996). Estudios recientes han identificado dos subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  efectores adicionales: los linfocitos  $T_{H17}$  y  $T_{Reg}$ . Los linfocitos  $T_{H17}$  se caracterizan por secretar IL-17 sin la síntesis de IFN- $\gamma$  y/o IL-4, estas últimas citocinas mencionadas inhiben la diferenciación a este perfil. La principal función de las células  $T_{H17}$  es la de inducir las respuestas inflamatorias con gran cantidad de neutrófilos, por lo que son importantes mediadores de lesiones hísticas en enfermedades inflamatorias. Por otro lado, los linfocitos T reguladores ( $T_{Reg}$ ) tienen como función suprimir las respuestas inmunitarias y mantener la autotolerancia mediante la secreción de IL-10. Expresan en concentraciones elevadas CD25, la cual es la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-2. Su generación y sobrevivencia dependen de TGF- $\beta$  e IL-2 y

de la coestimulación por la vía de B7:CD28. Un factor de transcripción llamado Foxp3 es crítico para el desarrollo y la función de estos linfocitos cooperadores (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

En respuesta a una infección, una variedad de células de la respuesta inmune innata y adaptativa se activan y colaboran en un esfuerzo por controlar y eliminar a los patógenos invasores. Las células de la inmunidad innata ayudan a las células B a producir anticuerpos y para que lleven a cabo su cambio de isotipo, reclutan y activan a células T CD8<sup>+</sup> y otras células efectoras, también actúan directamente en muchas células de tejidos, incluyendo células epiteliales y de mucosas durante el proceso de limpieza de patógenos. Las diversas funciones de las células T CD4<sup>+</sup> son determinadas por los patrones de secreción de citocinas y su localización en tejidos (Zhu and Paul 2010). Por último, la interacción entre el TCR, el MHC, así como moléculas co-estimuladoras activan la respuesta de los linfocitos T (Terrazas, Montero *et al.* 2005).

## **I. II. Citocinas.**

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, secretadas por células de la inmunidad innata y adaptativa que median las funciones de estas células. Se producen en respuesta a microorganismos y a antígenos, no se almacenan habitualmente ya que no existen como moléculas preformadas (Abbas, Lichtman *et al.* 2009). Se incluyen a interleucinas (llamadas así porque son sintetizadas por leucocitos y actúan sobre otros leucocitos), interferones, factores co-estimuladores de colonias y muchos factores de crecimiento (Scheller, Chalaris *et al.* 2011).

Se caracterizan por su pleiotropía y redundancia, ya que tienen actividades que se sobreponen al regular la proliferación y diferenciación de las células blanco involucradas (Scheller, Chalaris *et al.* 2011), así mismo, pueden actuar de forma paracrina o autocrina (Abbas, Lichtman *et al.* 2009). Durante la respuesta inmunitaria adaptativa en su fase de activación contribuyen al crecimiento y diferenciación de los linfocitos, mientras que en la fase efectora de ambos tipos de respuesta estimula a las células para que eliminen a los microorganismos y sus antígenos (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

Dependiendo de las acciones biológicas de las citocinas se les pueden clasificar en pro- o antiinflamatorias. De esta forma cuando una respuesta inflamatoria se presenta, citocinas tales como Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés), IL-1 $\beta$  e IL-12, entre otras, son

secretadas. Mientras que en una respuesta antiinflamatoria se secretan citocinas como IL-4, IL-13, IL-10 y TGF- $\beta$ , entre otras (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

### **I. II. I. Citocinas Pro-inflamatorias.**

**Interleucina-1 $\beta$ .** Su función principal es mediar la respuesta inflamatoria del hospedero frente a las infecciones y estímulos inflamatorios diversos. Actúa junto con TNF- $\alpha$  en la inmunidad innata e inflamación (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

La principal fuente de IL-1 $\beta$  son los fagocitos mononucleares activados, neutrófilos, células epiteliales y endoteliales. Su secreción es inducida por productos bacterianos y otras citocinas como TNF- $\alpha$ . Sus efectos biológicos dependen de su concentración, ya que a baja concentración es un mediador de la inflamación, mientras que al secretarse en grandes cantidades tiene efectos sistémicos como la capacidad de generar fiebre (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

**IL-12.** En la respuesta inmunitaria innata es fundamental contra los microorganismos intracelulares y un inductor clave en la inmunidad adaptativa frente a los microorganismos. Su acción más importante consiste en estimular la síntesis de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T y células asesinas naturales (NK). Su principal fuente son fagocitos mononucleares activados y DCs; su producción se induce por estímulos microbianos como el LPS, así como al unirse los linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante el ligando CD40 (CD40L) a CD40 en los M $\phi$  y DCs. Esta citocina es esencial para iniciar una serie de respuestas en las que participan células NK, M $\phi$  y linfocitos T, que da lugar a la erradicación de microorganismos intracelulares. La IL-12 secretada estimula a células NK y linfocito T para que produzcan IFN- $\gamma$  que activa después a los M $\phi$  para que destruyan a los microorganismos fagocitados (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

Así mismo, la IL-12 estimula la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en linfocitos T<sub>H</sub>1, además se potencializan las funciones citolíticas de linfocitos NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

**Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).** Es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda contra bacterias Gram negativas, así como microorganismos infecciosos, provoca muchas complicaciones sistémicas en las infecciones graves (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

Los fagocitos mononucleares activados son la principal fuente celular de TNF- $\alpha$ . Para los M $\phi$  un potente estímulo son los lipopolisacáridos (LPS), los cuales están presentes en bacterias Gram negativas. El IFN- $\gamma$  aumenta la síntesis de TNF- $\alpha$  en los M $\phi$  estimulados por LPS. La función biológica principal de esta citocina es atraer y activar a neutrófilos y monocitos a zonas de infección para eliminar a los microorganismos. En bajas cantidades se produce inflamación local por activación de neutrófilos, en concentraciones moderadas produce fiebre y, en elevadas concentraciones y junto con citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  induce choque séptico en el cual hay colapso vascular, coagulación intravascular diseminada y trastornos metabólicos (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

**Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ).** Es la principal citocina activadora de los M $\phi$  con funciones críticas en la inmunidad innata y en la adaptativa. Esta proteína es producida por linfocitos NK, T CD8<sup>+</sup> y T<sub>H</sub>1, de estos últimos es la citocina característica (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

Las funciones de IFN- $\gamma$  son importantes en la inmunidad celular contra microorganismos intracelulares, ya que estimula la expresión de moléculas del MHC y de moléculas coestimuladoras en las APCs, ayuda con la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en T<sub>H</sub>1 e inhibe la proliferación de linfocitos T<sub>H</sub>2. Todas las células poseen receptores específicos para IFN- $\gamma$ , por lo que en linfocitos B, por ejemplo, promueve la diferenciación y el cambio de isotipo de Ig. En los M $\phi$  induce la expresión de los genes del MHC de clase II, lo que promueve la función presentadora de antígeno; además, induce la expresión de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), la generación de intermediarios reactivos del oxígeno, aumenta la expresión de moléculas de adhesión y de receptores Fc $\gamma$ RI de alta afinidad, así como la síntesis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12, y de componentes del sistema del complemento (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

## **I. II. II. Citocinas antiinflamatorias.**

**IL-4.** Es el principal estímulo para que se sinteticen anticuerpos IgE y para que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se desarrollen en linfocitos T<sub>H</sub>2 al actuar como molécula inductora, e incluso es una citocina característica de este tipo de respuesta (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

Las principales células productoras de IL-4 son los linfocitos T<sub>H</sub>2 al igual que mastocitos y basófilos activados. Entre sus acciones biológicas están mediar las reacciones dadas por mastocitos

y eosinófilos, y suprimir las acciones de los M $\phi$ , ya que antagoniza con IFN- $\gamma$  el cual activa a dichas células (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

**IL-10.** Esta citocina inhibe a los M $\phi$  y DCs activadas, por lo que participa en el control de reacciones inmunitarias innatas y celulares. Se produce principalmente por M $\phi$  activados y, al actuar sobre ellos mismos inhibiéndolos se dice que es una retroalimentación negativa. Los efectos biológicos de IL-10 se deben principalmente a su capacidad de inhibir muchas de las funciones de los M $\phi$  activados; actúa al poner fin a la secreción de otras citocinas, como IL-12 en M $\phi$  y DCs activadas, y a la expresión de moléculas coestimuladoras que favorecen la activación de los linfocitos T y la inmunidad celular, esto con el fin de finalizar la respuesta inmune y volver a un estado de reposo (Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

### **I. III. Macrófagos.**

Los M $\phi$  son células de gran tamaño con múltiples pliegues y prolongaciones romas, cortas y digitiformes, las cuales intervienen en el proceso de endocitosis (Celada and Maki 1992). Se generan en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas, las cuales son precursoras también de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, DCs y mastocitos. Estas células son diferenciadas en unidades formadoras de colonias granulocíticas/macrófagos, después en unidades formadoras de colonias de macrófagos que dan lugar a monoblastos, estos a pro-monocitos y finalmente a monocitos, los cuales son expulsados hacia la circulación; posteriormente, migran a tejidos donde se diferencian a macrófagos y responden a la inflamación (Mosser and Edwards 2008). Al llegar a los tejidos aumenta su tamaño, se desarrolla el sistema lisosomal y las enzimas hidrolíticas, hay un incremento en el número y tamaño de las mitocondrias, y en el metabolismo energético (Celada and Maki 1992).

Estas células fagocíticas están involucradas en la remoción de restos celulares generados durante la remodelación de tejidos, también elimina rápida y eficientemente células sometidas a apoptosis. Los receptores que median estos procesos homeostáticos incluyen a receptores <<basureros>> (scavenger), fosfatidil-serina, de trombospondina, de integrinas y del complemento. Sin embargo, estos receptores fallan en la transducción de señales que induzcan la transcripción

genética de citocinas o señales inhibitorias, por lo que gran parte de la fagocitosis es independiente de otras células inmunes (Mosser and Edwards 2008; Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

Tienen gran plasticidad, lo que les permite montar una respuesta eficaz a las señales del microambiente en el que se encuentren (Mosser and Edwards 2008), permitiéndoles adaptarse y adquirir fenotipos adecuados para la respuesta inmune innata o adaptativa (Reyes, Terrazas *et al.* 2010). La diferenciación y activación de los macrófagos depende de los factores específicos de crecimiento y diferenciación, sus receptores, vías de señalización y factores de transcripción (Gordon and Martinez 2010).

Los macrófagos expresan una amplia variedad de receptores opsónicos y no opsónicos en su superficie, en compartimentos vacuolares y citosólicos, reconociendo de esta forma lo extraño así como células anormales y normales y productos derivados del huésped. Sus receptores incluyen familias de moléculas reguladoras, lectinas y receptores scavenger (Gordon and Martinez 2010).

A través de la endocitosis inducida y constitutiva, la fagocitosis, y la secreción de varios productos como citocinas, factores de crecimiento y metabolitos, ejecutan funciones tróficas y tóxicas. Su repertorio secretor incluye enzimas antibacterianas y proteolíticas, quimiocinas, citocinas antiinflamatorias y citocinas proinflamatorias. A través de potentes conjuntos de proteínas de membrana genera oxígeno reactivo, nitrógeno y metabolitos de ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) (Gordon and Martinez 2010).

### **I. III. I. Activación macrófagos.**

La activación de los  $M\phi$  es un proceso controlado y complejo que lleva a una serie de modificaciones bioquímicas, morfológicas y funcionales, las cuales culminan en el aumento del potencial de la célula para que ejerza funciones complejas, como la presentación de antígeno, lisis de células tumorales y actividad bactericida. Los factores activadores más potentes son el IFN- $\gamma$  y los lipopolisacáridos (LPS), pero también GM-CSF, M-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-4 y TNF- $\alpha$  pueden inducir ciertos aspectos de la activación (Celada and Maki 1992; Mosser and Edwards 2008).

Se ha observado que antígenos microbianos junto con células T efectoras, como  $T_H1$ ,  $T_H2$  y T reguladoras ( $T_{Reg}$ ) y sus productos, influyen en la heterogeneidad y el estado de activación de los macrófagos. Debido a estas diferencias, se han descrito distintos subtipos de macrófagos: los

macrófagos clásicamente activados (caM $\phi$ ) y los macrófagos alternativamente activados (aaM $\phi$ ) (Gordon and Martinez 2010).

Los macrófagos estimulados y activados con citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  y LPS son capaces de matar a patógenos fagocitados y producir citocinas inflamatorias e iNOS. Este fenotipo es conocido como macrófagos clásicamente activados (caM $\phi$ ). En contraste están los aaM $\phi$  que son estimulados con IL-4 e IL-13; preservan su capacidad de fagocitar, presentar antígeno y sobrerregular moléculas coestimuladoras, pero el metabolismo del aminoácido L-arginina está alterado por un incremento en la expresión de arginasa1 (Arg1) correspondiente con una baja expresión de iNOS (Gordon and Martinez 2010; Reyes, Terrazas *et al.* 2010).

En el modelo de activación de los macrófagos, la primera parte es la diferenciación, la cual depende de factores de crecimiento como GM-CSF o M-CSF; la segunda es la activación por IFN- $\gamma$  en el caso de los caM $\phi$ , o por IL-4/IL-13 para los aaM $\phi$ ; y la tercera un estímulo dado por el TLR o por un receptor análogo, este estímulo adicional promueve la inducción de las funciones completas clásicas o alternativas. Los controles negativos que son para la resolución y reparación se consideran la cuarta parte. Una vez establecida, algunas propiedades de activación alternativa pueden ser reversibles (plasticidad) (Gordon and Martinez 2010).

Una importante característica de esta población celular es que mantienen la plasticidad fenotípica y funcional, la cual es importante para una respuesta rápida a bacterias y virus como caM $\phi$  y ayudar posteriormente en reparar tejidos dañados como aaM $\phi$  (Huber, Hoffmann *et al.* 2010).

