



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Señalización Inversa por PD-1 y PD-L1 en  
macrófagos alternativamente activados.**

**T E S I S**

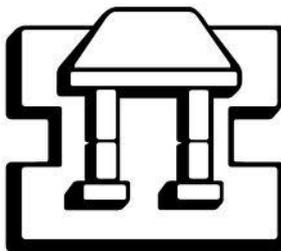
**QUE PERA OBTENER EL TITULO DE:**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**Alberto Navarrete Peón**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés**



**IZTACALA**

**TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO.  
Febrero, 2011.**



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.

# **CONTENIDO**

<b>I GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>II RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>III INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
1.- Inmunidad frente a helmintos	6
2.- Activación de macrófagos	7
3.- Inmunidad frente a <i>Taenia crassiceps</i>	10
4.- Vía de coestimuladores PD-1/PD-L's	12
5.- Papel de la vía PD-1/PD-L's en infecciones con helmintos	16
<b>IV ANTECEDENTES</b>	<b>18</b>
<b>V HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>VI JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>VII OBJETIVO GENERAL</b>	<b>21</b>
<b>VIII OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>21</b>
<b>IX MATERIALES Y METODO</b>	<b>22</b>
<b>X RESULTADOS</b>	<b>22</b>
1.- Determinación de la expresión de PD-1 y PD-L1 en macrófagos	24
2.- Determinación del perfil de citocinas en sobrenadantes de cultivos de macrófagos	25
3.- Determinación de la expresión genética de marcadores de activación de macrófagos	27
4.- Inhibición de NF-kB	28
<b>XI DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>XII CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>XIII ANEXO 1</b>	<b>33</b>
<b>XIV ANEXO 2</b>	<b>33</b>
<b>XV ANEXO 3</b>	<b>34</b>
<b>XVI REFERENCIAS</b>	<b>36</b>

## I Glosario de Abreviaciones

(En orden de aparición)

### Resumen

PD-1: Programmed Death-1 (Muerte Programada-1)

DC's: Dendritic Cells (Células Dendríticas)

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1 (Ligando-1 de Muerte Programada-1)

AAM's: Alternatively Activated Macrophages (Macrófagos Alternativamente Activados)

IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 $\beta$

IL-6: Interleucina-6

IL-10: Interleucina-10

TNF- $\alpha$ : Tumoral Necrosis Factor- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ )

Arg-1: Arginasa 1

RELM $\alpha$ : Resistin Like Molecule-a (Molécula Tipo Resistina- $\alpha$ )

TREM2: Triggering Receptor Expressed-on Myeloid-Cells2 (Receptor Disparador Expresado en Células Mieloides2)

### Introducción

Linfocitos Th2: Lymphocytes T helper 2 (Linfocitos T cooperadores 2)

Linfocitos Treg : Lymphocytes T regulatory (Linfocitos T reguladores)

IgG1: InmunoglobulinaG1

IgE: Inmunoglobulina E

Linfocitos CD4+: Lymphocytes Cluster of Differentiation 4+ (Linfocitos Agrupación por Diferenciación 4+)

INF- $\gamma$ : Interferón- $\gamma$

ON: Óxido Nítrico

iNOS: Sintasa de Óxido Nítrico Inducible

TGF $\beta$ : Transforming Growth Factor- $\beta$  (Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ )

RM: Receptor de Manosa

CAM's: Classically Activated Macrophages (Macrófagos Clásicamente Activados)

LPS: Lipopolisacárido

PGE2: Prostaglandina E2

IL-4R $\alpha$ : Interleukin-4 Receptor- $\alpha$  (Receptor- $\alpha$  de interleucina 4)

STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription6 (Transductor de señales y activador de la transcripción 6)

STAT4: Signal Transducer and Activator of Transcription 4 (Transductor de señales y activador de la transcripción 4).

MIF: Macrophage Migration Inhibitory Factor (Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos)

CD28: Cluster of Differentiation 28 (Agrupación por Diferenciación 28).

TCR: T Cell Receptor (Receptor de las Células T).

BCR: B Cell Receptor (Receptor de las Células B).

IgV: Immunoglobulin Variable (Inmunoglobulina Variable)

CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (Antígeno de los Linfocitos T Citotóxicos 4).

NKT: Natural Killer T-cell (Linfocitos T Asesinos Naturales).

TLR2/3/4/9: Toll-Like Receptor2/4/9 (Receptores Tipo-Cuota2/4/9).

**Antecedentes**

ITSM: Immuno Tyrosine Switch-based Motif (Motivo de Inmuno-Tirosinas basado en Switch).

SHP1/2: Src Homology Protein 1/2 (Proteína Homóloga Src 1/2)

ICOS: Inducible Costimulator (Coestimulador Inducible).

Ig $\alpha/\beta$ : Inmunoglobulina  $\alpha/\beta$

PI3K: Fosfatidil Inositol-3 Cinasa

MIP-1 $\alpha$ : Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  (Proteína Inflamatoria de Macrófagos-1 $\alpha$ ).

NF-kB: Nuclear Factor-kB (Factor Nuclear-kB).

**Resultados**

MNRT: Macrófagos No Reclutados con Tioglicolato.

MRT: Macrófagos Reclutados con Tioglicolato.

Anteriormente definidos.

## II RESUMEN

Programmed Death-1 (PD-1) es un receptor de membrana expresado por linfocitos T y B, así como por células dendríticas (DC's) y macrófagos activados. Uno de sus dos ligandos, PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) es ampliamente expresado por células hematopoyéticas (especialmente macrófagos, DC's y linfocitos) y no hematopoyéticas (endotelio y lugares de privilegio inmunológico). Ésta vía está involucrada en la tolerancia inmunológica periférica, y la inmunosupresión al inducir anergia en los linfocitos y regular negativamente la expresión de citocinas proinflamatorias producidas por éstas células.

Se ha observado que los macrófagos alternativamente activados, quienes son importantes células inmunoregulatoras con actividad antiinflamatoria y supresora inducidas durante las infecciones con helmintos y otras respuestas antiinflamatorias, muestran una elevada expresión de PD-L1. El bloqueo de cualquiera de estos dos ligandos en estas células restaura la capacidad proliferativa de los linfocitos durante la presentación del antígeno. Mientras que los efectos de la señalización por PD-1 en linfocitos T, linfocitos B y DC's han sido bien caracterizados, se desconoce si PD-1 y, en especial, PD-L1, son capaces de enviar una señal dentro de los AAM's. En éste trabajo se reporta por primera vez la expresión de PD-1 en AAM's y se caracterizan los efectos de la señalización por PD-1 y PD-L1, expresados en éstas células.

Los macrófagos peritoneales de ratones infectados con el metacéstodo de *Taenia crassiceps* mostraron un pico en la expresión de PD-1 y PD-L1 a las 6 y 8 semanas de infección, y los macrófagos reclutados con tioglicolato mostraron también una alta expresión de los receptores, demostrando que los macrófagos en estas semanas de la cinética de infección y al ser reclutados con tioglicolato presentan una óptima expresión de estas moléculas.

La señal enviada por PD-1 y PD-L1 en AAM's regular positivamente las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ , además de la enzima iNOS, en un mecanismo dependiente del factor de transcripción NF-kB. En contraste, no se observaron cambios en la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10, ni de los genes asociados a la activación alternativa de macrófagos como son Arg1, Ym1, RELM $\alpha$  o TREM2. La activación de PD-1 y PD-L1 en macrófagos reclutados con tioglicolato indujo la expresión del gen TREM2 y de la citocina TNF- $\alpha$ , aunque no ocurrió ningún cambio en la expresión de los otros marcadores o citocinas analizadas.

Todos los datos anteriores sugieren que los AAM's expresan a PD-1, que la expresión de PD-1 y PD-L1 se incrementa durante la infección con *T. crassiceps* y que PD-1 y PD-L1 envían una señal hacia los AAM's capaz de regular positivamente la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e iNOS en un mecanismo dependiente del factor de transcripción NF-kB.

### III INTRODUCCIÓN

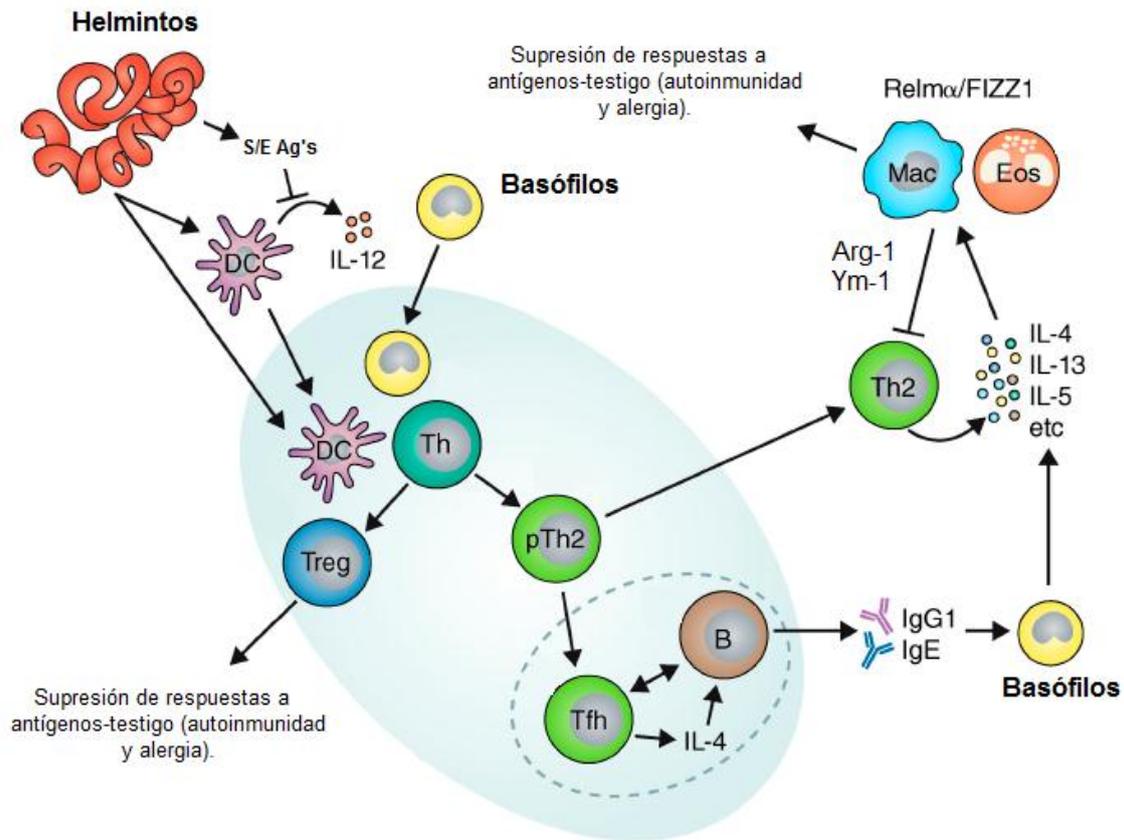
El sistema inmune es un sistema de defensa notablemente versátil, constituido por una gran variedad de tejidos, células y moléculas dedicados a proteger a los animales de las infecciones por microorganismos patogénicos y el cáncer. Sus componentes son capaces de reconocer específicamente a una variedad de microorganismos aparentemente ilimitada, actuando en concierto dentro de redes dinámicas cuya complejidad rivaliza a la del sistema nervioso, en un proceso llamado respuesta inmune (Kindt *et al.*, 2006; Abbas *et al.*, 2007).