### **Activación clásica.**

El término clásicamente activado se ha usado para nombrar a macrófagos efectores que son producidos durante la respuesta inmune celular, con capacidad de responder a LPS, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . El primero puede activar a los macrófagos para que secreten citocinas proinflamatorias, grandes cantidades de aniones superóxido y radicales oxígeno y/o nitrógeno para incrementar su capacidad microbicida. Con este fenotipo, las funciones microbicidas y tumorocidas se mejoran y se secretan altos niveles de mediadores y citocinas pro-inflamatorias (Gordon and Martinez 2010; Huber, Hoffmann *et al.* 2010). Estas sustancias liberadas permiten atacar a patógenos extracelulares de gran tamaño que no pueden ser fagocitados, como los helmintos (Noël, Raes *et al.* 2004). Sin

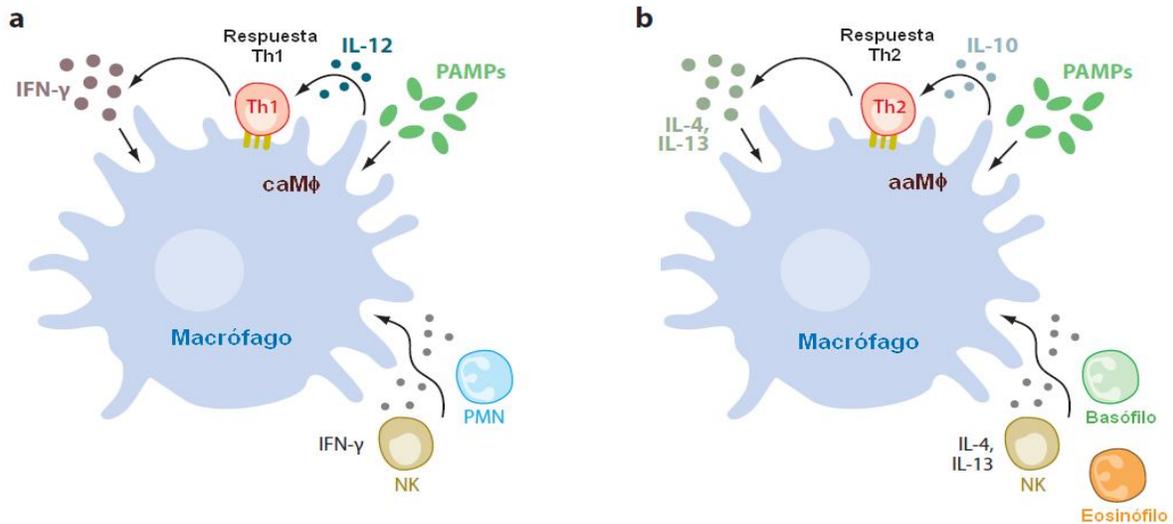
embargo, su principal función es la protección contra patógenos intracelulares (Gordon and Martinez 2010).

Un estímulo de la inmunidad adaptativa es necesario para mantener este estado de activación, el cual es generalmente dado por los linfocitos T<sub>H</sub>1 a través de la producción de IFN- $\gamma$ . Esto estimula la inflamación aguda por la secreción de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y quimiocinas; lo anterior consiste en producir inflamación local con muchos neutrófilos, los cuales fagocitan y destruyen microorganismos infecciosos. También se liberan citocinas como IL-12, hay un incremento en la expresión del MHC clase II y moléculas coestimuladoras con lo que se aumenta la capacidad de presentación de antígeno. Las citocinas pro-inflamatorias son importantes componentes de la respuesta del huésped, pero después de la exposición prolongada pueden causar gran daño (Mosser and Edwards 2008; Abbas, Lichtman *et al.* 2009).

### **Activación alternativa.**

Los M $\phi$  al entrar en contacto con las citocinas de tipo T<sub>H</sub>2, IL-4 o IL-13 cambian su perfil a uno conocido como macrófago alternativamente activado (aaM $\phi$ ), estos macrófagos son antagonisticamente regulados por citocinas T<sub>H</sub>1, ya que los aaM $\phi$  secretan moléculas antiinflamatorias que disminuyen los procesos inflamatorios iniciados por los caM $\phi$ . Por lo anterior, se acepta que los aaM $\phi$  contrarrestan la inflamación y los mecanismos celulares efectores, con funciones reguladoras e inhibitorias, responden a citocinas T<sub>H</sub>2 y como respuesta regulan las funciones de las células T CD4<sup>+</sup> (Abbas, Lichtman *et al.* 2009; Gordon and Martinez 2010).

Al activarse este fenotipo, los aaM $\phi$  producen quimiocinas que promueven el reclutamiento y la activación de eosinófilos, mastocitos, basófilos y neutrófilos (Gordon and Martinez 2010). A su vez, regulan positivamente la expresión en los macrófagos del receptor de manosa (MMR) y de moléculas del MHC clase II, así como de enzimas intracelulares como la arginasa (Gordon 2003). Sus diferencias con los caM $\phi$  son de hasta un 25% en la expresión de genes (Ehrt, Schnappinger *et al.* 2001), así como la inhibición de iNOS y el oxígeno, por lo que su capacidad de eliminar patógenos intracelulares queda comprometida e incluso tiene actividad supresora sobre las células T (Martinez, Helming *et al.* 2009; Gordon and Martinez 2010). Estos aaM $\phi$  pueden ser identificados debido a la alta expresión de Ym1, Fizz1, Arg1 y MRC1.



**Figura 2.** Modelo de activación de los macrófagos en la respuesta inmune. La activación completa de los macrófagos requiere de dos señales: el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por patrones de reconocimiento de patógenos (PRRs) y la estimulación con IFN- $\gamma$  o IL-4, lo cual determina sus funciones efectoras y especificidad durante la respuesta inmune. Para la respuesta  $T_H1$  (a), las quimiocinas inducidas por PRRs atraen a las células NK y linfocitos T naive productores de IFN- $\gamma$ , esto induce la activación clásica de los macrófagos (caM $\phi$ ), que estimulan la producción de IL-12. Para la respuesta  $T_H2$  (b), los PRRs inducen el reclutamiento de IL-4 e IL-13, lo cual produce células como eosinófilos, basófilos y linfocitos T naive. La IL-4 e IL-13 producidas por estas células induce macrófagos alternativamente activados (aaM $\phi$ ) y provee una señal para el desarrollo de la respuesta  $T_H2$ . La IL-4 innata y los PAMPs pueden estimular la secreción por los macrófagos de IL-10, que inhibe la señal de  $T_H1$ . Tomado de Martínez, Helming *et al* (2009).

Ym1 pertenece a una familia de moléculas tipo quitinasa, es fuertemente inducida en macrófagos por un estímulo celular  $T_H2$ . Se unen a la quitina de los insectos, huevos de helmintos y faringe de nematodos. El MRC1 contribuye a la unión con la quitina, la cual induce la respuesta  $T_H2$  (Gordon and Martínez 2010).

Fizz1, también conocido como Relm $\alpha$ , es una proteína producida por macrófagos, epitelios y eosinófilos, altamente inducible por IL-13. Esta proteína se une a los macrófagos y células T  $CD4^+$  efectoras, inhibiendo la producción de citocinas tipo  $T_H2$  por la vía Bruton tirosina-quinasa. Tiene un papel en el metabolismo, así como en la regulación diferencial de la migración de células T y eosinófilos (Gordon and Martínez 2010).

La presencia de estos aaM $\phi$  se establece durante las infecciones por helmintos, incluyendo las tres clases que son nematodos, trematodos y cestodos (Reyes, Terrazas *et al.* 2010).

#### **I. IV. PD-1/PD-Ls.**

Existe una familia de receptores conocida como la familia B7, los cuales se unen a receptores en linfocitos para regular la respuesta inmune. La activación de los linfocitos T y B se inicia por la acción del TCR o BCR, pero se requiere de señales adicionales, estas son proporcionadas por ligandos de la familia B7 que determinan la naturaleza de la respuesta inmune, ya que liberan señales co-estimuladoras o co-inhibidoras a través de su unión con moléculas de la familia CD28 de receptores en los linfocitos. La interacción de los miembros de la familia B7 con sus receptores puede, en caso de ser co-estimuladores aumentar la respuesta inmune o atenuarla e inducir tolerancia si interactúa con receptores co-inhibidores (Collins, Ling *et al.* 2005; Keir, Francisco *et al.* 2007).

Existen 7 miembros conocidos de esta familia, entre ellos se encuentran Programmed death ligand-1 (PD-L1) y Programmed death ligand-2 (PD-L2). Ambos son proteínas transmembrales caracterizadas por un dominio extracelular IgV e IgC, que son relativos a los dominios variables y constantes de las inmunoglobulinas (Collins, Ling *et al.* 2005). Tanto PD-L1 como PD-L2 son ligandos de PD-1, el cual es una glicoproteína transmembranal tipo I compuesta por un dominio extracelular tipo Ig variable, un dominio transmembranal y una cola citoplásmica responsable de la unión a moléculas señalizadoras. PD-1 es monomérico cuando se expresa en la superficie celular (Zhang, Schwartz *et al.* 2004) e inducible en células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, células T NK, B y monocitos después de la activación (Keir, Francisco *et al.* 2007).

Durante la interacción de PD-1 con alguno de sus dos ligandos, PD-1 libera señales negativas que tienen un profundo efecto sobre la actividad de células T y B (Zhang, Schwartz *et al.* 2004), mientras que PD-L1 y PD-L2 actúan como moléculas coestimuladoras o inhibitorias dependiendo del modelo experimental con el que se trabaje, y debido a esto, se ha sugerido la existencia de otro receptor para estos ligandos (Huber, Hoffmann *et al.* 2010).

### **I. IV. I. PD-Ls en infecciones por helmintos.**

Durante la infección con *Trypanosoma cruzi*, la expresión de la vía PD-1/PD-Ls se modificó en los M $\phi$  obtenidos de la cavidad peritoneal. Estos M $\phi$  suprimieron la proliferación de las células T y esto se restableció al añadir anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1. Sin embargo, al añadir anti-PD-L2 se incrementó la expresión y actividad de arginasa e IL-10 y el decremento en la expresión de iNOS e IFN- $\gamma$ , mejorando la proliferación del parásito. Este estudio nos dice que PD-L2 está involucrada en el balance de arginasa/iNOS durante la infección con *T. cruzi*, en el que tiene un papel protector en la respuesta inmune contra este parásito, por lo que proponen un papel co-estimulador para PD-L2 (Dulgerian, Garrido *et al.* 2011).

Huber, Hoffmann *et al.* (2010) encontraron que PD-L2 es inducido fuertemente por IL-4 en M $\phi$  y su expresión se relaciona con los marcadores de aaM $\phi$  como FIZZ1, arginasa1 y Ym1. Los anticuerpos contra PD-L2 bloquearon la actividad inhibitoria de los aaM $\phi$ , y en ratones STAT6<sup>-/-</sup> con la expresión retroviral de PD-L2 se logró inhibir la proliferación de las células T. Los ratones con infección por el helminto *Nippostrongylus brasiliensis* mostraron que la expresión de PD-L2 es dependiente de IL-4/IL-13 provenientes de células T<sub>H2</sub>. Al bloquear *in vivo* a PD-L2 durante la infección se logró una mejor respuesta T<sub>H2</sub> en el pulmón, indicando que los aaM $\phi$  inhiben a las células T<sub>H2</sub> por medio de la expresión de PD-L2.

A través de la alta expresión de moléculas del MHC y moléculas accesorias involucradas en la migración celular, adhesión y co-señalización, las DCs son las principales responsables de la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Kuipers, Muskens *et al.* (2006) examinaron el papel de los PD-Ls expresados por DCs sobre la activación de células T CD4<sup>+</sup> naïve, en el que estas células eran específicas para OVA y los TCR fueron estimulados a varios niveles. La sobreexpresión de PD-L1 y PD-L2 no inhibió la proliferación de las células T, pero al bloquear con anticuerpos anti-PD-1 se inhibió la activación de las células T, probablemente debido a la señalización dada por la vía PD-L1/PD-L2 en las DCs. Ellos proponen un papel inhibitorio para estos receptores en la activación de las células T CD4<sup>+</sup>.

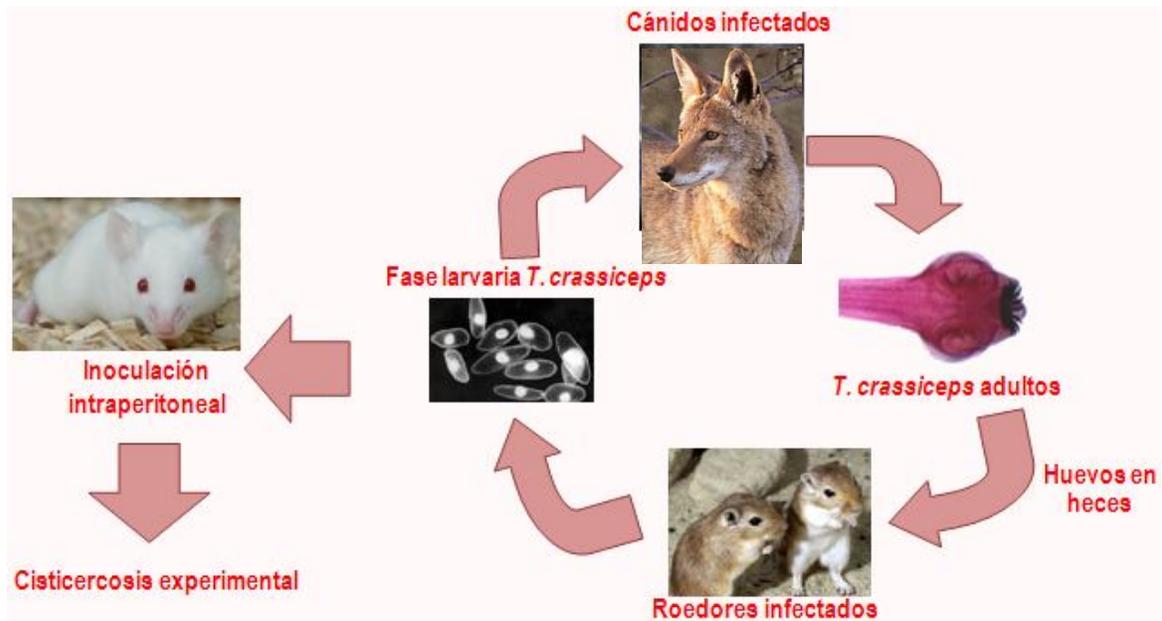
Terrazas, Montero *et al.* (2005) demostraron que posterior a la infección con *T. crassiceps* los macrófagos reclutados en cavidad peritoneal y co-cultivados con células T de ratones naïve previamente estimuladas con anticuerpos anti-CD3/CD28, eran capaces de inhibir la proliferación de

las células T naïve y el contacto célula-célula era necesario. Este efecto supresor fue independiente de IL-10, IFN- $\gamma$  y NO. Los transcritos obtenidos por RT-PCR mostraron altos niveles de Fizz1, arginasa1 y Ym1 en los M $\phi$  de cavidad peritoneal. Al analizar las moléculas de membrana expresadas en los M $\phi$  inducidos por *T. crassiceps* observaron que PD-L1 y PD-L2 estaban sobreexpresados y al bloquear a los PD-Ls o PD-1 se eliminó su capacidad de inhibir la proliferación de los linfocitos T. Por lo anterior, concluyeron que esta infección induce aaM $\phi$  con una potente actividad supresora que involucra a la vía PD-1/PD-Ls.

### **I. V. Modelo de cisticercosis experimental por *Taenia crassiceps*.**

*Taenia crassiceps* es un parásito helminto que durante su fase larvaria o metacéstodo requiere un hospedero intermediario (roedores) y en la fase adulta de un hospedero definitivo (cánidos). En los roedores se localizan en tejidos subcutáneos, cavidad peritoneal y pleural y en cánidos es en el intestino delgado. La infección experimental con metacéstodos ha sido utilizada durante años en ratones de laboratorio. Existen diversas cepas de *T. crassiceps* que han sido aisladas para su utilización en diferentes estudios, entre ellas se pueden mencionar a las cepas HYG, KBS, Toi, ORF y WFU. Durante la realización de este estudio se utilizó a la cepa estéril ORF (Willms and Zurabian 2010).

Los ratones hembra de la cepa BALB/c son más susceptibles que los machos a la infección con *T. crassiceps*, esto se debe a la presencia de hormonas sexuales. Durante la infección con 10 metacéstodos, se describió que la respuesta tipo T<sub>H</sub>1 es rápida y transitoria durante las dos primeras semanas de infección, mientras que a partir de las cuatro semanas predomina la respuesta tipo T<sub>H</sub>2 (Terrazas, Bojalil *et al.* 1998).



**Figura 3.** Ciclo de vida *T. crassiceps*. El helminto en su fase adulta infecta cánidos, hospedándose en intestino delgado. La fase adulta libera proglótidos grávidos contenidos en las heces, las cuales al ser ingeridas por roedores se desarrolla en la fase larvaria del parásito (cisticercos). El metacéstodo puede alojarse en músculo o tejido subcutáneo, con la característica de reproducirse asexualmente por medio de gemación. Cuando los cánidos se alimentan de roedores infectados el ciclo vital se completa. En el laboratorio infectamos ratones BALB/c con 10 cisticercos en la cavidad peritoneal.

### I. V. I. Respuesta a *T. crassiceps*.

La infección crónica con este helminto induce una población de aaM $\phi$ , los cuales comienzan a ser reclutados a las 3 semanas p.i. (post-infección). Estos aaM $\phi$  son células que exhiben una alta expresión de arginasa1, Ym1 y Fizz1 un incremento en MHC clase II, F4/80, MR, IL-4R, también son capaces de presentar antígeno pero la respuesta proliferativa que inducen es defectuosa. Este efecto parece involucrar una ruta contacto dependiente, que se asocia al incremento en la expresión de PD-L1 y PD-L2 en los aaM $\phi$  (Terrazas, Montero *et al.* 2005; Sharpe, Wherry *et al.* 2007; Gordon and Martinez 2010; Reyes, Terrazas *et al.* 2010). Estos macrófagos tienen la habilidad de suprimir la proliferación de las células T *in vitro*, en una forma contacto celular dependiente por el incremento de la expresión de PD-L1 y PD-L2. La intensidad en la expresión de estas moléculas es importante para inducir una señal negativa que dispare los efectos inhibidores en las células T activadas (Terrazas, Montero *et al.* 2005).

Además de activar la vía  $T_H2$ , la infección con *T. crassiceps* puede regular otras funciones de los linfocitos *in vivo*, sugiriendo que la infección puede producir una fuerte modulación de la respuesta inmune (Terrazas, Montero *et al.* 2005) a través de los aaM $\phi$ , ya que la presencia de estas células favorece la supervivencia del parásito, mientras que su ausencia favorece la resistencia del hospedero contra el cisticerco (Reyes, Terrazas *et al.* 2010).

## II. HIPÓTESIS

Si la inducción de aaMφ durante la infección con *Taenia crassiceps* generan inmunomodulación con alta expresión de moléculas PD-L1 y PD-L2, entonces al unirse a su receptor PD-1 llevará a los aaMφ a exacerbar sus actividades.

### III. OBJETIVOS

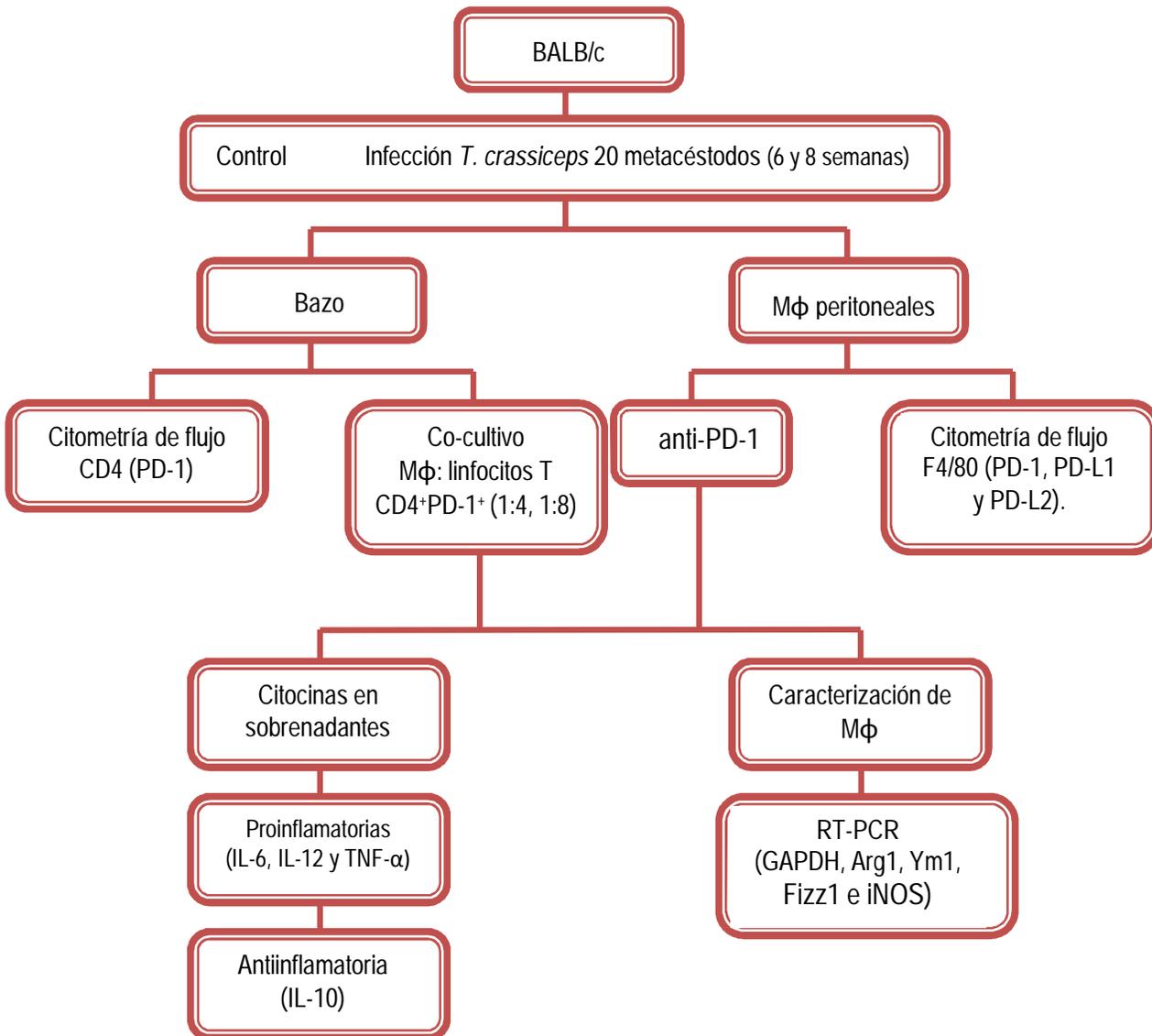
#### **Objetivo general.**

Caracterizar el perfil que desarrollan los aaMφ posterior a la interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresando PD-1 durante la infección experimental con *Taenia crassiceps*.

#### **Objetivos particulares.**

- Determinar la presencia de las moléculas PD-1, PD-L1 y PD-L2 en la membrana de aaMφ y de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.
- Determinar el estado de activación de los aaMφ por medio de RT-PCR.
- Analizar la producción de citocinas en aaMφ posterior a la interacción con linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

## Estrategia experimental



**Figura 4:** Diseño experimental. Los macrófagos de cavidad peritoneal fueron recuperados y se dejaron adherir por dos horas. Se obtuvieron esplencitos de bazo, separando por medio de columnas las células CD4<sup>+</sup>, posterior a esto fueron fijadas con paraformaldehído. Los macrófagos fueron estimulados con anti-PD-1 y otros co-cultivados con linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> en relación 1:4 y 1:8 durante 24 horas. Los sobrenadantes se analizaron por ELISA sándwich y las células mediante citometría de flujo y RT-PCR.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV. I. Animales experimentales.**

Los ratones manejados fueron hembras cepa BALB/c de seis a diez semanas de edad mantenidas en cajas de policarbonato para ratones en el bioterio de la FES-Iztacala de acuerdo al reglamento del mismo. Se manejaron dos grupos con cinco ratones para cada uno, un grupo control al que se le inyectó intraperitonealmente (i.p.) 1.5 mL de solución de tioglicolato por ratón cuatro días antes del sacrificio y un grupo con infección crónica de *T. crassiceps* (6 y 8 semanas).

#### ***Infección y mantenimiento de la cepa del parásito Taenia crassiceps en el laboratorio.***

La infección se realizó por inyección i.p. de 20 metacéstodos de *T. crassiceps* cepa ORF de aproximadamente dos mm de diámetro sin gemaciones, suspendidos en aproximadamente 300µl de solución salina, los cuales fueron recuperados de ratones previamente infectados de 8 a 12 semanas. Para mantener la cepa se realizaron pases sucesivos en ratones hembras BALB/c, con la misma cantidad de parásitos. Los pases se realizaron durante todo el proyecto.

### **IV. II Sacrificio de ratones BALB/c.**

En la etapa crónica de la infección (6 y 8 semanas p.i.), se sacrificaron cinco ratones de cada grupo experimental. El sacrificio se realizó en cámara de CO<sub>2</sub>.

#### ***Obtención de macrófagos***

Posterior al sacrificio en condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar (VECO) se inyectó i.p. 5mL de solución salina estéril (Pisa) para realizar lavado peritoneal, con una jeringa se recuperaron las células totales del peritoneo (PECs) y parásitos, colocándolos en tubos de 15mL. Los parásitos fueron contados para determinar la carga parasitaria por ratón.

Los metacéstodos se sedimentaron y el sobrenadante que contenía a las células se separó. Para concentrar las células, este sobrenadante se centrifugó a 2500rpm durante diez minutos, se decantó y resuspendió en 5mL de medio D-MEM (Gibco, suplementado con D-glucosa y libre de L-Glutamina, 10% SFB y estreptomina) para homogenizar y contar las células viables utilizando la

prueba de exclusión con azul de Tripano, tomando 20µl de muestra y 20µl de azul de Tripano (Sigma Chemicals Co). En la cámara de Neubauer se colocaron 10µl con micropipeta estéril del homogenizado y se contaron cuatro cuadrantes para obtener el número de células por mililitro y de esta forma ajustar a  $1 \times 10^6$  células/mL con medio D-MEM. Se colocaron 1000µl por pozo en dos placas de cultivo celular de seis pozos (B. D. Falcon), se incubaron dos horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> para que se adhirieran los Mφ.

### ***Obtención de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.***

Por otro lado, en las mismas condiciones de esterilidad, se extrajo el bazo de los ratones colocándolo en una caja Petri, posteriormente se separaron las células del resto del tejido y se maceró en separadores celulares (B.D. Falcon, cell strainer) con émbolos estériles de jeringas, y finalmente se depositaron las células en tubos estériles de 10mL (Nalge, Nunc Int). Para concentrar las células, se centrifugó a 3000rpm por diez minutos, se decantó y resuspendió en 3mL de solución hemolizante durante 15 minutos para lisis a los eritrocitos restantes.

Transcurrido este tiempo, se centrifugaron por diez minutos a 3000rpm y se decantaron. A las células libres de eritrocitos se les agregó 1mL de medio D-MEM para homogenizar y contar las células viables utilizando azul de Tripano, realizando la cuenta y ajuste antes mencionados.