#### 1. Inmunidad frente a helmintos

Los parásitos han desarrollado mecanismos muy variados y complejos para evadir la respuesta inmune de sus hospederos, a niveles tan distintos como evitar su detección, intervenir en las funciones inmunoregulatorias e impedir las respuestas efectoras; éstas estrategias les permiten completar su ciclo de vida (Schmidt-Hempel *et al.*, 2009). Mientras que los microparásitos suelen evadir la respuesta inmune mediante la variación antigénica y/o la ocultación en nichos intracelulares, los helmintos habitan en zonas extracelulares como el sistema linfático, el tracto gastrointestinal, el espacio intersticial de algunos tejidos, la sangre y las cavidades corporales. Así, las estrategias de evasión inmunológica de los helmintos se centran más bien en la inmunoregulación en beneficio del parásito (Maizels *et al.*, 2004).

Pese a la diversidad de especies de helmintos parásitos, su enorme divergencia evolutiva y su gran variedad de mecanismos patogénicos e invasivos, la respuesta inmune frente a helmintos suele ser altamente estereotípica (Fig. 1), caracterizándose por la inducción de poblaciones de linfocitos Th2 (T helper 2) y Treg (T reguladores), células plasmáticas secretoras de IgG1 (Inmunoglobulina G1) e IgE, células dendríticas (DC's) supresoras, eosinófilos, basófilos y mastocitos secretores de IL-4 (Interleucina-4) e IL-13 y macrófagos alternativamente activados (AAM's). También es común encontrar una baja respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4+. Las citocinas más abundantemente secretadas son IL-5, IL-9, IL-10 y principalmente IL-4, IL-6 e IL-13. En conjunto, dichos cambios promueven la inducción de un ambiente antiinflamatorio. A éste tipo de respuestas se les llama comúnmente "respuestas tipo Th2", al ser lideradas por linfocitos T CD4+ secretores de IL-4 e IL-13, a diferencia de las respuestas proinflamatorias, denominadas "respuestas tipo Th1", ya que son lideradas por linfocitos T CD4+ secretores de INF- $\gamma$  (Maizels *et al.*, 2004; Anthony *et al.*, 2007; Reyes y Terrazas; 2007; Jenkins y Allen, 2010).

Las respuestas tipo Th2 y algunos de sus componentes, como los linfocitos Treg (McSorley *et al.*, 2008) y los AAM's han demostrado ser eficaces en el control de algunos parásitos (Reyes & Terrazas, 2007; Jenkins y Allen, 2010), aunque en otros casos favorecen la infección (Reyes *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Respuesta estereotípica frente a helmintos (Maizels *et al.*, 2009).

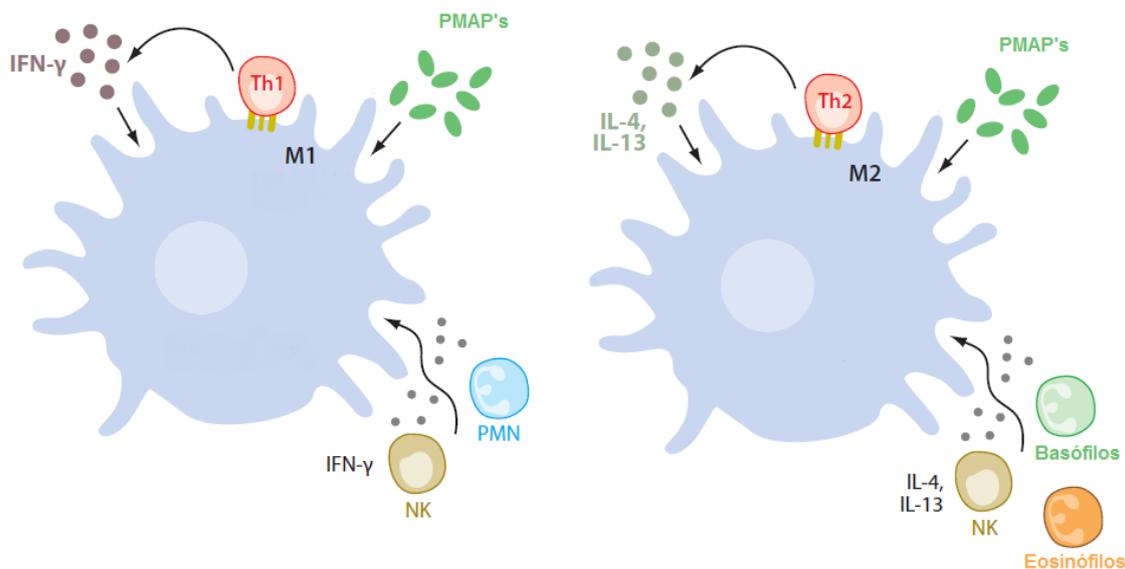
## 2. Activación de los macrófagos

Los macrófagos fueron inicialmente descritos como células fagocíticas capaces de eliminar patógenos, aunque no se sabía nada acerca de sus estados de activación. Tiempo después se identificó a los linfocitos T CD4+ como a células fuertemente implicadas en las respuestas antígeno-específicas encaminadas a la eliminación de patógenos, cuyo principal producto secretorio durante estas respuestas es el INF- $\gamma$  (Interferón gamma). Al investigar los efectos de ésta citocina sobre los macrófagos, se descubrió que tiene la capacidad de incrementar la habilidad de éstas células para fagocitar y eliminar patógenos, presentar antígenos, secretar citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-23 y TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral-alfa) y producir mediadores tóxicos como el óxido nítrico (ON), mediante la sobreexpresión de la enzima iNOS (Sintasa de Óxido Nítrico inducible) (Reyes y Terrazas, 2007; Martínez *et al.*, 2009).

Posteriormente se descubrió que así como en las respuestas proinflamatorias los linfocitos T CD4+ secretan INF- $\gamma$  de manera muy abundante, en las respuestas antiinflamatorias secretan altos niveles de IL-4 e IL-13 (Martínez *et al.*, 2009). Al investigar el efecto de éstas dos citocinas sobre los macrófagos se descubrió que al ser estimulados con ellas, éstos secretaban altos niveles de TGF- $\beta$  (Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ ), IL-6 y urea, mientras que producían niveles moderados de IL-10 y,

en franco contraste con los macrófagos activados mediante  $\text{INF-}\gamma$  se observó que secretaban bajos niveles de  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-12}$  e  $\text{IL-23}$ . Otros marcadores sobreexpresados por efecto de la señalización de  $\text{IL-4}$  e  $\text{IL-13}$  en los macrófagos son la enzima Arg1 (Arginasa 1), los receptores TREM2, RM (Receptor de manosa), mMGL1 y mMGL2, las quitinasas Ym1 y AMCase y la molécula rica en cisteína RELM $\alpha$  (Reyes y Terrazas, 2007).

Actualmente se sabe que los macrófagos son células capaces de alterar su fenotipo drásticamente en respuesta a numerosas señales ambientales para regular y mantener las respuestas inflamatorias y la homeostasis en los tejidos (Jenkins y Allen, 2010). De éste modo, se han descubierto y caracterizado múltiples fenotipos para éstas células. La clasificación más completa de los estados de activación de los macrófagos que actualmente se conocen, denomina a los macrófagos estimulados con  $\text{INF-}\gamma$  y LPS como macrófagos clásicamente activados (CAM's) o macrófagos M1, al ser este fenotipo el primero en ser descrito mientras que agrupa a los macrófagos que han sufrido activación con otros estímulos dentro de la nomenclatura M2 (Fig. 2), la cual se subdivide en tres categorías según sea el estímulo. A los macrófagos estimulados con  $\text{IL-4}$  y/o  $\text{IL-13}$  los clasifica como macrófagos alternativamente activados (AAM's) o M2a, a los estimulados con LPS,  $\text{INF-}\gamma$  y complejos inmunes (activación tipo II) M2b y a los macrófagos desactivados por estímulos supresores como  $\text{IL-10}$  y glucocorticoides como M2c (Reyes y Terrazas, 2007; Martínez *et al.*, 2009; Stempin *et al.*, 2010).

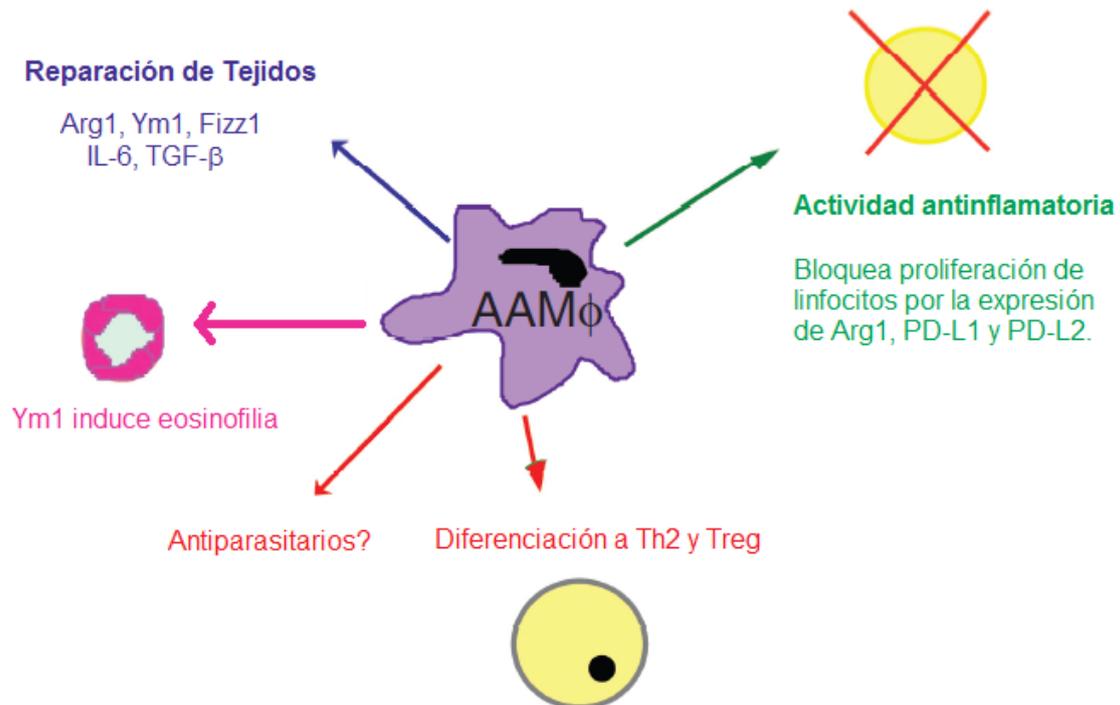


**Figura 2.** Izquierda: Macrófago recibiendo estimulación por células tipo Th1 para activarse clásicamente. Derecha: Macrófago recibiendo estimulación de células tipo Th2 para activarse alternativamente (Martínez *et al.*, 2009).

Cabe destacar que al ser  $\text{IL-4}$  e  $\text{IL-13}$  las dos citocinas más ampliamente secretadas durante las respuestas inmunes frente a helmintos, es una característica común de las infecciones con gusanos parásitos el desarrollo de poblaciones de AAM's (Maizels *et al.*, 2004; Reyes y Terrazas, 2004; Jenkins y Allen, 2010).

Los AAM's tienen funciones diversas dentro de las respuestas inmunes frente a helmintos. En infecciones con nemátodos intestinales es común que intervengan en la expulsión de las formas adultas, aunque esta función no es consistente en todos los modelos infecciosos (Jenkins y Allen, 2010), como es el caso de las infecciones con *Taenia crassiceps*, donde los AAM's favorecen la infección (Reyes *et al.*, 2010). Estas células tienen también una marcada capacidad para intervenir en la reparación de tejidos, principalmente mediante la expresión de Arg-1 (Stempin *et al.*, 2010), la secreción de IL-6 (Scheller *et al.*, 2011) y TGF- $\beta$  (Jenkins y Allen, 2010), de modo que influyen en la supervivencia del hospedero durante infecciones con helmintos (Herbert *et al.*, 2004).