Posteriormente al ajuste a  $1 \times 10^6$  células/mL, se centrifugaron las células a 1500rpm durante diez minutos, se decantaron y resuspendieron en buffer de separación, y se agregaron 10µl de anticuerpo con esferas magnéticas dirigidos contra células T CD4<sup>+</sup>, incubando durante 15 minutos a 4°C, se lavó con 5mL de buffer de separación. Se centrifugó y resuspendieron en 0.5mL de buffer de separación. Las células fluyeron por una columna MS/RS vario Macs en campo magnético para aislar las células T CD4<sup>+</sup>, se agregaron dos veces 500µl de buffer de separación. Después se quitó la columna del campo magnético y se recolectaron las células en un tubo estéril, al cual se le adicionó 1000µL de D-MEM y se procedió a contar ajustando las células a  $1 \times 10^6$ . Inmediatamente, se centrifugó a 2000 rpm diez minutos, se resuspendió en 500µl de paraformaldehído y se dejó reposando por cinco minutos. Posteriormente se adicionó 5mL de solución salina, se centrifugó diez minutos a 1500rpm y se decantó, esto se realizó tres veces.

#### **IV. II. I. Estimulación de macrófagos.**

Transcurridas las dos horas de pegado de los M $\phi$ , se eliminaron las células no adherentes lavando dos veces con 3mL de solución salina a temperatura ambiente y en esterilidad. Para cada grupo de M $\phi$  se realizaron co-cultivos con linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> en relación 1:0, 1:4 y 1:8 (M $\phi$ : T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>), así como la adición del anticuerpo anti-PD-1. El contacto célula-célula o célula-anticuerpo fue durante 18 horas en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y terminando el tiempo indicado, se recolectaron los sobrenadantes y congelaron a -70°C hasta su uso para cuantificar la producción de citocinas por ELISA.

Se realizó un experimento adicional a las seis semanas p.i., el co-cultivo fue en relación 1:4 utilizando linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> provenientes de ratones control o linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> de la infección con *T. crassiceps*. Las condiciones de cultivo y extracción del RNA fueron las ya descritas.

#### **IV. III. Obtención de RNA de M $\phi$ peritoneales.**

Para evitar que el material genético de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> se mezclara con el de los macrófagos, las células T se retiraron por medio de lavados con 3mL de solución salina estéril a temperatura ambiente se agitó suavemente y se desechó, lo anterior se realizó en tres ocasiones. Después de los anterior, se adicionó 500 $\mu$ l de Trizol (Invitrogen) a las células adherentes, se tomó el líquido con una micropipeta y puntas libres de RNAsas, a continuación se depositó en tubos de 1.8mL (Eppendorf) para almacenarlos a -70°C hasta su uso.

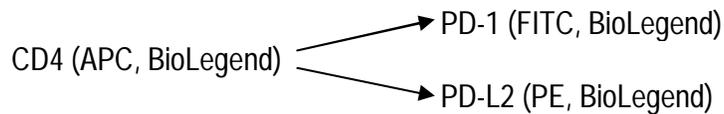
#### **IV. IV. Citometría de flujo para detección de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en M $\phi$ y linfocitos T CD4<sup>+</sup>.**

Al cumplirse las seis y ocho semanas post-infección se analizaron las células reclutadas en la cavidad peritoneal y las provenientes de la perfusión del bazo. Los ratones se sacrificaron en campana de flujo, se inyectaron i.p. con 25mL de solución salina estéril para realizar el lavado peritoneal y con la jeringa se recuperaron las PECs. Los bazos fueron macerados en separadores celulares con émbolos de jeringas, centrifugados a 3000rpm por diez minutos, se decantó y resuspendió en 3mL de solución hemolizante durante 15 minutos, posteriormente se centrifugaron

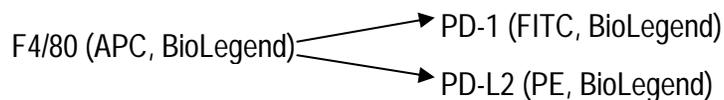
por diez minutos a 3000 rpm, se decantaron y resuspendieron en 1mL de medio DMEM para homogenizar. Tanto PECs como las células de bazo se colocaron en tubos de 15mL.

Los tubos con las células tanto de bazo como de cavidad peritoneal se centrifugaron diez minutos a 2000rpm, se decantó el sobrenadante dentro de la campana, se resuspendió el botón celular y se agregaron 3mL de buffer de FACS (Apéndice 1) a cada tubo. Se homogenizó y se contó en cámara de Neubauer, se ajustó con buffer de FACS a  $1 \times 10^6$  células/mL y se colocaron en tubos para análisis de citometría de flujo (B. D. Falcon).

A estas células se les agregó 200 $\mu$ l del mismo buffer y 1 $\mu$ l de anticuerpos conjugados con los distintos marcadores de fluorescencia y un anticuerpo isotipo (IgG2a) como control para pegado inespecífico, a una concentración de 0.2 $\mu$ g, para las células de bazo de la siguiente manera:



Para las PECs fue:



Una vez agregados los anticuerpos se incubaron por 30 minutos a 4°C, transcurrido el tiempo se lavaron las células con 500 $\mu$ l de buffer de FACS y se centrifugó a 4000rpm durante diez minutos para eliminar los anticuerpos no adheridos, para terminar se les agregaron 500 $\mu$ l de buffer de FACS para su lectura en el programa Cell Quest y el citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) para la captura de cada muestra.

#### **IV. V. Ensayo de RT-PCR para determinar el estado de activación de los macrófagos.**

Se descongelaron las muestras para obtener el RNA total por medio de la técnica fenol-cloroformo, se agregaron 220µl de cloroformo frío a cada muestra, se agitó en el vortex 30 segundos para proceder a centrifugar a 11500rpm por 12 minutos. Se recuperó la fase transparente, la cual se colocó en otros tubos con 500µl de isopropanol frío manteniéndolos 15 minutos a -20°C. Se centrifugó 15 minutos a 11500rpm para obtener el concentrado de RNA el cual se resuspendió y se lavó con 1mL de etanol al 75% que se centrifugó a 10000rpm por diez minutos, al terminar se decantó sin perder la pastilla para que se seque a temperatura ambiente y se almacenó con 20µl de agua estéril a -70°C hasta su uso.

##### ***Transcripción reversa para la elaboración de DNA complementario (cDNA).***

Se utilizó el kit First Strand Synthesis Superscript II, se utilizaron 2µg de RNA total y se siguió el protocolo propuesto por el proveedor, el cual se describe a continuación:

En la campana de flujo laminar (VECO) se mezclaron los componentes del kit en tubos libres de RNAsas de 0.2ml. El volumen que contenía los 2µg de RNA total se ajustó a 11µl con agua de grado molecular para cada reacción, posteriormente a cada muestra se le agregó 1µl de oligo dT (0.5µM), después se incubaron por cinco minutos a 65°C en el termociclador (Corbett Research).

Al concluir, a cada tubo se les adicionó los siguientes componentes:

Buffer 5x RT	4µl
Ribolock	1µl
dNTP's 10mM	2µl
Superscript	1µl

Se agitaron suavemente los tubos e incubaron un minuto a 42°C, después cinco minutos a 70°C. Para terminar esta reacción, los tubos se colocaron a 10°C por tres minutos. Una vez terminado el procedimiento anterior se realizó una dilución 1:200 de la muestra en agua de grado molecular, para de esta forma cuantificar la cantidad de cDNA obtenido, se leyó a 260nm en un espectrofotómetro y se almacenó a -70°C hasta su uso.

### ***Amplificación de cDNA.***

Se determinó la cantidad de cDNA con el objetivo de realizar un análisis semicuantitativo de diferencias en la transcripción de los diferentes genes analizados, los cuales son marcadores de activación alternativa (GAPDH, FIZZ1, Ym1, Arg1 e iNOS). Los primers específicos que se utilizaron para cada gen y la temperatura de alineación que se utilizó en el termociclador con el programa Palmcycler System Manager Pocket Pc, 2003 son detallados en el apéndice II.

Las reacciones fueron realizadas en tubos nuevos y libres de DNAsas con capacidad de 0.2ml. A cada muestra se les agregaron los siguientes volúmenes:

Buffer 10x	2.5µl
dNTPs mix 10mM	0.5µl
Primer F 50pM	1µl
Primer R 50pM	1µl
Taq Polimerasa 5U/µl	0.5µl

Las mezclas fueron llevadas a un volumen final de 23µl con agua de grado molecular.

### ***Electroforesis del gen amplificado.***

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1x con midory green en una cámara molde que se solidificó a temperatura ambiente. Se tomaron 10µl de las muestras y se colocó en el primer pozo 3µl de marcador de peso molecular de 100 pb y el gel se corrió durante 30 minutos a 100 volts. Después de este tiempo se observó en un scanner con luz UV y se capturaron las imágenes de las bandas obtenidas por medio del sistema de documentación de geles (BioSens SC 645).

## **IV. VI. Determinación de citocinas por medio de la técnica ELISA (Sandwich).**

Las muestras de sobrenadante obtenidas a las 6 y 8 semanas p.i. y mantenidas a -70°C fueron analizadas bajo esta técnica. Se utilizaron los anticuerpos (Peprotech) para detectar IL-1β, IL-12, IL-10, IL-6 y TNF-α. En todos los casos, se siguieron las indicaciones del proveedor como se describe a continuación:

### ***Sensibilización de la placa.***

Se diluyó el anticuerpo de captura 2µg/ml en PBS, se homogenizó y se colocaron 100µl por pozo utilizando una micropipeta multicanal en una placa de ELISA de 96 pozos (NUNC, Maxisorp). Para que la reacción de pegado del anticuerpo se llevara a cabo, la placa se incubó a 4°C toda la noche en oscuridad.

### ***Muestras y curva.***

Al día siguiente se llevó la placa a temperatura ambiente y se lavó cuatro veces con PBS-Tween, se secó por aspiración y se bloqueó con 200µl buffer de bloqueo durante una hora a 37°C para evitar pegado inespecífico, después se lavó tres veces más y se secó por aspiración. Se utilizaron 100µl de sobrenadante, las muestras se colocaron en los pozos correspondientes, se realizó una curva patrón con la citocina recombinante murina correspondiente para poder extrapolar los valores de densidad óptica, con diluciones al doble para cada una de las placas y se utilizaron las dos primeras líneas. Las curvas se iniciaron de 50 a 0.01 ng y se incubó la placa toda la noche a 4°C.

### ***Revelado del ELISA.***

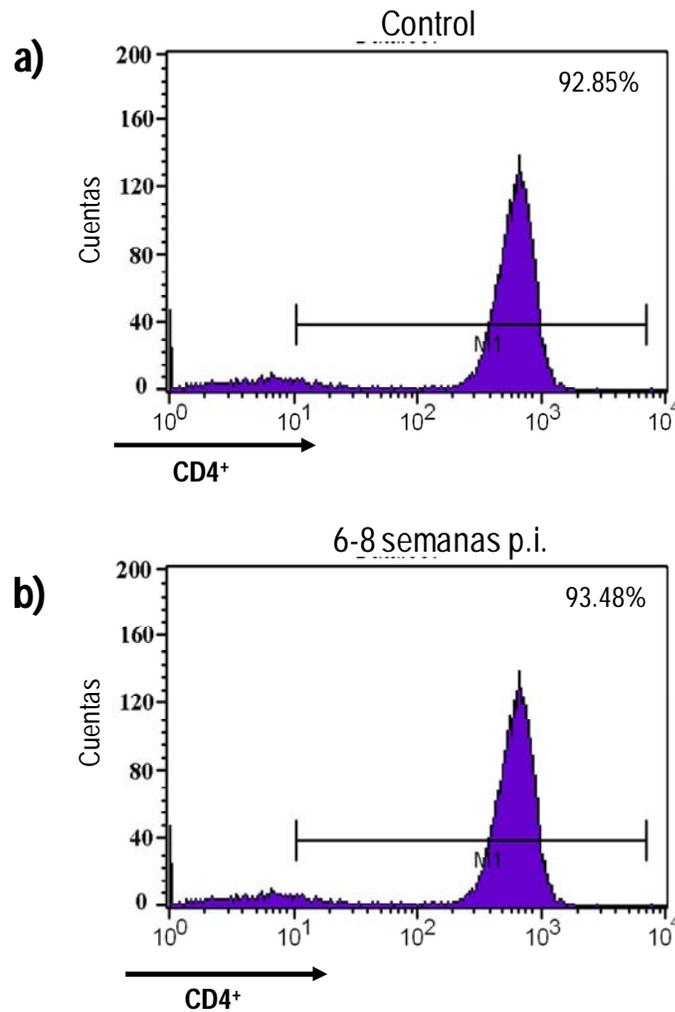
La placa se llevó a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces y se secó por aspiración para adicionar el anticuerpo correspondiente a cada citocina marcado con biotina en un volumen de 100µl por pozo de una dilución de 2µg/ml de anticuerpo con biotina en PBS, se incubó por una hora a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se lavó cuatro veces la placa y se secó por aspiración. Se preparó una dilución de 1:5000 de enzima streptoavidina peroxidasa (PeproTech Inc) en PBS, para obtener un volumen final de 10mL de esta dilución y colocar 100µl por pozo para dejar incubar las placas por 30 minutos a temperatura ambiente.

Por último, se lavó seis veces la placa después de la incubación con la enzima y se preparó la solución de revelado que consiste en 100µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (J.T. Baker) en 10mL de ABTS para poner 100µl por pozo, se dejó a temperatura ambiente diez minutos y se llevó al lector de placa (Thermo Labsystems, Multiskan Ascent), utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

## V. RESULTADOS

### V. I. Determinación del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> posterior a la purificación.

Los linfocitos T obtenidos del bazo fueron analizados por medio de citometría de flujo para verificar que posterior a su purificación, la mayoría de estas células fueran CD4<sup>+</sup>. En los animales control el 92.85% de las células obtenidas mediante la purificación fueron CD4<sup>+</sup> (Figura 5a). Las células CD4<sup>+</sup> provenientes de animales con 6-8 semanas p.i. fueron el 93.48% (Figura 5b).



**Figura 5:** Histogramas obtenidos al analizar la presencia de CD4<sup>+</sup> en las células obtenidas de la purificación. a) Alrededor del 92% de las células provenientes de los animales control son células CD4<sup>+</sup>. b) Las células provenientes de animales infectados de seis y ocho semanas tiene el 93% de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

## V. II. Análisis de las células T CD4<sup>+</sup> de bazo y células peritoneales en la fase crónica de la infección.

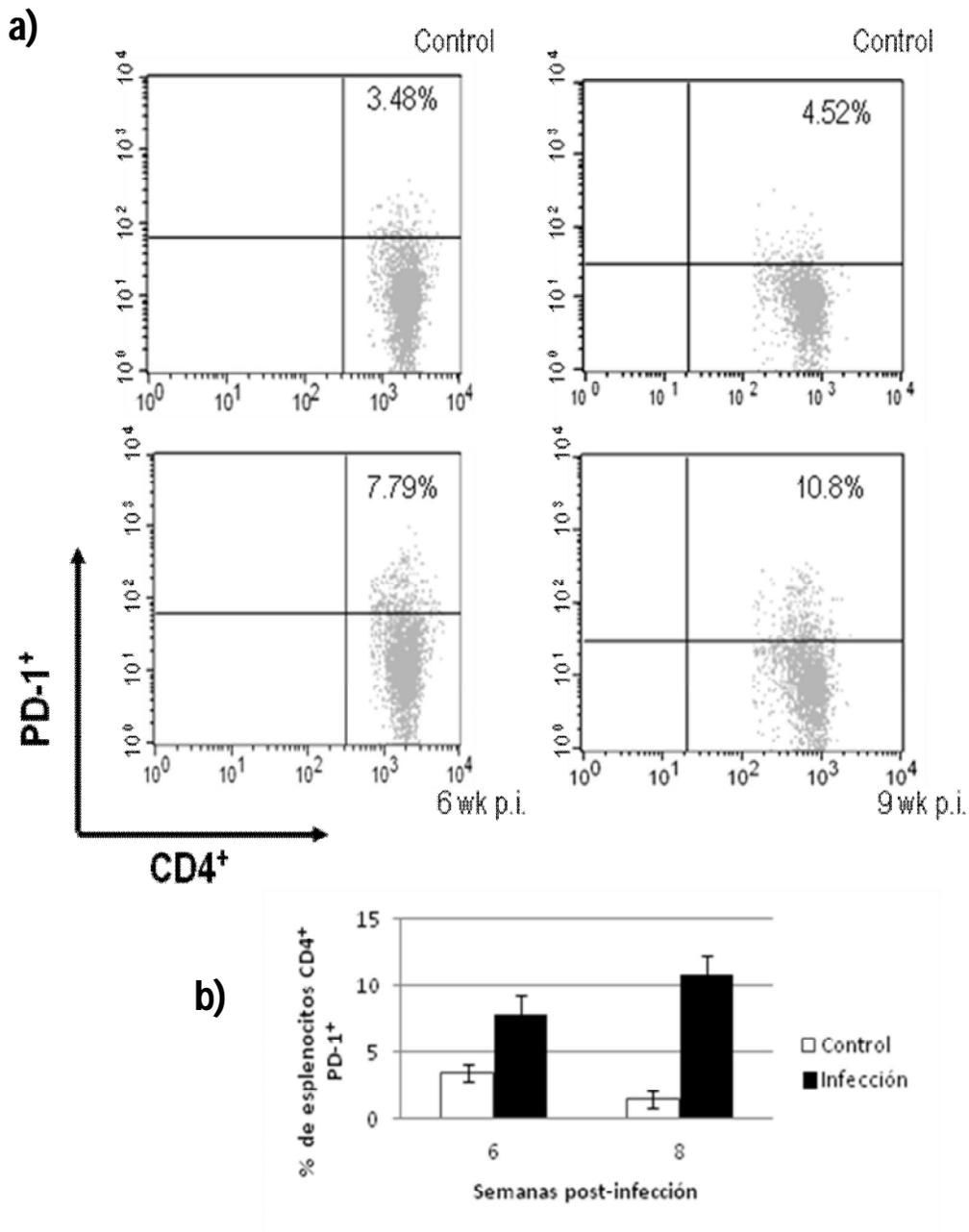
Por otro lado, estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron analizados en busca de la expresión del receptor PD-1, ya que es la población celular que fue utilizada para estimular a los macrófagos posteriormente. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de animales control expresan constitutivamente a PD-1, aunque no en grandes cantidades, sin embargo, después de seis y ocho semanas de infección la expresión de esta molécula en membrana aumenta al doble (Figura 6).

Las células peritoneales también se analizaron mediante esta técnica. Los M $\phi$  fueron marcados con F4/80, molécula característica de esta población celular, así como con PD-1 y/o sus ligandos. Se comprobó que PD-L1 y PD-L2 están expresados en la membrana de los aaM $\phi$ , pero adicionalmente se encontró a PD-1 en estas células (Figura 7). Este receptor se expresa en bajas cantidades en los macrófagos de animales control, mientras que a las seis semanas p.i. alrededor del 21% de los aaM $\phi$  lo expresan en membrana y esto aumenta a las ocho semanas p.i. con casi el 39% de los aaM $\phi$  expresándolo. Este patrón en su expresión coincide con lo visto en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> donde aumenta conforme se llega a un estado crónico en la infección.

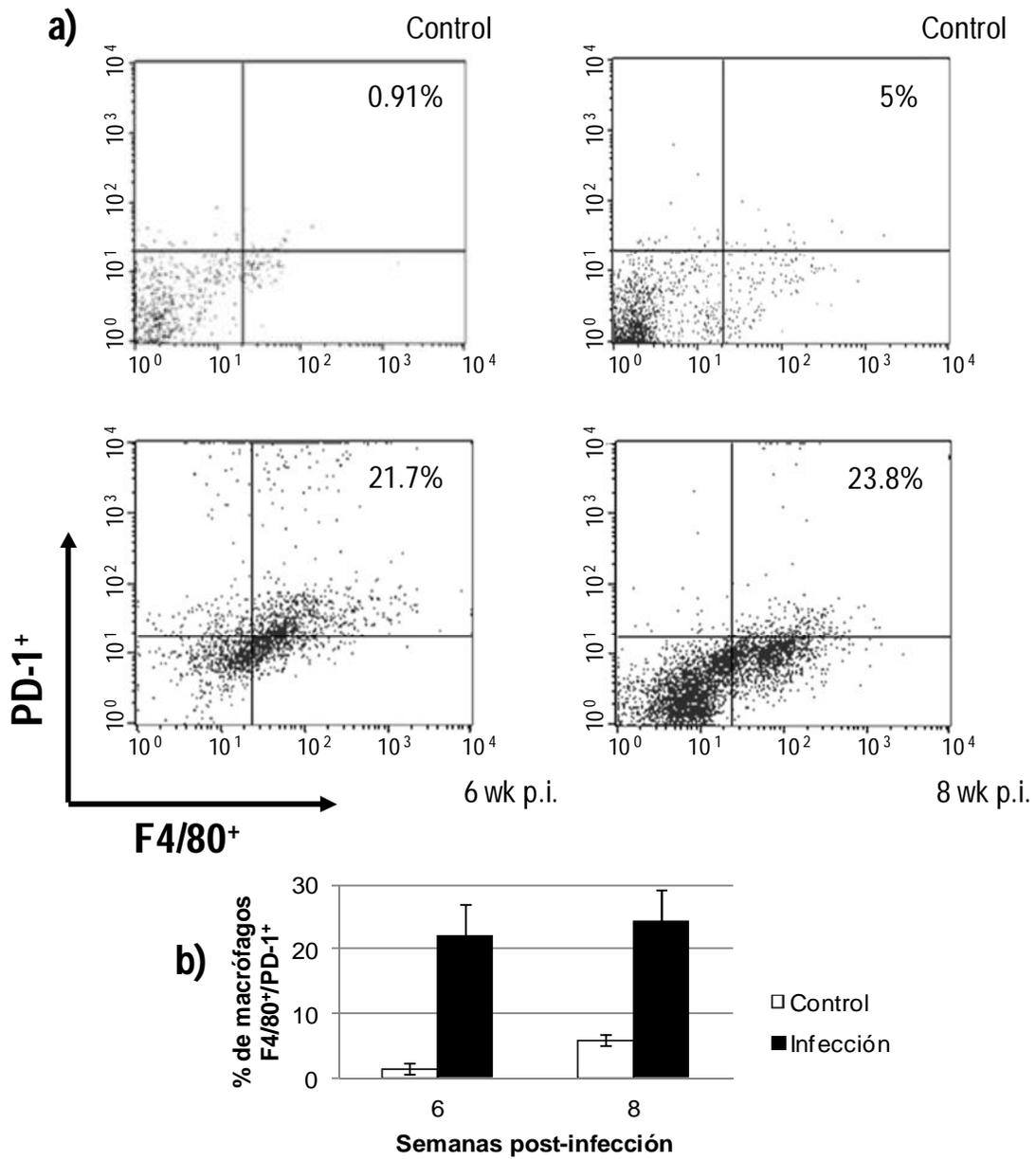
En animales control se encontró que la expresión de PD-L1 era alta (alrededor del 25%) y las seis semanas p.i. su expresión aumentó de manera considerable (42.9%); a las ocho semanas su expresión decreció al 30%, aunque siguen existiendo diferencias con respecto al control (Figura 8).

Por otro lado, PD-L2, al ser una molécula inducible, se expresa alrededor de tres veces más en la membrana de macrófagos peritoneales que han estado en contacto con *T. crassiceps* con respecto al grupo control (Figura 9).

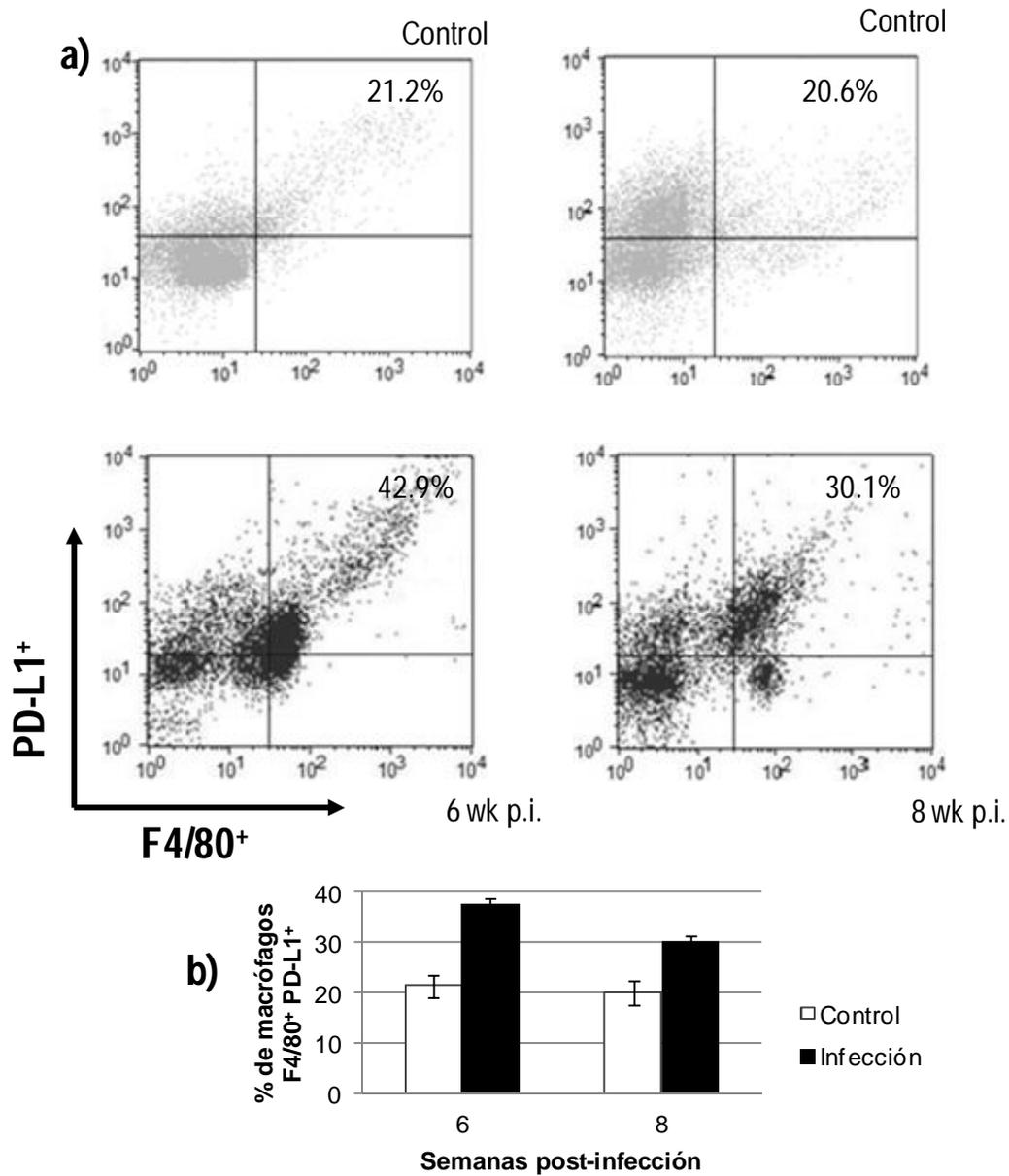
Otras moléculas como TLR2, TLR4 y MHC clase II se buscaron en la superficie membranal de los macrófagos con la finalidad de ver si este tipo de respuesta los llevaba a sobrerregular la expresión de estos receptores. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos control y los grupos experimentales (datos no mostrados).