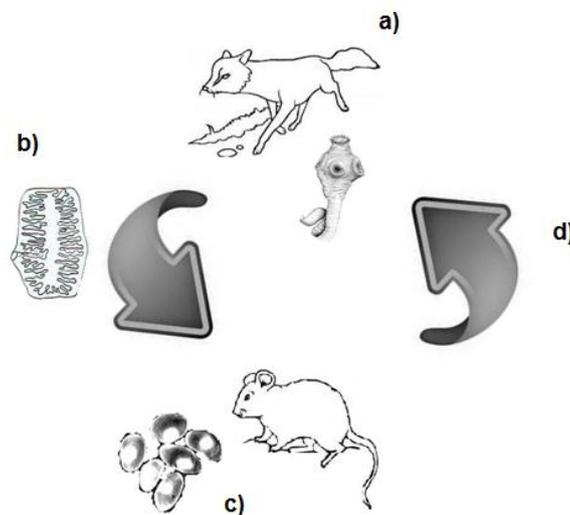
Paralelamente, estas células son potentes supresoras de la proliferación de linfocitos por mecanismos contacto dependientes, principalmente mediante la vía PD-1/PD-L's, aunque se desconoce la trascendencia *in vivo* de esta función inmunoregulatoria (Terrazas *et al.*, 2005; Jenkins y Allen, 2010). De manera similar, también influyen en la diferenciación de los linfocitos T hacia un perfil Th2 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002; Jenkins y Allen, 2010; Scheller *et al.*, 2011) (Fig. 3).



**Figura 3.** Funciones de los AAM's (Maizels *et al.*, 2004).

### 3. Inmunidad frente a *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800).

*Taenia crassiceps* es un helminto del filo Plathelminthes, clase Cestoda, orden Cyclophyllidea, familia Taeniidae, género *Taenia* (Linnaeus, 1758) cuya forma adulta se encuentra en el intestino delgado de los cánidos, principalmente zorros (*Vulpes vulpes*) y coyotes (*Canis latrans*), mientras que los metacéstodos se encuentran en músculos, tejidos subcutáneos y cavidades peritoneal y pleurales de varios roedores, entre ellos, el ratón (*Mus musculus*) (Hoberg *et al.*, 1999). El adulto libera proglótidos grávidos en las heces de su hospedero definitivo, de manera que cuando los roedores se alimentan de ellas, ingieren los huevos desarrollando la cisticercosis. El ciclo se cierra cuando el roedor es depredado por un cánido, en el cual se desarrollará la forma adulta del parásito (Singh y Prabhakar, 2002). Aunque no es frecuente, se han observado casos de cisticercosis por *T. crassiceps* en humanos inmunocomprometidos por cáncer (Heldwein *et al.*, 2006) y Virus de Inmunodeficiencia Humana (Singh y Prabhakar, 2002) (Fig. 4).



**Figura 4.** Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. a) El hospedero definitivo (cánido) alberga al adulto en su intestino delgado, b) liberando proglótidos en sus heces hacia el ambiente, c) los huevos son comidos por roedores, donde se desarrollan los metacéstodos y d) el ciclo se cierra cuando algún cánido depreda al roedor (Alberto Navarrete Peón).

La etapa aguda de las infecciones con el metacéstodo de *T. crassiceps* (primeras 1-2 semanas) se caracteriza por una alta producción INF- $\gamma$ , ON y anticuerpos del isotipo IgG2a que es reemplazada por una respuesta rica en IL-4, IL-13 y anticuerpos IgG1 e IgE, sugiriendo una respuesta inicial ante el parásito de tipo Th1, la cual es reemplazada por una respuesta tipo Th2 (Terrazas *et al.*, 1998).

Paralelamente al cambio en el microambiente de citocinas, aparece una población de AAM's, con una alta expresión de IL-6, prostaglandina E2 (PGE2), MHC-II, CD40 y B7-2, así como una baja expresión de IL-12, IL-18 y ON. Éstos macrófagos muestran una capacidad muy pobre para inducir respuestas proliferativas de linfocitos CD4+, además

de exhibir la habilidad de diferenciarlos hacia el perfil Th2, en un mecanismo aparentemente dependiente de IL-6 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002).

Esta población de macrófagos comienza a aparecer a las dos semanas de infección, estableciéndose a las cuatro semanas. Más aún, en ella es detectable la expresión de marcadores de activación alternativa tales como: Arg-1, Ym1, Fizz1, MR e IL-4R $\alpha$  (Reyes *et al.*, 2010). Adicionalmente, la polarización de la respuesta inmune hacia el perfil Th2 y la aparición de los AAM's están acompañadas por un incremento en la carga parasitaria (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002) sugiriendo un importante papel para las respuestas antiinflamatorias y éstas células en la susceptibilidad frente a *T. crassiceps*.

Ratones de cepas susceptibles (BALB/c) deficientes del gen Traductor de la Señal y Activador de la Transcripción-6 (STAT6), tienen la habilidad de controlar la proliferación del parásito mediante la polarización de la respuesta inmune hacia el perfil Th1. Los macrófagos en éstos ratones son incapaces de activarse alternativamente, produciendo altos niveles de ON (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002b).

De manera opuesta, los ratones de cepas resistentes (C57BL/6) se vuelven susceptibles a la misma enfermedad en ausencia de STAT4, el principal factor de transcripción asociado al desarrollo de respuestas tipo Th1. Esto probablemente es debido al desarrollo de una respuesta tipo Th2 con bajos niveles de NO y un alto nivel de reclutamiento de AAM's, dado por la ausencia del gen STAT4 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2004). Así, el desarrollo de respuestas tipo Th2 dependiente del gen STAT6 ha sido correlacionado a la susceptibilidad frente a *T. crassiceps*, mientras que las respuestas tipo Th1 dependientes de STAT4 se han asociado a la resistencia frente al parásito.

Para confirmar el papel de los AAM's en la susceptibilidad frente a *T. crassiceps*, se han hecho múltiples experimentos con ratones de cepas susceptibles, resistentes y knock out (deficientes en algún gen de importancia inmunológica). Macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6 después de dos, cuatro y ocho semanas de infección muestran una mayor capacidad para inducir respuestas proliferativas en linfocitos CD4+, secretar citocinas proinflamatorias y ON que los macrófagos de ratones BALB/c obtenidos en los mismos tiempos durante la cinética infecciosa. Mientras que en las etapas crónicas de la infección muestran una elevada expresión de genes asociados a la activación clásica y una baja o nula expresión de marcadores de activación alternativa, los macrófagos de ratones BALB/c mantienen una alta expresión de transcritos asociados a la activación alternativa a lo largo de la cinética infecciosa (Reyes *et al.*, 2009).

Más aún, ratones deficientes en el gen del Factor de Inhibición de Migración de Macrófagos (MIF $^{-/-}$ ) presentan una mayor susceptibilidad frente a *T. crassiceps* que los ratones silvestres, mostrando menores niveles de anticuerpos IgG2a en suero y una mayor capacidad de sus esplenocitos para producir INF- $\gamma$  e IL-13 en respuesta al antígeno total del parásito.

Macrófagos derivados de éstos ratones mostraron una menor capacidad de secretar IL-12, TNF- $\alpha$  y ON ante el estímulo con INF- $\gamma$  y LPS, aunque secretaron mayores niveles de IL-6 ante el mismo estímulo (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2003). De éste modo, la activación clásica de los macrófagos se ha asociado a la resistencia frente a la infección, mientras que la activación alternativa de los mismos se ha visto involucrada en la susceptibilidad.

Experimentos con ratones BALB/c y BALB/c STAT6 -/- tratados con inhibidores de la enzima iNOS muestran una mayor susceptibilidad frente al parásito que sus contrapartes sin la administración del inhibidor, confirmando la importancia del ON producido por los macrófagos en la resistencia ante el mismo (Alonso-Trujillo *et al.*, 2007).

En experimentos confirmatorios se observó que al eliminar específicamente a los AAM's desde el primer día de infección hasta las ocho semanas reduce la carga parasitaria hasta un 90%, aunque la eliminación tardía de estas células no tuvo efecto sobre la proliferación del parásito. Los ratones carentes de AAM's muestran niveles similares de anticuerpos IgG1 e IgG2a a los de los ratones sin tratamiento, aunque sus esplenocitos muestran una mayor capacidad proliferativa ante el estímulo con antígenos de *T. crassiceps* y secretan altos niveles de IL-4, IL-13 e INF- $\gamma$  ante el mismo estímulo (Reyes *et al.*, 2010).

En conjunto, éstos datos sugieren que el desarrollo de las respuestas tipo Th2 mediado por la señalización de STAT6 y la inducción de los AAM's son importantes mediadores de la susceptibilidad frente a *T. crassiceps*, mientras que la inducción de respuestas tipo Th1 dependiente de la señalización de STAT4 y los CAM's son importantes en la resistencia frente al helminto. El papel de los CAM's en la resistencia probablemente sea dependiente de la producción de ON, mientras que no está claro el papel de los AAM's en la susceptibilidad, pese a que es claro que los AAM's tienen grandes capacidades inmunoregulatorias, favoreciendo el desarrollo de respuestas antiinflamatorias y suprimiendo la proliferación de los linfocitos activados.

#### 4. Vía de coestimuladores PD-1/PD-L's

Según el modelo de activación de los linfocitos B propuesto por Bretscher y Cohn (1970) y el modelo de activación de los linfocitos T propuesto por Lafferty y Cunningham (1977 y 1983), la activación eficiente de los linfocitos y la discriminación de lo propio y lo ajeno requiere de dos señales: 1) La señal antígeno-específica enviada a través de BCR/TCR (B Cell Receptor/T Cell Receptor, respectivamente), y 2) una señal no afín al antígeno (señal coestimuladora). Así, desde 1990 se han identificado múltiples vías de coestimulación que envían a los linfocitos señales tanto estimuladoras como inhibitoras, resultando importantes para mantener el balance entre tolerancia e inmunidad. A su vez, la manipulación de éstas vías ha demostrado ser una estrategia terapéutica eficiente para inducir tolerancia en la autoinmunidad,

las alergias y los trasplantes, e inmunidad en las infecciones y el cáncer (Ansari y Sayegh., 2006).

La familia de coestimuladores CD28 está compuesta por al menos cuatro miembros estructuralmente relacionados y comúnmente expresados en la membrana celular de los linfocitos, ya sea de manera constitutiva o inducible. Los mecanismos de acción de éstos receptores regulan la activación de los linfocitos por medio del antagonismo o la sinergia con las vías de señalización de TCR y/o BCR, así como de otros miembros de la familia CD28. Sus ligandos son las moléculas de membrana coestimuladoras de la familia B7 (Sharpe y Freeman, 2002). A su vez, se conocen siete miembros de la familia de ligandos coestimuladores B7. Esta familia está compuesta por un conjunto de moléculas de membrana estructuralmente relacionadas (20-40 % de homología) con la capacidad de estimular a los receptores de la familia CD28, viéndose implicados en la regulación de las respuestas inmunológicas. Algunos de los miembros de ésta familia tienen funciones sobrepuestas al estimular al mismo receptor (Collins *et al.*, 2005). Hay evidencias que sugieren que éstas moléculas, además de funcionar como ligandos de los receptores de la familia CD28, son capaces de señalar en la célula que los expresa (Loke y Allison, 2004; Collins *et al.*, 2005; Butte *et al.*, 2007).