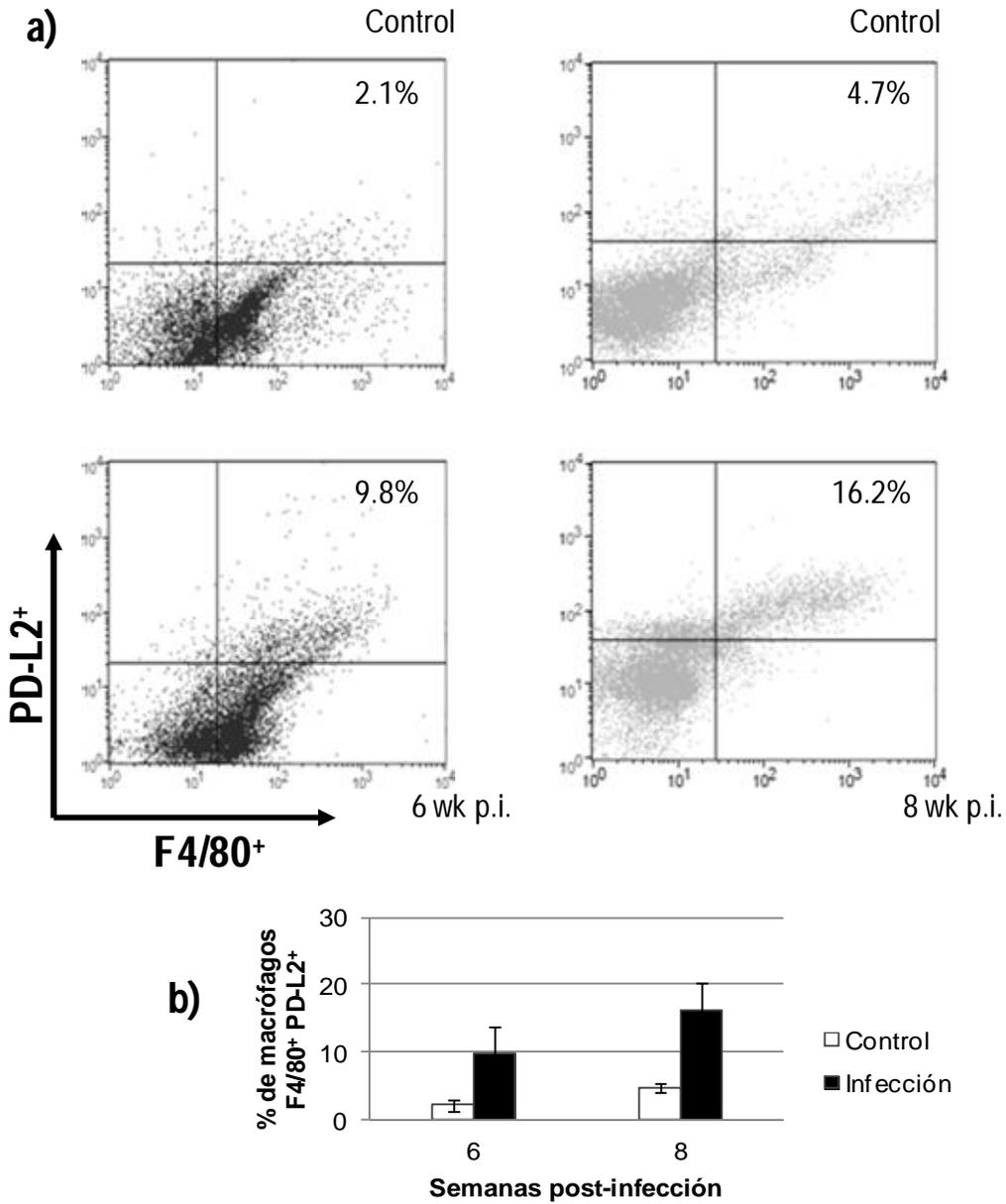
**Figura 6:** Citometría de flujo de las células de bazo totales de ratones BALB/c. En los tiempos indicados las células fueron procesadas con los anticuerpos ya mencionados para realizar este ensayo. a) El curso temporal de la expresión de PD-1 se asocia al transcurso de la infección en los linfocitos T CD4+. Se muestran dot plots del aumento significativo, al doble en animales infectados con respecto a animales control. b) Representación gráfica del porcentaje de células CD4+ PD-1+, \*  $p < 0.01$ .



**Figura 7:** Citometría de flujo de células peritoneales totales. a) En este análisis, utilizando los anticuerpos anti-F4/80 y anti-PD-1 encontramos que los aaM $\phi$  presentan un aumento en el receptor PD-1 comparado con los M $\phi$  de animales controles. Mientras avanza la infección la expresión del receptor incrementa. b) Al comparar el porcentaje de células F4/80<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> entre los grupos experimentales, notamos un aumento en este porcentaje en los ratones con infección crónica. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. \*  $p < 0.01$ .



**Figura 8:** Análisis por citometría de flujo de los macrófagos usando anticuerpo contra F4/80 y PD-L1. a) El curso temporal de la expresión de PD-L1 se asocia con la capacidad supresora de los aaM $\phi$ , ya que hay un aumento significativo entre estos y los M $\phi$  de animales control. b) Representación gráfica del porcentaje de células F4/80<sup>+</sup> PD-L1<sup>+</sup> donde se ven diferencias significativas entre el grupo control y con seis u ocho semanas p.i., \*p<0.01.



**Figura 9:** Análisis por citometría de flujo de la molécula PD-L2 en los macrófagos. a) Usando anticuerpos anti-F4/80 y anti-PD-L2 observamos un aumento significativo en la expresión del ligando de PD-1 en los aaMφ con respecto a los Mφ de animales control, también aumentó conforme la infección avanzó. Esto se asocia a la actividad supresora de los aaMφ. b) Representación gráfica del porcentaje de células F4/80+ PD-L2+, \*p<0.01.

### **V. III. Determinación del perfil de citocinas de los M $\phi$ posterior a la interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>.**

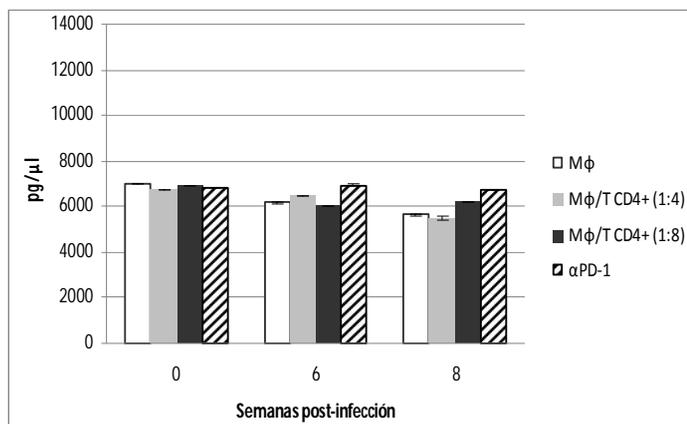
Posterior a la interacción de M $\phi$ :linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> en las condiciones y proporciones ya descritas, se midieron las citocinas asociadas a la pro-inflamación como IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-6, y la citocina anti-inflamatoria IL-10.

No se obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes grupos para IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-10 (Figura 10a, 10c y 10d). La citocina IL-6 mostró diferencias significativas entre los grupos, ya que los M $\phi$  de animales controles sólo incrementaron ligeramente la producción de IL-6 al ser estimulados con anticuerpo anti-PD-1 (Figura 10b).

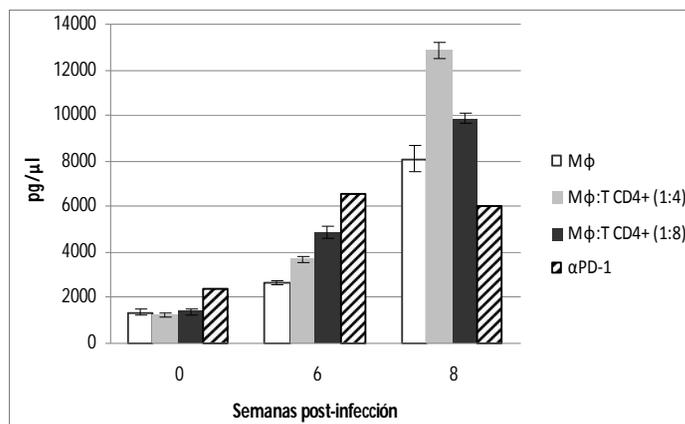
A las seis semanas p.i. el nivel basal de IL-6 no tuvo diferencias significativas con respecto al control estimulado con anti-PD-1, pero sí las hubo con respecto a los que estaban en contacto con los linfocitos. Los aaM $\phi$  de seis semanas que fueron cultivados en relación 1:4 tuvieron diferencias significativas con respecto al control, ya que la producción de IL-6 aumentó. En la relación 1:8 esta citocina también tuvo diferencias significativas con respecto a las anteriores al aumentar, mientras que al estimular con anti-PD-1 la secreción de IL-6 aumentó significativamente con respecto a todos los anteriores (Figura 10b).

A las ocho semanas p.i., los niveles de IL-6 aumentaron en la relación 1:4 con respecto al control y a los que estuvieron en relación 1:8, sin embargo, estos últimos tienen diferencias significativas con respecto al control. En cambio al estimular con anti-PD-1 la producción de esta citocina decayó significativamente. Estos resultados nos indican que la interacción M $\phi$ : linfocito T tiene efecto sobre la población de macrófagos y no sólo sobre las células T (Figura 10b).

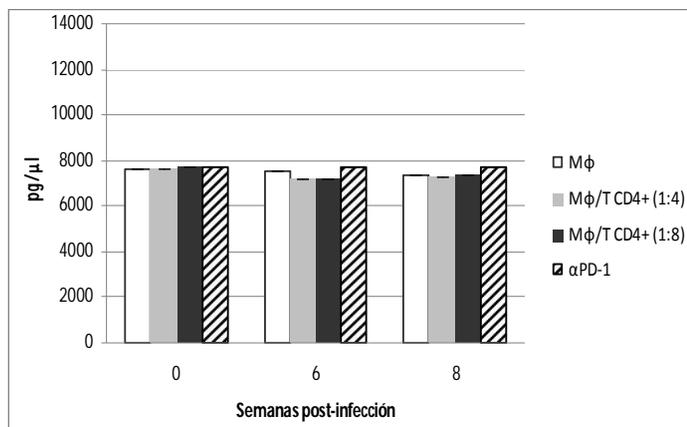
a) IL-1 $\beta$



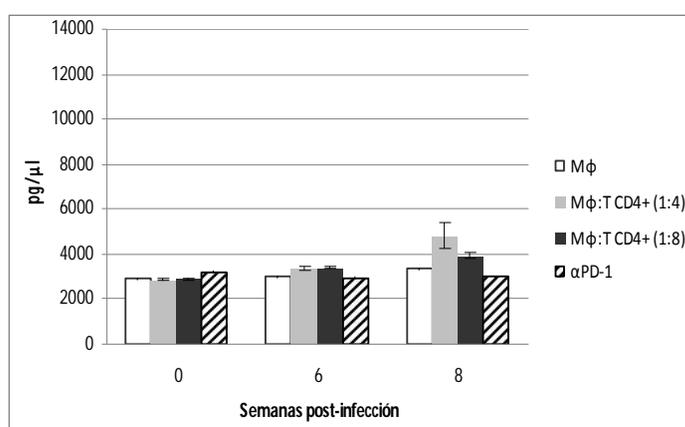
b) IL-6



c) IL-10



d) IL-12

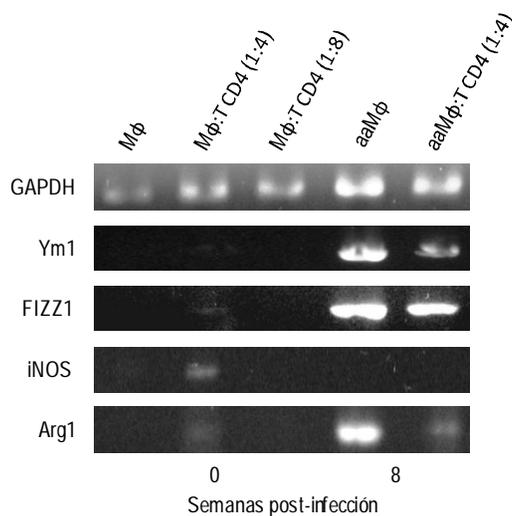


**Figura 10:** A los tiempos indicados se cuantificó en el sobrenadante la cinética de las citocinas por medio de la técnica ELISA Sándwich descrita anteriormente. Se midieron las citocinas IL-1 $\beta$  (a), IL-12 (d) e IL-6 (b), citocinas relacionadas con la respuesta tipo T<sub>H1</sub>; mientras que la IL-10 (c) se relaciona con la supresión de respuestas T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>. En el caso de IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12 no observamos diferencias significativas entre los grupos. Para IL-6 observamos que su producción se incrementa progresivamente con respecto al control en los grupos en los que los M $\phi$  interactuaron con los linfocitos T CD4+PD-1+ a las seis semanas y con el anti-PD-1 directamente. Mientras que a las 8 semanas p.i. esta interacción tiene un pico de producción en la relación 1:4 y esta baja, al igual que al interactuar con el anticuerpo anti-PD-1. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

## V. IV. Análisis de los marcadores de activación alternativa posterior a la interacción linfocitos T CD4+PD-1+.

Se analizaron marcadores de activación alternativa (Ym1, Fizz1/Relm $\alpha$  y Arginasa1), así como el marcador de activación clásica (iNOS) por medio de la técnica de RT-PCR, con la finalidad de observar si el perfil de activación alternativa en los M $\phi$  se revierte al interactuar con los linfocitos T CD4+PD-1+ (Figura 11).

Las células de animales control no expresaron marcadores de activación alternativa, sin embargo, al interactuar con los linfocitos T CD4+PD1+ en relación 1:4, parece haber una ligera expresión de arginasa 1. La expresión de genes de activación alternativa fue la esperada para los macrófagos control de ocho semanas p.i., cabe mencionar que en la relación 1:4, los marcadores de activación alternativa bajaron su expresión con respecto a los controles.

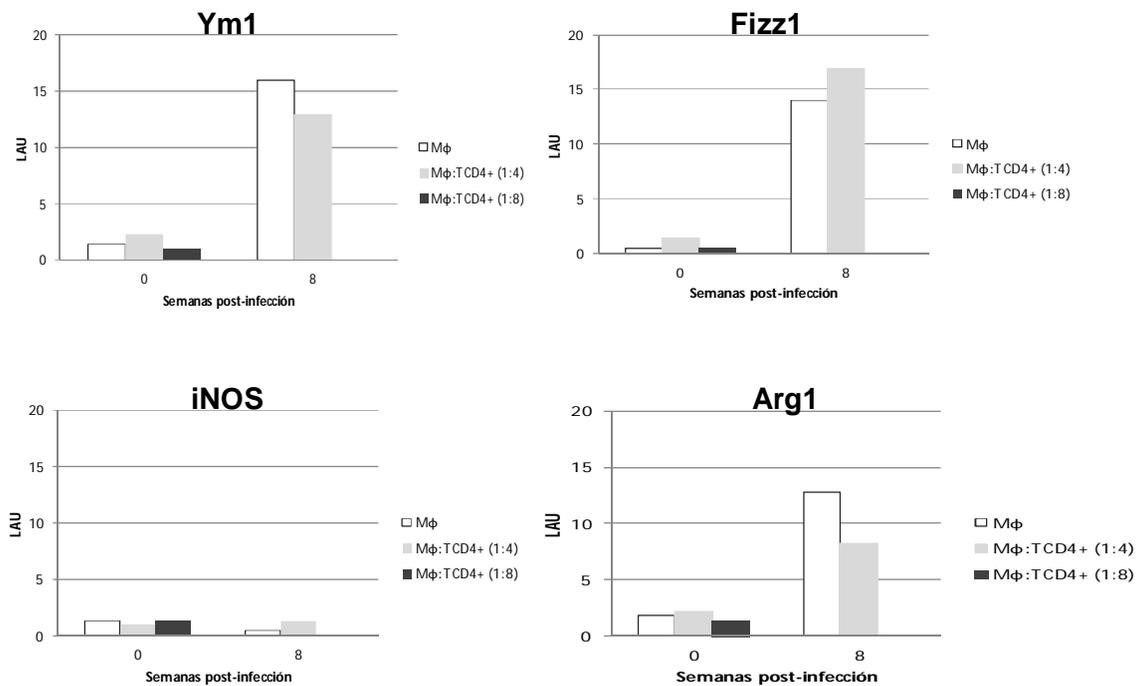


**Figura 11:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de fragmentos amplificados por RT-PCR de los M $\phi$  peritoneales con ocho semanas de infección. Se analizó la expresión de los principales marcadores de activación alternativa (Ym1, Fizz1, Arginasa1), así como un marcador de activación clásica (iNOS). Como se esperaba los marcadores de activación alternativa se expresaron en los aaM $\phi$ , pero al interactuar con los linfocitos en relación 1:4 estos genes parecen apagarse.

Para confirmar la existencia de diferencias significativas en la expresión de dichos genes se midió el grosor de las bandas dadas mediante el programa Multi Gauge V 2.2, con lo cual pudimos observar (Figura 12) que la expresión de Ym1 y Fizz1 en los Mφ provenientes de la infección con *T. crassiceps* es significativamente mayor a la que existe con respecto a los Mφ controles (Figura 12a y 12b), sin embargo, la expresión de Ym1 en la relación 1:4 baja significativamente con respecto al control. Mientras que en la expresión de iNOS no existen diferencias significativas entre los grupos.

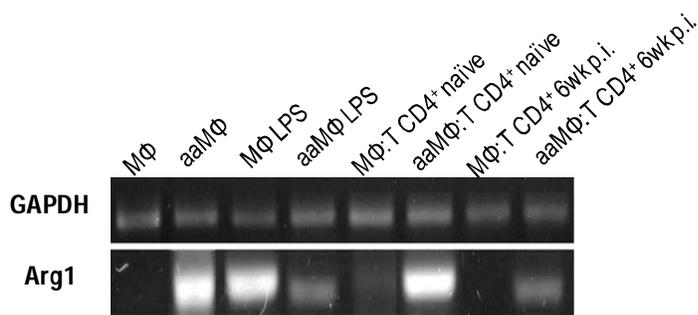
Por otro lado, la expresión de Arg1 es diferente significativamente entre los grupos de macrófagos infectados y los macrófagos controles, aunque al igual que Ym1, su expresión se ve disminuida significativamente con respecto a su control en la relación 1:4 (Figura 12d).

Lo anterior corrobora que el contacto entre estos dos tipos celulares no sólo tiene efecto sobre los linfocitos T, sino que también afecta a los macrófagos alternativamente activados.



**Figura 12:** Densitometría del RT-PCR. a) Ym1, b) Fizz1, c) iNOS, d) Arg1. En las gráficas se puede observar que existen diferencias en la expresión de Ym1, Fizz1 y Arg1 entre los grupos; al interactuar con los linfocitos T CD4+PD-1+ la expresión de estos genes se ve modificada, lo cual confirma lo observado en la electroforesis.

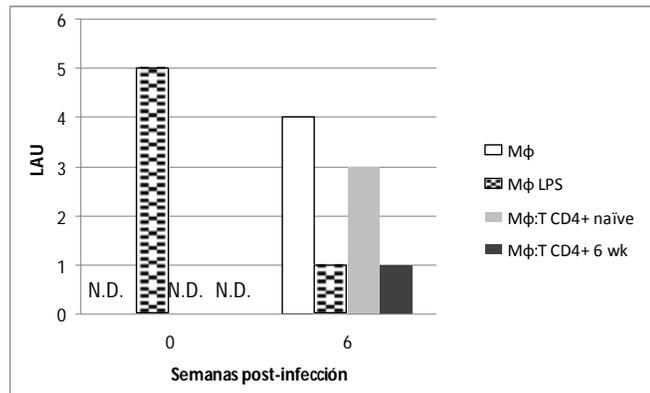
Por último, para saber si los efectos en los transcritos de los aaMφ eran debido a su interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de la infección con *T. crassiceps*, hicimos un experimento en el que los macrófagos control y de ratones con seis semanas p.i. fueron estimulados con linfocitos T CD4<sup>+</sup> control o derivados de esta infección en relación 1:4. Se analizó el marcador de activación alternativa Arg1. Los macrófagos de animales control, algunos inclusive en contacto con linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones infectados, no expresaron Arg1 excepto los estimulados con LPS (Figura 13). Por otro lado, encontramos que los aaMφ expresaron Arg1 y esto no se vio modificado cuando interactuaron con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> naïve, pero al entrar en contacto con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de animales infectados la expresión de Arg1 bajó con respecto a los controles. Este mismo efecto se observó con el LPS (Figura 13).



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos amplificados por RT-PCR de Mφ peritoneales y con seis semanas de infección en relación 1:4 (macrófago:linfocito T CD4<sup>+</sup>). Se analizó la expresión del marcador de activación alternativa Arginasa1. Como se esperaba este marcador se expresó en los aaMφ, incluso al estar en contacto con linfocitos T CD4<sup>+</sup> naïve, pero al interactuar con los linfocitos de seis semanas p.i. este gen se apaga.

La existencia de diferencias significativas en la expresión de Arg1 fue comprobada por el programa Multi Gauge V 2.2, con lo cual lo confirmamos. Los aaMφ expresan Arg1 de forma constitutiva y se mantiene con la interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> naïve, sin embargo cuando estuvieron en contacto con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> resultantes de la infección con *T. crassiceps* la presencia de este marcador de activación alternativa disminuye, esto ocurrió también con el LPS. En el grupo control de Mφ sólo el LPS tuvo presencia de este marcador.

## Arg1



**Figura 14:** Densitometría del RT-PCR de Arg1. En la gráfica se puede observar la existencia de diferencias en la expresión de Arg1 entre los grupos. Los aaMφ al interactuar con los linfocitos T CD4+PD-1+ de ratones con infección de seis semanas y con LPS bajan la expresión de este marcador.

Lo anterior nos demuestra que las características de los aaMφ se ven modificadas al interactuar con los linfocitos CD4+PD-1+ de la infección con *T. crassiceps*.

## VI. DISCUSIÓN

Se sabe que las infecciones parasitarias causadas por helmintos y la respuesta inmune de su huésped son el resultado de una larga dinámica que los ha llevado a co-evolucionar para sus subsistencia, ya que por un lado para el parásito es ventajoso modular la respuesta inmune del huésped, de tal forma que favorezca su crecimiento, maduración y propagación, pero que a la vez esto permita minimizar los daños que el propio huésped sufre por su presencia. Por otro lado, el huésped ha tenido que desarrollar una respuesta inmune efectiva para deshacerse del parásito y también minimizar los daños que sufre, sin que se vea comprometida su habilidad de montar una respuesta efectiva contra otros patógenos. Por lo tanto, los helmintos inducen una respuesta que incluye componentes de la inmunidad adaptativa e innata, con una fuerte respuesta inmune  $T_H2$  resultando en una respuesta antiinflamatoria (Anthony, Rutitzky *et al.* 2007; Reyes, Terrazas *et al.* 2010).

En este estudio se inició con la determinación de los linfocitos T  $CD4^+$  provenientes de animales infectados con *T. crassiceps* expresan PD-1 en su membrana, ya que este receptor es ligando de PD-L1 y PD-L2 los cuales se encuentran sobreexpresados en la membrana de los aaM $\phi$  y se cree que esta vía puede ser la responsable de la inmunosupresión que ejercen estos macrófagos sobre los linfocitos T  $CD4^+$  (Terrazas, Montero *et al.* 2005; Reyes, Terrazas *et al.* 2010). Encontramos que los linfocitos T  $CD4^+$  del bazo de ratones infectados con *T. crassiceps* expresan PD-1 (T  $CD4^+PD-1^+$ ) y su expresión aumenta conforme la infección progresa siendo máxima a las ocho semanas p.i., lo cual coincide con lo reportado por Terrazas, Montero *et al.* (2005). Este aumento puede deberse a que la molécula, mediante su señalización, es necesaria para detener la proliferación de los linfocitos T y de esta forma detener la respuesta causada por la inflamación crónica (Dulgerian, Garrido *et al.* 2011).

Durante la infección con *T. cruzi* se reportó la expresión de PD-1 en la membrana de los macrófagos peritoneales, con efectos supresores sobre linfocitos T  $CD90$  (Dulgerian, Garrido *et al.* 2011), sin embargo, cuando se inició este proyecto no se sabía que PD-1 podría expresarse en los aaM $\phi$ . El aumento de PD-1 en esta población podría deberse a que muchos otros tipos celulares e incluso tejidos no hematopoyéticos expresan alguno de los ligandos, así mismo debido al papel

supresor que se le da a este fenotipo, podría estar contribuyendo con la homeostasis durante la infección.

En los macrófagos de ratones no infectados se encontraron altos porcentajes de células PD-L1<sup>+</sup>, lo cual se debe a su expresión constitutiva (Sharpe, Wherry *et al.* 2007), sin embargo, en ratones infectados, su expresión aumenta de manera progresiva mientras transcurre la infección lo cual coincide con reportes previos (Montero Barrera 2006; Dulgerian, Garrido *et al.* 2011). PD-L1 ha sido relacionado con actividades supresoras en la proliferación de las células T y B, así como durante la producción de citocinas, también previene la activación incontrolada del sistema inmune para evitar un posible daño en los tejidos (Latchman, Liang *et al.* 2004; Zhang, Schwartz *et al.* 2004; Terrazas, Montero *et al.* 2005; Huber, Hoffmann *et al.* 2010; Dulgerian, Garrido *et al.* 2011). En las DCs la señal a través de PD-L1 es requerida para la inducción de células T<sub>Reg</sub>, sin embargo, en nuestro modelo no puede ocurrir la inducción de células T<sub>Reg</sub> al menos por esta vía, debido a los altos niveles de IL-6 (Wang, Pino-Lagos *et al.* 2008).

La baja expresión de PD-L2 en macrófagos de ratones control se debe a que es una molécula inducida por la activación de esta célula (Sharpe, Wherry *et al.* 2007), por lo que los macrófagos provenientes de ratones infectados con *T. crassiceps* expresan de forma considerable este ligando. Se ha reportado que suprime la proliferación de las células T (Huber, Hoffmann *et al.* 2010), sin embargo, también se ha descrito su papel como molécula co-estimuladora (Kuipers, Muskens *et al.* 2006).

Debido a las diferencias observadas en la señalización de PD-L1 y PD-L2, Kuipers, Muskens *et al.* (2006) sugieren que esto puede deberse a que muchos de los estudios varían con respecto al estímulo de las células, que suele ser muy artificial, ya que al usar anticuerpos o células artificiales para liberar señales, se pueden interpretar erróneamente los datos debido a las limitadas vías de señalización utilizadas y a los efectos indirectos de las APCs que son ignorados. Por lo anterior, en este modelo se intentó observar lo que sucede con la interacción macrófago-célula T con todos los receptores disponibles en su membrana, ya que estas moléculas influyeron en la respuesta de ambos tipos celulares.

La presencia simultánea de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en la misma célula provoca la competencia por PD-1. Los mecanismos moleculares involucrados en la unión ligando-receptor son distintos, siendo unión de PD-L1/PD-1 más compleja, ya que involucra un cambio conformacional de

PD-L1 (Ghiotto, Gauthier *et al.* 2010). La supresión de las células T puede ser mediada por PD-L1 y PD-L2, dependiendo de la manera en que los M $\phi$  sean estimulados (Dulgerian, Garrido *et al.* 2011).

Al analizar el perfil de citocinas encontramos que la producción de IL-12 e IL-1 $\beta$  no es significativa entre los grupos de macrófagos controles y los macrófagos provenientes de la infección con *T. crassiceps* ni entre las diferentes proporciones que se utilizaron, por lo tanto, notamos que no se está llevando a cabo una respuesta inflamatoria al interactuar los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los M $\phi$ . Por otro lado, IL-10 es un potente regulador negativo de la expresión genética de los macrófagos, modulando las acciones de IL-4 e IL-13, asociados con la inducción de aaM $\phi$ , y de IFN- $\gamma$ , relacionado con la diferenciación de caM $\phi$  (Gordon and Martinez 2010). Por lo anterior, demostramos que al estar bien caracterizado el perfil alternativo del macrófago, esta citocina no es sintetizada.