Programmed-Death 1 (PD-1; CD279) pertenece a la familia de coestimuladores CD28, mientras que sus ligandos Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1; B7-H1; CD274) y Programmed Death Ligand 2 (PD-L2; B7-DC; CD-273) pertenecen a la familia de ligandos coestimuladores de la familia B7 (Sharpe y Freeman, 2002; Keir *et al.*, 2008).

El ectodominio de PD-1 tiene un único dominio IgV (Inmunoglobulina Variable), lo cual es típico de la familia CD28. Éste dominio consiste en una cadena de alrededor de 120 aminoácidos organizados en nueve  $\beta$ -plegadas paralelas conectadas mediante bucles, que constituye el área de interacción con sus ligandos, al igual que sucede con los complejos antígeno-anticuerpo y antígeno-TCR (Freeman, 2008).

A su vez, PD-L1 y PD-L2 tienen un dominio IgV similar, unido a la punta de un dominio IgC (Inmunoglobulina Constante). Al igual que PD-1, interaccionan con su ligando mediante el dominio IgV (Lin *et al.*, 2007; Lázár-Molnár *et al.*, 2008). PD-L2 se une a PD-1 con una afinidad tres veces superior que el complejo PD-1/PD-L1 (Collins *et al.*, 2005; Lázár-Molnár *et al.*, 2008) mientras que PD-L1 es capaz de unirse a B71 con una afinidad intermedia (Constante de disociación ( $K_D$ ): 1.9  $\mu$ M) a B71:CD28 ( $K_D$ : 4  $\mu$ M) y B71:CTLA-4 ( $K_D$ : 0.2  $\mu$ M), resultando en una asociación más débil que PD-1:PD-L1 ( $K_D$ : 0.59  $\mu$ M) y que PD-L2 ( $K_D$ : 0.26  $\mu$ M) (Butte *et al.*, 2007).

Programmed Death-1 se expresa de manera inducible, después de la activación en linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B y linfocitos T Natural Killer (NKT) (Sharpe *et al.*, 2007). También puede ser expresado en DC's, monocitos (Keir *et al.*, 2008) y macrófagos clásicamente activados (Huang *et al.*, 2009) (Fig 1.). PD-L1 es expresado basalmente en células T y B, DC's, macrófagos y mastocitos. Su expresión en estas células es regulada positivamente después de la activación. PD-L1 también se expresa de manera constitutiva en una gran variedad de células no hematopoyéticas

como: células endoteliales, epiteliales, miocitos, hepatocitos, células de los islotes pancreáticos, astrocitos cerebrales, placenta, células oculares (Sharpe *et al.*, 2007), cardiomiocitos, células pulmonares y carcinomas. Su distribución en tejidos no-hematopoyéticos sugiere una función para éste receptor en la tolerancia periférica (Collins *et al.*, 2005)(Cuadro 1). Por su parte, con un patrón de expresión más restringido, PD-L2 es expresado induciblemente en DC's, monocitos, macrófagos, mastocitos (Sharpe *et al.*, 2007) y linfocitos B1 (Keir *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2005) (Cuadro 1.). Los patrones de expresión de los ligandos de PD-1 sugiere una función diferencial dentro de la respuesta inmune para los dos; mientras que la expresión constitutiva de PD-L1 en APC's y células no hematopoyéticas se ve involucrado en la inducción de tolerancia periférica, la expresión inducible de PD-L2 en APC's está involucrada en la resolución de respuestas inflamatorias.

**Cuadro 1.** Expresión de la vía Programmed Death-1/Programmed Death-Ligand.

	Ratón		
	PD-1	PD-L1	PD-L2
<b>Células Hematopoyéticas</b>			
Macrófagos Peritoneales		Expresión Constitutiva	
Macrófagos Activados	Expresión Inducible	Expresión Constitutiva	Expresión Inducible
Linfocitos T Ingenuos	Expresión Inducible	Expresión Constitutiva	
Linfocitos T Activados	Expresión Inducible	Expresión Constitutiva	
Linfocitos B Ingenuos		Expresión Constitutiva	
Linfocitos B Activados	Expresión Inducible	Expresión Constitutiva	
Células Dendríticas Plasmacitoideas		Expresión Constitutiva	
Células Dendríticas Mieloideas		Expresión Constitutiva	Expresión Inducible
Mastocitos		Expresión Constitutiva	Expresión Inducible
Monocitos activados	Expresión Inducible		
Linfocitos NK	Expresión Inducible		
<b>Células No Hematopoyéticas</b>			
Endotelio Vascular		Expresión Constitutiva	
Islotes de Langerhans		Expresión Constitutiva	
Queratinocitos		Expresión Constitutiva	
Hepatocitos		Expresión Constitutiva	
Pulmón		Expresión Constitutiva	Expresión Inducible
Placenta		Expresión Constitutiva	
Córnea		Expresión Constitutiva	
Células Epiteliales		Expresión Constitutiva	
Células Musculares		Expresión Constitutiva	
Astrocitos		Expresión Constitutiva	

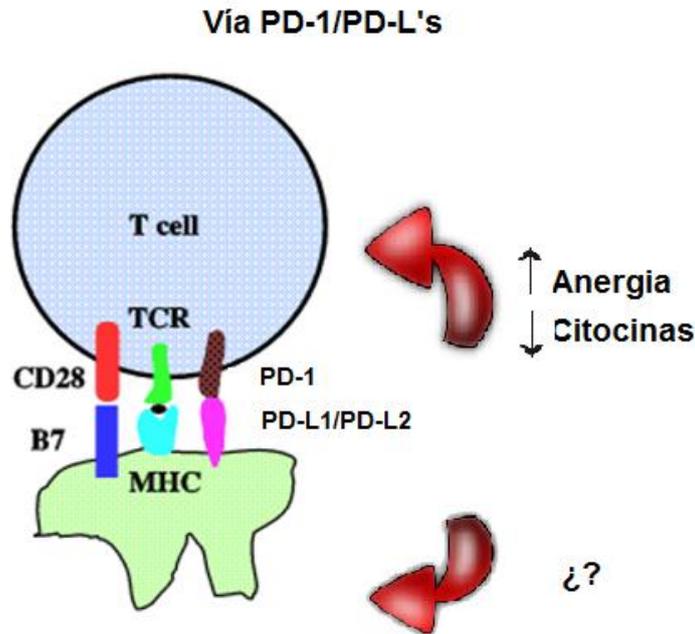
	Sin Expresión
Expresión Constitutiva	
Expresión Inducible	
Sin Datos	

La expresión de PD-1 en linfocitos es inducida mediante la activación de TCR/BCR (Agata *et al.*, 1996) y la señalización de TNF- $\alpha$  (Sharpe *et al.*, 2007). En DC's, puede ser inducido mediante la señalización de TLR2, TLR3 y TLR4, aunque su expresión puede ser suprimida por la señalización mediante TLR9 e IL-4R $\alpha$  (Yao *et al.*, 2009).

La activación de las células T y B induce la secreción de citocinas que pueden regular positivamente la expresión de PD-L1 y PD-L2; éste mecanismo de retroalimentación influye en la activación de los linfocitos y la función de las APC's (Freeman, 2008). Se ha reportado que estímulos proinflamatorios como INF- $\gamma$  y LPS favorecen la expresión de PD-L1 en los macrófagos, mientras que IL-4 favorece la expresión de PD-L2 en las mismas células (Locke y Allison, 2003; Huber *et al.*, 2010), al igual que IL-13 (Collins *et al.*, 2005). Por esto y dado que la expresión de PD-L1 ha probado ser independiente de STAT6, mientras que la expresión de PD-L2 es dependiente de este factor de transcripción, PD-L1 ha sido propuesto como un marcador de activación clásica en los macrófagos mientras que PD-L2 ha sido propuesto como un marcador de activación alternativa (Locke y Allison, 2003; Huber *et al.*, 2010).

Programmed Death-1, PD-L1 y PD-L2 son moléculas de membrana que entregan señales inhibitorias hacia los linfocitos, regulando el balance entre la activación de éstas células, la tolerancia ante antígenos, la defensa inmunológica y la inmunopatología (Keir *et al.*, 2008). La expresión de PD-L1 en tejidos periféricos, zonas de privilegio inmunológico y APC's regulan la tolerancia de los linfocitos T CD4+ y CD8+ ante los antígenos propios, impidiendo su diferenciación hacia un perfil efector, su infiltración hacia los tejidos y su capacidad para producir citocinas proinflamatorias, regulando el desarrollo de enfermedades autoinmunes como diabetes tipo 1 y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Martin-Orozco *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006; Latchmann *et al.*, 2004). Del mismo modo, el bloqueo de PD-L2 favorece la inducción de EAE, aunque no de diabetes autoinmune (Zhu *et al.*, 2006). Mutaciones en PD-1 también inducen linfocitos B autoreactivos capaces de promover el desarrollo de miocarditis (Wang *et al.*, 2010).

La vía también puede regular la actividad de las DC's al enviar señales dentro de éstas a través de PD-L2 y probablemente PD-L1 (Fig. 6). Mientras que PD-L1 constituye un importante mecanismo de inmunotolerancia periférica y de evasión de la inmunidad por tumores, PD-L2 tiene una función importante en la resolución de respuestas inflamatorias y en el control de la inflamación en infecciones crónicas y agudas. La señalización por ésta vía también puede modular la expresión de múltiples citocinas y receptores e influir en la diferenciación y proliferación celular y las actividades efectoras del sistema inmune (Keir *et al.*, 2007). De esta manera, se ha identificado a la vía como un posible blanco terapéutico importante para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes e infecciones diversas (Sharpe *et al.*, 2007).



**Figura 6.** Esquema de las funciones de la vía PD-1/PD-L's. Se ha descrito ampliamente la inducción de anergia y el descenso en la secreción de citocinas en linfocitos por la señal enviada a través de PD-1, no obstante se desconocen los efectos de la señal enviada por sus ligandos dentro de las células presentadoras de antígeno (Alberto Navarrete Peón).

## 5. Papel de la vía PD-1/PD-L's en infecciones con helmintos

A partir de ratones infectados con *T. crassiceps* se han obtenido AAM's con una elevada expresión de PD-L1 y PD-L2 (Terrazas *et al.*, 2005), así como linfocitos con una capacidad proliferativa muy pobre (Reyes *et al.*, 2010). En una cinética infecciosa con el parásito, los macrófagos de ratones BALB/c infectados muestran una mayor expresión de PD-L1 y PD-L2 en comparación con los macrófagos provenientes de ratones C57BL/6, lo cual fue asociado a una mayor capacidad proliferativa de los linfocitos T CD4+ en los ratones de la cepa resistente (Reyes *et al.*, 2009).

Al cocultivar AAM's de ratones BALB/c con células CD90+ estimuladas con aCD3 y aCD28 o antígenos provenientes del parásito, se observó un descenso en la capacidad proliferativa de éstas células con respecto a sus controles. Más aún, si los AAM's son usados como APC's ante células DO11.10 CD4+, las últimas presentan una proliferación muy pobre. No obstante, el bloqueo de PD-L1 y/o PD-L2 en los macrófagos o el bloqueo de PD-1 en los linfocitos restaura la capacidad proliferativa de éstas células en ambos casos (Terrazas *et al.*, 2005), confirmando así el rol de la vía PD-1/PD-L's en la inmunosupresión mediada por AAM's derivados de infecciones con el cestodo.

En concordancia con éstos experimentos, los AAM's pulmonares de ratones infectados con el nematodo *Nippostrongylus brasiliensis*, rápidamente expresan altos niveles de PD-L1 y PD-L2, acompañados de una pobre capacidad para inducir respuestas proliferativas en linfocitos DO11.10 CD4+ cuando son usadas como APC's o en

cocultivos con células CD4+ estimuladas con aCD3 y aCD28 (Siracusa *et al.*, 2008). Si PD-L2 es bloqueado *in vivo* durante una infección con éste helminto, el porcentaje de células CD4+ pulmonares se ve aumentado de manera significativa (Huber *et al.*, 2010). De manera similar, se han detectado altos niveles de PD-L2, aunque no de PD-L1 en DC's provenientes de ratones infectados con *N. brasiliensis*. Animales PD-L2 -/- infectados con el parásito mostraron una mayor secreción de IgE, IL-4, IL-5 e IL-13 y mayor eosinofilia, acompañados de una mayor resistencia ante la infección. Éste efecto fue atribuido al incremento en la potencia de la respuesta tipo Th2 dado por la deficiencia en PD-L2 (Ishiwata *et al.*, 2010). De manera interesante, en éste modelo, el bloqueo *in vivo* de PD-L2, pero no de PD-1 influye positivamente en el reclutamiento de eosinófilos y la secreción de IgE, lo cual puede deberse a la existencia de un segundo ligando para PD-L2 o a la señalización inversa por éste receptor (Ishiwata *et al.*, 2010).

De manera similar, los AAM's derivados de modelos de infección con *Schistosoma mansoni* sobreexpresan a PD-L1, aunque no a PD-L2 y el bloqueo de PD-L1 mediante anticuerpos solubles en éstas células restaura la capacidad proliferativa de los linfocitos en cocultivos *in vitro*. La regulación negativa de PD-L1 en etapas crónicas de la infección se correlacionó con una mayor capacidad proliferativa en los linfocitos (Smith *et al.*, 2004). En el mismo modelo, se identificaron DC's con altos niveles de expresión de PD-L2 en etapas crónicas de la infección (6 a 20 semanas), así como linfocitos T CD4+ con altos niveles de PD-1 (6 a 20 semanas). Aunque la expresión de PD-L2 en DC's se relacionó negativamente con la morbilidad en los ratones, los niveles de PD-1 en linfocitos se relacionaron positivamente con ésta, indicando la posibilidad de que la vía PD-1/PD-L2 limite la potencia de la respuesta Th2 durante la infección, evitando daños inflamatorios patológicos para el hospedero (Cooley *et al.*, 2005). Paralelamente, la exposición percutánea repetida ante cercarias de este parásito reduce la capacidad proliferativa de linfocitos T CD4+, de manera local y sistémica, induciendo AAM's y DC's con una baja expresión de PD-L1, pero una alta expresión de PD-L2, responsables de la hipo-respuesta de los linfocitos *in vitro* e *in vivo*. Al depletar éstas APC's *in vivo*, aumentan los niveles de INF- $\gamma$  junto con la proliferación de linfocitos (Cook *et al.*, 2011).

En contraste, los AAM's derivados de infecciones con *Brugia malayi* expresan niveles normales de PD-L1 con respecto a su control (macrófagos reclutados con tioglicolato) y no expresan a PD-L2, pese a que tienen una elevada capacidad para suprimir las respuestas proliferativas de los linfocitos (Mylonas *et al.*, 2009), evidenciando que la vía PD-1/PD-L's, no es el único mecanismo inmunosupresor de los AAM's pese a ser uno muy importante.

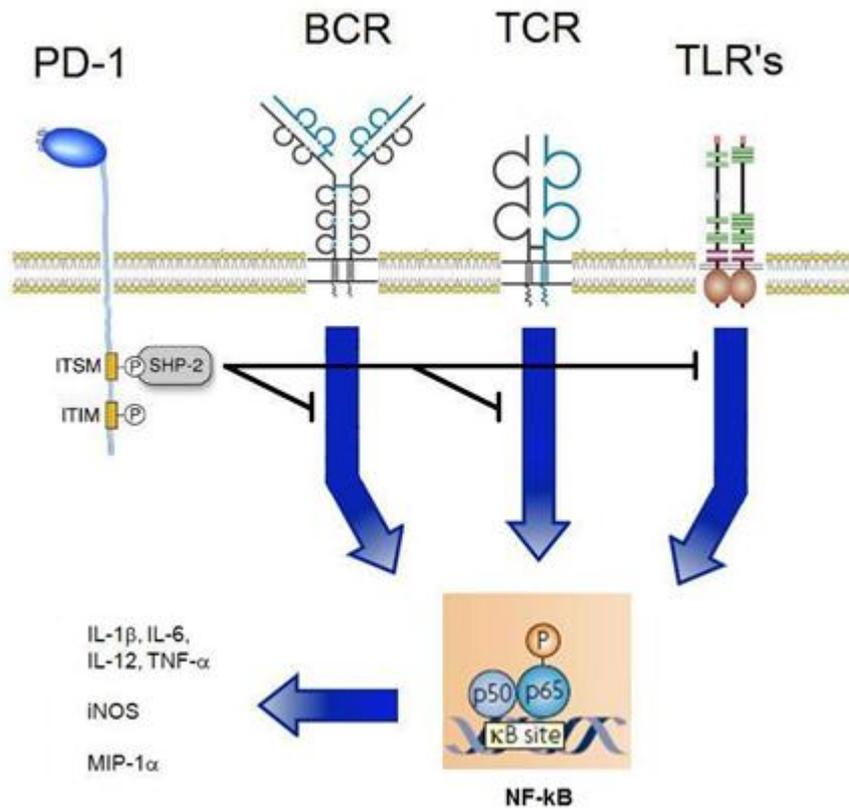
## IV ANTECEDENTES

Programmed Death-1 tiene una cola citoplasmática con un ITSM (Immuno Tyrosine Switch-based Motif) capaz de reclutar las fosfatasa de tirosina SHP1 (Src Homology Protein 1) y SHP2, responsables de la señalización mediante el receptor (Okazaki *et al.*, 2001; Chemnitz *et al.*, 2004). Las fosfatasa solo pueden actuar cuando PD-1 se encuentra en “cross-link” (unión de receptores en la membrana) con BCR (Okazaki *et al.*, 2001), TCR, ICOS (Bennet *et al.*, 2003) y CD28 (Parry *et al.*, 2005), a través de la defosforilación de algunos segundos mensajeros pertenecientes a sus vías de señalización.

Las fosfatasa SHP1/2 pueden defosforilar a Lyn, Ig $\alpha/\beta$ , Syk, PI3K y ERK1/2 de la vía de BCR (Okazaki *et al.*, 2001), a ZAP70, CD3 $\zeta$ , ERK y PKC $\theta$  dentro de la cascada de señalización de TCR (Sheppard *et al.*, 2004) (Fig.7), a PI3K y AKT de la vía de señalización de CD28 (Parry *et al.*, 2005) y a STAT5 en la vía de CD25 (Franceschini *et al.*, 2009). El bloqueo de estas vías mediante la señalización de PD-1 reduce la capacidad de los linfocitos para secretar IL-2, IL-10, IL-13 e INF- $\gamma$  (Chemnitz *et al.*, 2004) y para responder ante IL-2 (Franceschini *et al.*, 2009).

La capacidad de proliferación de los linfocitos es una de las funciones más drásticamente reducidas, principalmente debido al “cross-talk” inhibitorio entre la vía de PD-1 y las de BCR (Okazaki *et al.*, 2001), TCR (Sheppard *et al.*, 2004), CD28 (Parry *et al.*, 2005), ICOS (Bennet *et al.*, 2003) y CD25 (Franceschini *et al.*, 2009), mientras que la apoptosis es inducida solamente por medio de la inhibición de la expresión del factor de supervivencia Bcl-xL (Parry *et al.*, 2005).

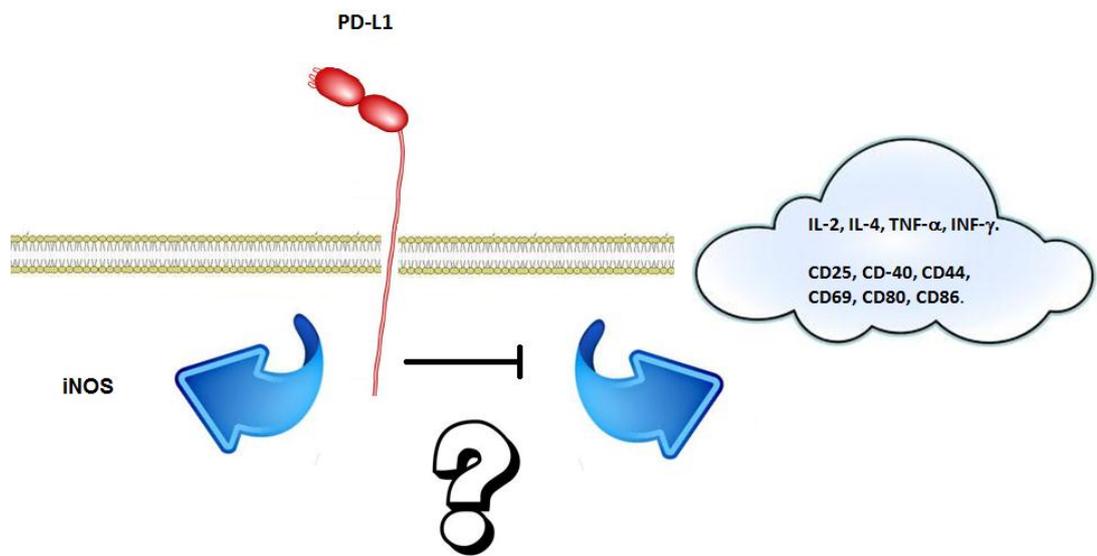
La expresión de PD-1 también ha sido detectada en DC's y macrófagos, en los que se ha visto que también señala (Huang *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009; Peña-Cruz *et al.*, 2010). De manera similar a lo que ocurre en los linfocitos, PD-1 es capaz de bloquear por lo menos la vía de señalización de TLR2 (Peña-Cruz *et al.*, 2010), TLR4 y TLR6 (Huang *et al.*, 2009) y de influir negativamente en los niveles de secreción de IL-6, IL-10, MIP-1 $\alpha$  (Proteína Inflamatoria de Macrófagos-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$  (Peña-Cruz *et al.*, 2010), IL-12p70 y TNF- $\alpha$  en DC's (Fig. 7), participando en la susceptibilidad ante infecciones bacterianas por medio de la señalización en éstas células (Yao *et al.*, 2009). De manera similar, la señalización por PD-1 en macrófagos clásicamente activados regula negativamente a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y la capacidad fagocítica de las células mientras que regula positivamente a IL-10, participando negativamente en la resistencia frente a la septicemia (Huang *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que PD-1 bloquea algunas de las vías de señalización que activan al factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Fig. 7).



**Figura 7.** Esquema de señalización por PD-1 (Alberto Navarrete Peón).

De manera opuesta, se conoce muy poco acerca de la señalización por PD-L1. Éste receptor puede modular negativamente la proliferación de los linfocitos y su capacidad para secretar IL-2, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  y expresar CD25, CD44 y CD69 (Butte *et al.*, 2007), aunque se desconocen los mecanismos para lograr éste efecto. DC's estimuladas con SPD-1 (PD-1 soluble) son incapaces de inducir proliferación en linfocitos CD4+ al ser usadas como APC's con bajas concentraciones de antígeno, secretan menores cantidades de IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$ , expresar menos CD40, CD80 y CD86 y secretar más IL-10 (Kuipers *et al.*, 2006) (Fig. 8). El defecto de éste último sistema experimental es que SPD-1 es incapaz de distinguir entre PD-L1 y PD-L2, uniéndose a los dos.

Dulgerian *et al.*, (2010) observaron una regulación positiva de la enzima iNOS, así como de la secreción de ON en CAM's estimulados con anti-PD-1 y anti-PD-L1, aunque no observaron ningún efecto en la secreción de IL-10 ni de TNF- $\alpha$  por estos estímulos (Figs. 7 y 8).