Observamos un aumento progresivo en la producción de IL-6 por macrófagos conforme la infección avanzó. La secreción de esta citocina se incrementó en los macrófagos que interactuaron con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> y al estimular a los M $\phi$  con el anticuerpo anti-PD-1 el efecto es aún más claro a las cero y seis semanas p.i. Aunque este resultado se puede observar a las ocho semanas, sólo se mantiene en la relación 1:4, ya que en la relación 1:8 la producción de IL-6 disminuyó y con el anticuerpo descienden aún más los niveles de IL-6. Debido a estos resultados, parece que el anticuerpo anti-PD-1 tiene un efecto similar sobre los macrófagos que la interacción con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> pero intensificada, y esto podría deberse a una interacción más directa y específica.

La IL-6 es considerada una citocina pro-inflamatoria, pero también tiene actividades regenerativas y anti-inflamatorias, así mismo juega un papel esencial durante la transición de inmunidad innata a inmunidad adaptativa. Otro efecto de IL-6 es el reclutamiento y su papel en la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IL-4 (Rincón, Anguita *et al.* 1997; Scheller, Chalaris *et al.* 2011). Esto explica la presencia de la IL-6, ya que actúan sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> provocando la producción de IL-4. Como ya se ha mencionado IL-4 es la principal contribuyente en la diferenciación de macrófagos alternativamente activados (Gordon and Martinez 2010; Weisser, McLarren *et al.* 2011), y esta podría ser la fuente por la cual los macrófagos continúan

diferenciándose en este fenotipo y el número de ellos aumenta conforme las semanas pasan siendo una retroalimentación positiva.

También se buscó el efecto de la interacción de estas dos poblaciones celulares sobre los marcadores de activación alternativa de los M $\phi$  como Ym1, Fizz1 y Arg1. Encontramos que estos marcadores no se expresan en los animales control, sin embargo, como se esperaba están presentes en los M $\phi$  de ocho semanas p.i., estos mismos M $\phi$  al ponerse en contacto con los linfocitos T CD4+PD-1<sup>+</sup> (1:4) disminuyeron ligeramente la expresión de Ym1 y Arg1, con lo cual confirmamos que esta interacción de los macrófagos con linfocitos T CD4+PD-1<sup>+</sup> produce una señal no sólo en los linfocitos T (Terrazas, Montero *et al.* 2005; Dulgerian, Garrido *et al.* 2011), sino también sobre los macrófagos alternativamente activados.

Realizamos un experimento adicional en el que como esperábamos Arg1 no se expresó en los M $\phi$  de animales control ni con la interacción con los linfocitos T CD4+PD-1<sup>+</sup>. En los aaM $\phi$  al interactuar con los linfocitos T CD4+PD-1<sup>+</sup> naïve no se observó ningún cambio significativo, pero al estar en contacto con los linfocitos T CD4+PD-1<sup>+</sup> de ratones infectados, la expresión del marcador bajó significativamente. Este resultado es igual a lo que observamos con el experimento anterior. Sin embargo, que los aaM $\phi$  sólo respondan a los linfocitos T de ratones infectados se debe a que al estar en contacto con el ambiente que genera la infección con *T. crassiceps*, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los aaM $\phi$  expresan moléculas <<nuevas>> como PD-1 y sus ligandos, las cuales están ausentes en las células control y les permiten interactuar.

Debido a estos resultados podemos decir que la interacción de los aaM $\phi$  con las células T CD4+PD-1<sup>+</sup> o con el anticuerpo anti-PD-1 sí se genera una señal en los macrófagos; ya que cuando analizamos la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 sobre las membranas de los macrófagos encontramos que posterior a la infección con *T. crassiceps* estos receptor/ligando se sobreexpresan, por lo que los efectos que se tengan sobre los macrófagos podrían ser atribuibles a ellos. También quisimos probar los efectos de la interacción de linfocitos T CD4+PD-1<sup>+</sup> con los aaM $\phi$  en diferentes proporciones. Por lo anterior, analizamos las citocinas producidas por los macrófagos y encontramos que existen diferencias significativas en la producción de IL-6 por los aaM $\phi$  con respecto a los M $\phi$  y estas diferencias las pudimos observar inclusive en las diferentes proporciones de M $\phi$ :linfocitos T CD4+PD-1<sup>+</sup>, aumentando de manera gradual la síntesis de esta citocina. Observamos que el efecto

del anticuerpo anti-PD-1 está potenciado con respecto a lo que observamos con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>. Por otro lado, los marcadores de activación alternativa se alteraron durante la interacción de los Mφ:linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> en relación 1:4, ya que la expresión de Ym-1 y Arg1 se vio regulada. Por último, quisimos ver si los efectos observados dependían del contacto con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> de la infección con *T. crassiceps*, lo cual confirmamos por la alteración de Arg1 sólo al interactuar con estos linfocitos. Sería interesante determinar las posibles vías de señalización involucradas en estas interacciones celulares.

## VI. CONCLUSIONES

- Al interactuar los linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> con los aaMφ los marcadores de activación alternativa disminuyen su expresión, lo cual podría deberse a una regulación.
- La interacción de las células CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> con aaMφ promueve la síntesis de IL-6.
- Estos efectos dependen del contacto entre los aaMφ y los linfocitos T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> provenientes de la infección con *T. crassiceps*.
- PD-1 se expresa en la membrana de los aaMφ con *T. crassiceps*, al igual que PD-L1 y PD-L2.
- La secreción de IL-6 podría estar relacionada con la diferenciación de los aaMφ.
- Es posible que exista una señalización a través de PD-1 y sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, en los macrófagos.

## VIII. REFERENCIAS

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (2009). Immunología celular y molecular. Barcelona, España, Elsevier.
- Anthony, R. M., L. I. Rutitzky, et al. (2007). "Protective immune mechanisms in helminth infection." Nature Reviews Immunology **7**(12): 975-987.
- Celada, A. and R. Maki (1992). "Transforming growth factor-beta enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages." The Journal of Immunology **148**(4): 1102-1105.
- Collins, M., V. Ling, et al. (2005). "The B7 family of immune-regulatory ligands." Genome Biology **6**(6): 223.
- Dong, H. and X. Chen (2006). "Immunoregulatory Role of B7-H1 in Chronicity of Inflammatory Responses." Cellular molecular Immunology **3**(3): 179-187.
- Dulgerian, L. R., V. V. Garrido, et al. (2011). "Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection." Immunology **133**(1): 29-40.
- Ehrt, S., D. Schnappinger, et al. (2001). "Reprogramming of the Macrophage Transcriptome in Response to Interferon- $\gamma$  and *Mycobacterium tuberculosis*." The Journal of Experimental Medicine **194**(8): 1123-1140.
- Fife, B. T. and K. E. Pauken (2011). "The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance." Annals of the New York Academy of Sciences **1217**(1): 45-59.
- Franceschini, D., M. Paroli, et al. (2009). "PD-L1 negatively regulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV." Journal of Clinical Investigation **119**(3): 551-564.
- Ghioito, M., L. Gauthier, et al. (2010). "PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1." International Immunology **22**(8): 651-660.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nature Reviews Immunology **3**(1): 23-35.
- Gordon, S. and F. O. Martinez (2010). "Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions." Immunity **32**(5): 593-604.
- Huber, S., R. Hoffmann, et al. (2010). "Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2." Blood **116**(17): 3311-3320.
- Keir, M. E., L. M. Francisco, et al. (2007). "PD-1 and its ligands in T-cell immunity." Current Opinion in Immunology **19**(3): 309-314.
- Kuipers, H., F. Muskens, et al. (2006). "Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4<sup>+</sup> T cell activation." European Journal of Immunology **36**(9): 2472-2482.
- Latchman, Y. E., S. C. Liang, et al. (2004). "PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(29): 10691-10696.
- Loke, P. n. and J. P. Allison (2003). "PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(9): 5336-5341.
- Maizels, R. M. (2005). "Infections and allergy -- helminths, hygiene and host immune regulation." Current Opinion in Immunology **17**(6): 656-661.
- Martinez, F., L. Helming, et al. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." Annual Review of Immunology **27**(1): 451-483.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." Nature **449**(7164): 819-826.
- Montero Barrera, D. (2006). Caracterización de una población de macrófagos supresores inducidos en la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*. México, FESI, Universidad Nacional Autónoma de México. **Biologo**.
- Mosmann, T. R. and S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunology Today **17**(3): 138-146.

- Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nature Reviews Immunology **8**(12): 958-969.
- Murphy, K., P. Travers, et al. (2009). Imunobiología de Janeway. México, D.F., McGraw Hill.
- Nair, M. G., D. W. Cochrane, et al. (2003). "Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro." Immunology Letters **85**(2): 173-180.
- Noël, W., G. Raes, et al. (2004). "Alternatively activated macrophages during parasite infections." Trends in Parasitology **20**(3): 126-133.
- Paul, W. E. (1999). Fundamental Immunology. United States of America, Lippincott-Raven.
- Reyes, J. L., C. A. Terrazas, et al. (2010). "Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo." International Journal for Parasitology **40**(6): 731-742.
- Reyes, J. L., C. A. Terrazas, et al. (2009). "Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection." Infection, Genetics and Evolution **9**(6): 1115-1127.
- Reyes, J. L. and L. I. Terrazas (2007). "The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections." Parasite Immunology **29**(12): 609-619.
- Rincón, M., J. Anguita, et al. (1997). "Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-producing CD4+ T Cells." The Journal of Experimental Medicine **185**(3): 461-470.
- Rodriguez-Sosa, M., J. R. David, et al. (2002). "Cutting Edge: Susceptibility to the Larval Stage of the Helminth Parasite *Taenia crassiceps* Is Mediated by Th2 Response Induced Via STAT6 Signaling." The Journal of Immunology **168**(7): 3135-3139.
- Scheller, J., A. Chalaris, et al. (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1813**(5): 878-888.
- Sharpe, A. H., E. J. Wherry, et al. (2007). "The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection." Nature Immunology **8**(3): 239-245.
- Terrazas, L. I., R. Bojalil, et al. (1998). "Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)." J Parasitol **84**(1): 74-81.
- Terrazas, L. I., D. Montero, et al. (2005). "Role of the Programmed Death-1 Pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis." International Journal for Parasitology **35**(13): 1349-1358.
- Wang, L., K. Pino-Lagos, et al. (2008). "Programmed Death 1 Ligand Signaling Regulates the Generation of Adaptive Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(27): 9331-9336.
- Weisser, S. B., K. W. McLarren, et al. (2011). "Alternative activation of macrophages by IL-4 requires SHIP degradation." European Journal of Immunology **41**(6): 1742-1753.
- Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." Nature Immunology **12**(6): 492-499.
- Willms, K. and R. Zurabian (2010). "*Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models." Parasitology **137**(Special Issue 03): 335-346.
- Zhang, X., J.-C. D. Schwartz, et al. (2004). "Structural and Functional Analysis of the Costimulatory Receptor Programmed Death-1." Immunity **20**(3): 337-347.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2010). "Heterogeneity and plasticity of T helper cells." Cell Research **20**: 4-12.

## IX. APÉNDICE I (Soluciones).

### *Solución hemolizante*

Tris base 0.17M (ICN Biomedicals Inc.).

NH<sub>4</sub>Cl 0.16M (J. T. Baker).

Se prepara para 300ml.

### *Buffer de PBS (solución salina amortiguada con fosfatos) para 10 litros y pH 7.4*

80g NaCl (J. T. Baker).

11.6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J. T. Baker).

2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J. T. Baker).

2g KCl (ICN Biomedicals Inc.).

### *Buffer TBE 1x*

Tris base (890mM) (Sigma Chemicals).

Ácido Bórico (890mM) (J. T. Baker).

40ml de 0.5 Ácido etilenediaminatetraacético (EDTA) disódico (J. T. Baker).

Se ajusta todo a pH 8 y se afora a 500ml con agua destilada.

### *Buffer de pegado (ELISA).*

0.1M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J. T. Baker).

Para 1lt de agua destilada.

### *Solución de lavado (ELISA)*

1000ml de PBS más 0.5% de Tween 20 (Promega Co.)

### *Solución de lavado (ELISA).*

1000 ml de PBS más 0.5 % de Tween 20 (Promega Co.).

### *Solución de bloqueo (ELISA).*

100ml de PBS más 1% de albumina serica bovina (ICN Biochemicals).

*Sustrato ABTS para revelado (ELISA).*

Adicionar 150mg. de ABTS (ICN Biochemicals) en 500ml. de 0.1M de ácido cítrico (Tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a un pH de 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 11ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -70°C.

*Sustrato ABTS para revelado (ELISA)*

Adicionar 150mg de ABTS (ICN Biomedicals) en 500ml de 0.1M de ácido cítrico (Tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a un pH de 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 11ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -70°C.

*Buffer para FACS.*

0.1% de azida de sodio  $\text{NaN}_3$  (Sigma Chemicals), 1% de suero fetal bovino SFB (Gibco) en 1lt PBS.

*Bromuro de etidio.*

Stock 1000x solución 0.5mg/ml.

50mg de Bromuro de etidio.

100ml. de agua.

Diluir 1:1000 para teñir geles y proteger de la luz.

## X. APÉNDICE II

### Secuencias de primers

**Tabla 1.** Secuencias de primers y temperatura de alineación utilizados en este trabajo obtenidos bibliográficamente.

Genes	Secuencias	Pares de bases (Pb)	Temperatura de alineación (°C)	Referencia
GAPDH	F-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC R-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	1035	56	(Reyes, Terrazas <i>et al.</i> 2009).
Arginasa1	F-CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG R-CAG ATA TGC AGG GAG TCA CC	250	54	(Nair, Cochrane <i>et al.</i> 2003).
Ym1	F-TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG R-TTTGTCCTTAGGAGGGCTTCCTC	436	56	(Nair, Cochrane <i>et al.</i> 2003).
iNOS	F-CTGGAG GAG CTC CTG CCT CATG R-GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG	449	62	(Reyes, Terrazas <i>et al.</i> 2009).
Fizz1	F-GGTCCCAGTGCATATGGATGAGAC R-CACCTCTTCACTCGAGGGACAGTT	290	65	(Reyes, Terrazas <i>et al.</i> 2009).