**Figura 8.** Esquema de la señalización por PD-1 (Alberto Navarrete Peón).

## V JUSTIFICACIÓN

La señalización por PD-1 en macrófagos alternativamente activados es desconocida, mientras que la señalización mediante PD-L1 no ha sido suficientemente estudiada en ninguna célula. El estudio de la señalización por ambos receptores en macrófagos alternativamente activados podría servir para identificar blancos terapéuticos útiles en el combate de infecciones con helmintos y para mitigar las respuestas inflamatorias no deseadas.

## VI HIPÓTESIS

Dada la inmunomodulación generada por la infección con *Taenia crassiceps* en el modelo murino, principalmente mediada por la inducción de AAM's con una alta expresión de las moléculas inhibitorias PD-L1 y PD-L2, se plantea que:

Los AAM's podrían expresar PD-1 y que las características de estas células pueden modificarse al activarse las moléculas PD-1 y PD-L1. Dicha interacción generaría una señal inversa (es decir de la célula que expresa el receptor hacia la célula que expresa el ligando), lo cual llevaría a los AAM's a exacerbar sus actividades.

## VII OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la señalización a través de PD-1 y PD-L1 sobre la expresión de marcadores de activación clásica y alternativa y el perfil de citocinas de los AAM's que se desarrollan durante la infección en el modelo murino con el cisticercos de *Taenia crassiceps*.

## VIII OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión de PD-1 y PD-L1 en macrófagos peritoneales de animales infectados y no infectados con cisticercos *T. crassiceps*.
- Estimular a los receptores PD-1 y PD-L1 de manera específica en un sistema *in vitro*.
- Determinar alteraciones en el perfil de secreción de citocinas.
- Caracterizar mediante rtPCR el efecto de la estimulación de los receptores sobre la expresión de marcadores de activación alternativa.
- Evaluar posibles rutas de señalización de PD-1 y PD-L1 en AAM's.

## IX MATERIALES Y MÉTODO (Fig. 9).

**Animales experimentales.**- Para todos los experimentos se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c entre 6 y 10 semanas de edad.

**Infección con *Taenia crassiceps*.**- Diez ratones fueron infectados intraperitonealmente con 20 cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF sin gemaciones y de aproximadamente 2 mm de diámetro. Después de 6 y 8 semanas de infección se sacrificó a los ejemplares. Animales de la misma edad y sexo pero sin infección se utilizaron como controles.

**Obtención de macrófagos.**- A los tiempos indicados se sacrificó a los ratones infectados y a los controles por asfixia en una cámara de CO<sub>2</sub> e inmediatamente se inyectaron intraperitonealmente con 8 ml de solución salina estéril, recibieron en el abdomen un ligero masaje para solubilizar las células del exudado peritoneal (PEC's) y éstas fueron extraídas por succión con una jeringa. Para separar a los macrófagos, de los eosinófilos, neutrófilos y linfocitos que componen las PEC's éstos se ajustaron a 1,000,000 células/ml y se incubó 1 ml por pozo en placas de 24 pozos (Corning Costar, México) durante 2hrs a 37 °C. Después se lavó cada pozo dos veces para remover las células no adherentes. Para reclutar un mayor número de macrófagos en los ratones no infectados, tres días antes del sacrificio se estimularon con tioglicolato añejado con un mínimo de dos meses disuelto en una concentración de 28.9 gr/L y esterilizado en autoclave (Sigma-Aldrich, México).

**Ensayo de expresión de PD-1 y PD-L1.**- La expresión de éstos receptores se determinó mediante citometría de flujo, bloqueando los receptores Fc mediante el uso de a-CD16/32 (BioLegend, USA). Los macrófagos fueron identificados como las células más grandes y granulares en una escala logarítmica y mediante la unión al anticuerpo F4/80 APC (BioLegend, USA). La expresión de PD-1 y PD-L1 fue determinada por la capacidad de unión a a-PD-L1 PE (BioLegend, USA) y a-PD-1 FITC (BioLegend, USA) (Anexo 1).

**Estimulación de PD-1/PD-L's.**- En todos los tratamientos se colocó un anticuerpo a-CD64 (BioLegend, USA) para impedir la unión no específica de los anticuerpos. Veinte minutos después de la aplicación de éste reactivo, se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para PD-1 (BioLegend, USA) y PD-L1 (BioLegend, USA) en tratamientos separados; 20 minutos después de la aplicación de éstos anticuerpos se agregó un anticuerpo cabra anti-Rata IgG2a (BioLegend, USA) para forzar a los a-PD-L's a hacer crosslink (unirse en la membrana) y activarlos. Como control se usaron células de animales sanos e infectados sin ningún estímulo y células de animales sanos e infectados con solamente isotipo IgG2a (BioLegend, USA).

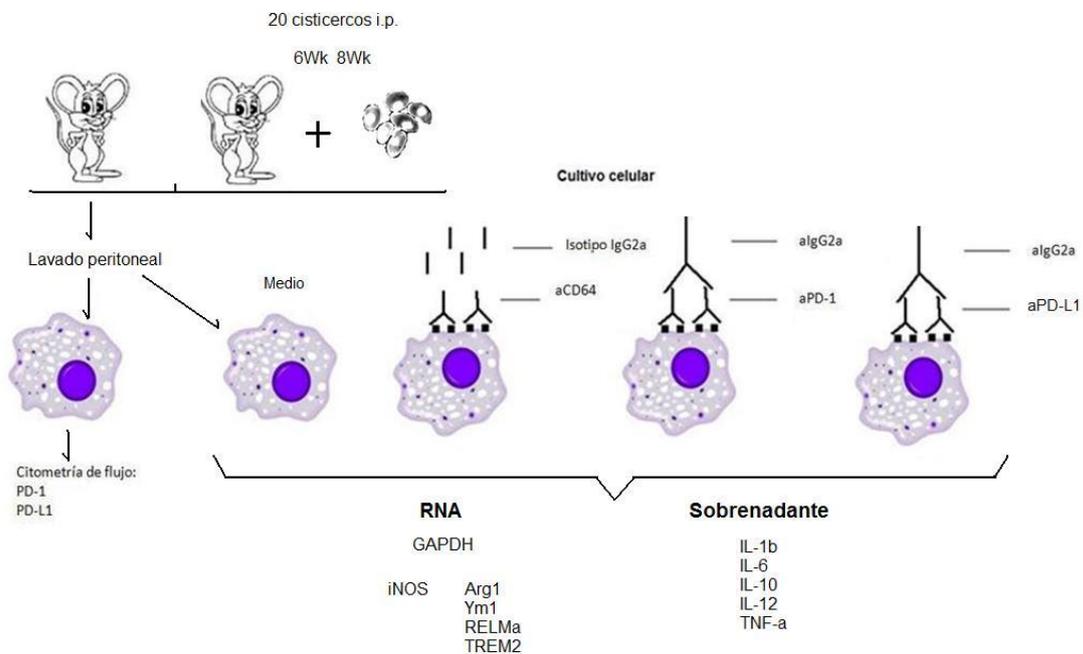
**Determinación de citocinas en sobrenadante.**- 24 hrs después de la estimulación de los receptores se recolectó el sobrenadante y se procesó por medio de la prueba ELISA para determinar las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$  (Anexo 2).

**Determinación de la expresión de marcadores de activación en los macrófagos.**- 24 hrs después de la estimulación de los receptores, se recolectó el RNA de las muestras usando Trizol (Invitrogen, México). Éste fue sometido a rtPCR para los genes GAPDH-2, Arg1, iNOS, Fizz1 (RELM $\alpha$ ), TREM2 y Ym1 (Anexo 3). Las densitometrías ópticas se

realizaron con el programa *Image J Software* restando a cada banda el valor de densidad óptica de su fondo y dividiendo ese valor entre el valor de su control de GAPDH menos su fondo. Las áreas seleccionadas para el análisis fueron equivalentes en todos los casos (440 pixeles).

**Inhibición de NF- $\kappa$ B.**- Para determinar si la familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B está implicada en la señalización de PD-1 y PD-L1, se realizaron cultivos estimulando a los receptores en macrófagos previamente incubados con 5  $\mu$ M de Celastrol (InVivoGen, USA) disuelto en dimetil formamida y se procesó de la manera ya descrita a los sobrenadantes y RNA para realizar prueba ELISA y rtPCR, respectivamente.

**Análisis estadísticos.**- Se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 para calcular los promedios y el error estándar de los datos obtenidos así como para realizar la prueba t no pareada en busca de diferencias significativas. Los valores de p menores a 0.05 se consideraron significativamente diferentes con un intervalo de confianza del 99%.



**Figura 9.** Diagrama de flujo del diseño experimental.

## X RESULTADOS

### 1. Determinación de la expresión de PD-1 y PD-L1 en macrófagos.

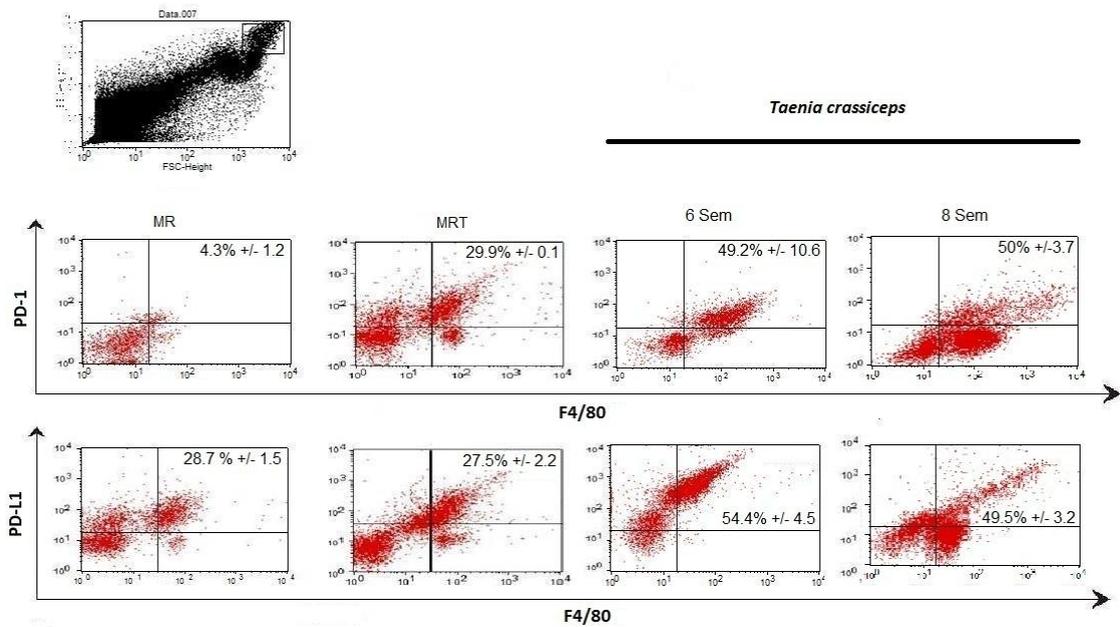
Con el fin de conocer los niveles de expresión de las moléculas PD-1 y PD-L1 en los macrófagos peritoneales de ratones infectados y no infectados, se procedió a realizar citometrías de flujo para detectar estos marcadores, identificando a los macrófagos como las células más grandes y granulares en una escala logarítmica y como células F4/80+ dentro de los dot plots.

El porcentaje de macrófagos residentes (MR) PD-1+ encontrado fue del 4.3 % y el tamaño de la población PD-1+ aumentó a 29.9 % cuando los macrófagos fueron reclutados con tioglicolato. Sin embargo, las poblaciones positivas para este marcador incrementaron su proporción con la infección, hallándose poblaciones F4/80+ PD-1+ de hasta 49.2% del total a las seis semanas de infección y del 50 % a las ocho semanas (Fig.10).

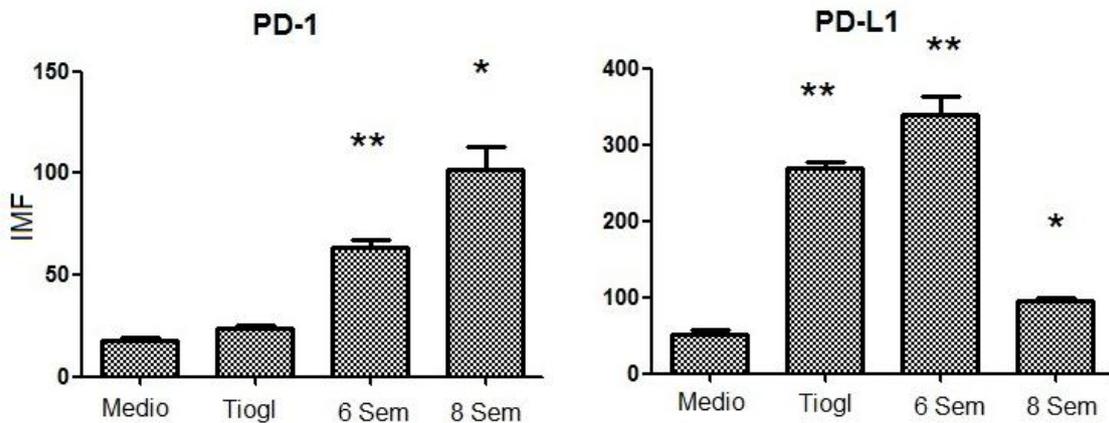
Se analizó la intensidad media de fluorescencia (IMF) para PD-1 de todas las células F4/80+, encontrando una baja expresión basal de PD-1 en MR's (18 IMF), la cual no fue alterada significativamente por la inducción con tioglicolato (25.5 IMF), no obstante, la IMF del receptor aumentó dramáticamente con respecto a su control no infectado a las seis (63.25 IMF) y ocho (101.5 IMF) semanas de infección (Fig. 11).

En contraste, en ratones sin infectar se encontraron poblaciones PD-L1+ relativamente grandes ( $28.7 \% \pm 1.5$ ) que no fueron alteradas por el reclutamiento mediante tioglicolato ( $27.5 \% \pm 2.2$ ). A las seis semanas de infección se muestra un incremento considerable en la población de macrófagos PD-L1+ ( $54.4 \% \pm 4.5$ ), llegando hasta el  $49.5 \% \pm 3.7$  a las ocho semanas de infección (Fig. 10). La IMF de este receptor en los macrófagos creció a lo largo de la cinética de infección, empezando con 50.5 IMF en ratones sin infectar y en AAM's reclutados a las seis y ocho semanas de infección se obtuvieron IMF's de 270 IMF y 339 IMF, respectivamente. La IMF para dicho receptor se incrementó también considerablemente en los macrófagos reclutados con tioglicolato (MRT) (95.5 MFI) (Fig. 11).

Dada la abundante expresión de PD-1 y PD-L1 en MRT's, se decidió usarlos como control para los experimentos con cultivo celular.



**Figura 10.** Diagramas de punto de las poblaciones F4/80+/PD-1+, F4/80+/PD-L1+ en una cinética de infección de 8 semanas con *T. crassiceps* y MR y en MRT's. Datos representativos de 2-3 experimentos independientes con dos repeticiones por experimento.

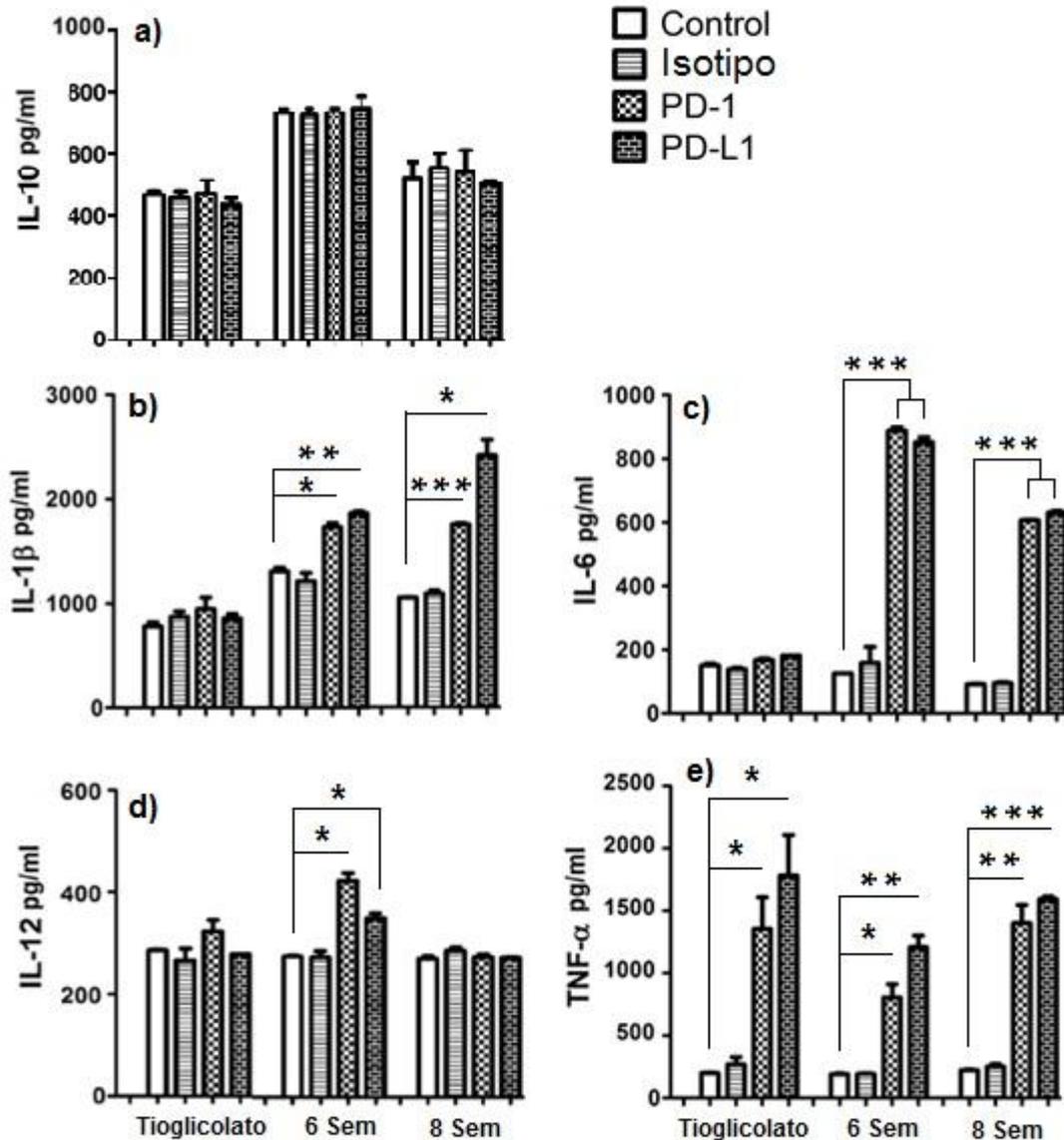


**Figura 11.** Gráficas de la IMF de las muestras teñidas con aPD-1 y a-PD-L1 en una cinética infecciosa de 8 semanas y en PEC's de ratones estimulados con tioglicolato. Datos representativos de 2-3 experimentos independientes con dos repeticiones por experimento.

## 2. Determinación del perfil de citocinas en sobrenadantes de cultivos de macrófagos.

Se midió la concentración de citocinas en sobrenadantes provenientes de cultivos de macrófagos *in vitro* obtenidos de ratones estimulados con tioglicolato o de ratones infectados con el parásito. Para los ratones infectados el sacrificio se realizó en los tiempos indicados, junto con controles no parasitados. Mientras que no se obtuvieron cambios en la secreción de IL-10 (Fig. 12a) entre tratamientos, las citocinas IL-1 $\beta$  (Fig.

12b), IL-6 (Fig. 12c) e IL-12 (Fig. 12d) fueron secretadas en una cantidad significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) por los AAM's estimulados ya sea con aPD-1 o aPD-L1. La secreción de TNF- $\alpha$  aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) en macrófagos reclutados con tioglicolato y AAM's con ambos estímulos (Fig. 12e).

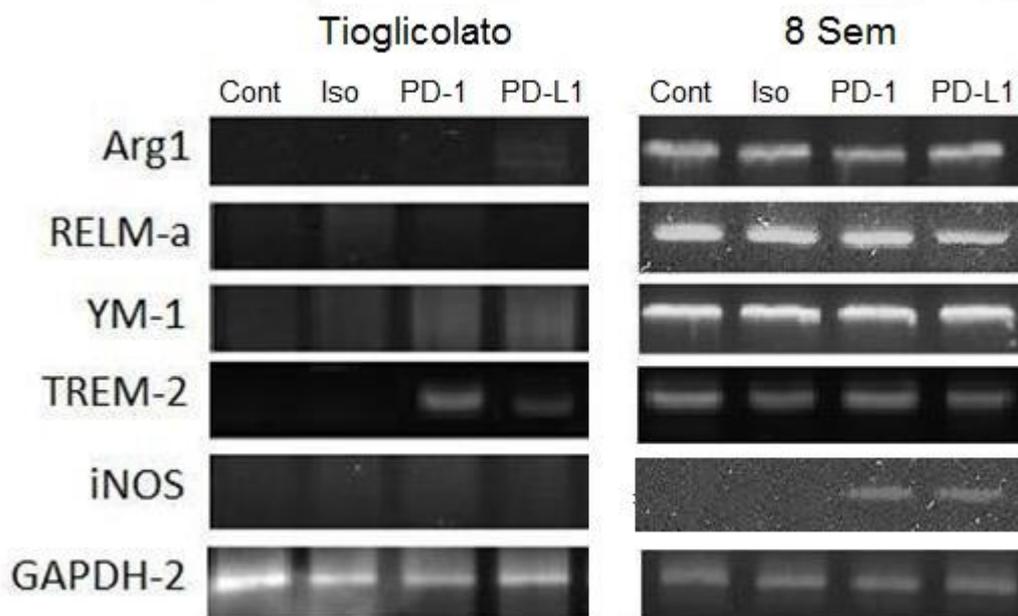


**Figura 12.** Citocinas medidas en sobrenadantes provenientes de cultivos *in vitro* de macrófagos. **a)** No se observa ninguna diferencia significativa en la citocina IL-10 por ninguno de los estímulos. **b)** Tanto PD-1 como PD-L1 señalizan induciendo una mayor secreción de IL-1 $\beta$  en los macrófagos reclutados con tioglicolato o por el parásito. **c)** La estimulación por PD-1 y PD-L1 induce una mayor secreción de la citocina IL-6 en AAM's. **d)** La señalización por PD-1 y PD-L1 induce cambios significativos en la secreción de IL-12 sólo en los AAM's provenientes de ratones con seis semanas de infección. **e)** La señalización por PD-1 y PD-L1 induce cambios significativos en la secreción de TNF- $\alpha$  en macrófagos reclutados por tioglicolato o por el parásito.

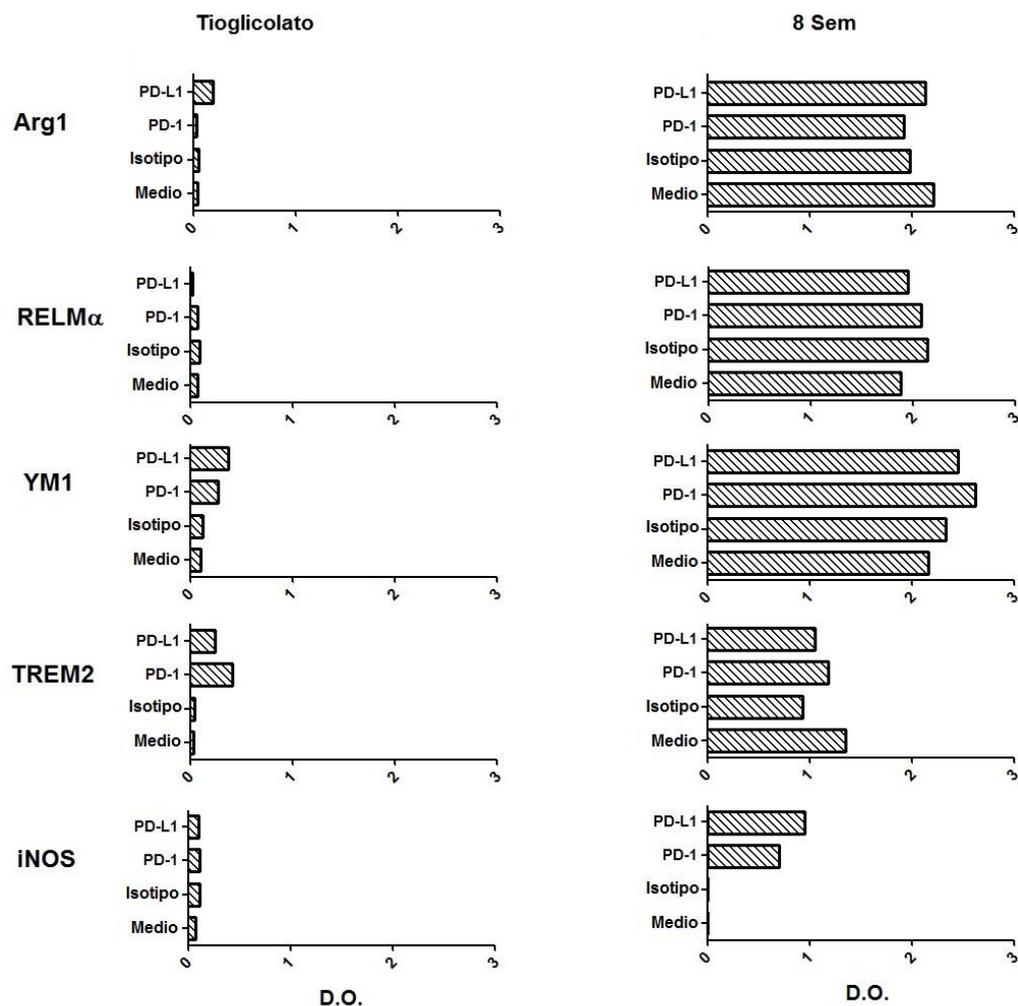
### 3. Determinación de la expresión genética de marcadores de activación de macrófagos.

Los AAM's típicamente tienden a expresar los genes Arg1, RELM $\alpha$ , Ym1, y TREM2, entre otros, mientras los CAM's expresan la enzima iNOS (Reyes y Terrazas, 2007; Jenkins y Allen, 2010). Como parte de la caracterización del efecto del estímulo de PD-1 y PD-L1 en AAM's, determinamos mediante rtPCR la expresión de los principales marcadores de activación de los macrófagos obtenidos de ratones estimulados con tioglicolato u obtenidos a la octava semana de infección. Se realizaron ensayos de densitometría óptica para obtener un análisis más fino.

Como era esperado, los macrófagos obtenidos de ratones estimulados con tioglicolato no expresaron ninguno de los marcadores de activación alternativa, excepto por los que fueron estimulados con aPD-1 o aPD-L1, que expresaron únicamente a TREM2 (Fig. 13) en un factor de casi 2X con respecto a sus controles no estimulados (Fig. 14). De manera opuesta, no se modificó la expresión de ninguno de los marcadores de activación alternativa en los macrófagos obtenidos a las ocho semanas de infección, aunque hubo un drástico aumento en la expresión de iNOS en los AAM's estimulados con aPD-1 o aPD-L1 (Fig. 13) que llega hasta la primera unidad de la escala arbitraria de densidad óptica establecida con respecto a los controles (Fig. 14).



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de genes asociados a la activación clásica y alternativa de macrófagos amplificados por rtPCR donde se observa que la señal enviada por PD-1 y PD-L1 regula positivamente a TREM-2 en macrófagos reclutados con tioglicolato e induce la expresión de iNOS en AAM's obtenidos a la octava semana de infección. Los demás marcadores permanecen sin cambios en ambos grupos celulares.



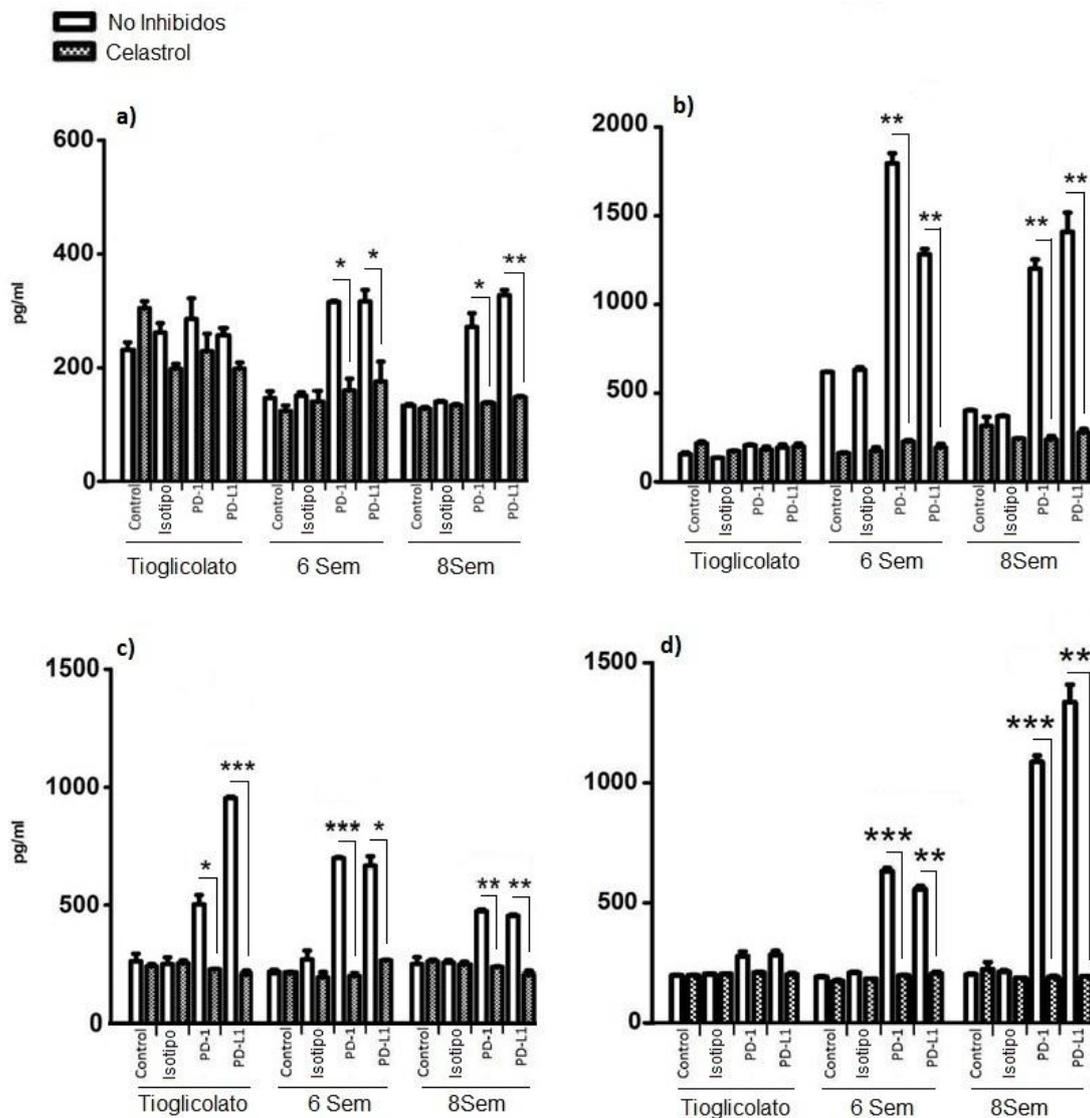
**Figura 14.** Densitometrías ópticas obtenidas a partir de los geles de agarosa para los amplificadores de genes donde se observa en términos cuantitativos que la expresión de TREM-2 se incrementa en macrófagos reclutados con tioglicolato y que la expresión de iNOS se induce en AAM's mientras los demás marcadores permanecen sin cambios en ambos grupos celulares.

#### 4. Inhibición de NF- $\kappa$ B.

Al observar una regulación positiva en la secreción de citocinas reguladas por la familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) (Figs. 12 b-e) y sobre la expresión de iNOS (Figs. 13, 14), pero ningún efecto sobre citocinas (IL-10) (Fig. 12. a) o genes (Arg1, RELM $\alpha$ , Ym1, TREM2) (Figs. 13 y 14) no regulados por éste (Bonizzi y Karin, 2004), se procedió a estimular los receptores en un medio con o sin 5  $\mu$ M de Celastrol, un potente inhibidor de NF- $\kappa$ B que actúa inhibiendo la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , un proceso necesario para la activación y la traslocación nuclear de NF- $\kappa$ B (Sethi *et al.*, 2007).

La regulación positiva de la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 en AAM's de ratones con seis y ocho semanas de infección y estimulados con aPD-1 y aPD-L1 previamente

observada (Figs. 12 b-c) se repitió en éstos nuevos ensayos. Al bloquear la activación de NFκB en los macrófagos con Celastrol, los niveles de tales citocinas fueron inhibidos (Fig. 15 a-c). Nuevamente, cuando los macrófagos fueron tratados con el mismo inhibidor la producción de TNF-α cayó a niveles basales (Fig. 15 d). En conjunto, estos experimentos claramente sugieren la participación de NF-κB en la señalización mediada por PD-1 y PD-L1 en AAM's.



**Figura 15.** Detección de citocinas en sobrenadantes de cultivos de macrófagos *in vitro*. **A)** Los AAM's estimulados con aPD-1 y aPD-L1 secretan mayores cantidades de IL-1β, excepto cuando son tratados con Celastrol. **B)** Los AAM's estimulados con aPD-1 y aPD-L1 secretan mayores cantidades de IL-6, excepto cuando son tratados con Celastrol. **C)** Los AAM's estimulados con aPD-1 y aPD-L1 secretan mayores cantidades de IL-12, excepto cuando son tratados con Celastrol. **D)** Los AAM's y los macrófagos reclutados con tioglicolato y estimulados con aPD-1 y aPD-L1 secretan mayores cantidades de TNF-α, excepto cuando son tratados con Celastrol.

## XI DISCUSIÓN

La expresión de PD-1 y PD-L1 en macrófagos aumenta con el reclutamiento mediante tioglicolato y con el avance de la cinética de infección. Su regulación positiva se ve reflejada en el aumento en el tamaño de las poblaciones F4/80+ PD-1+ y F4/80+ PD-L1+ y en el aumento de la IMF. Aunque previamente se había reportado la expresión de PD-1 en CAM's (Huang *et al.*, 2009), este estudio constituye el primer reporte de la expresión del receptor en AAM's. Los datos sobre la elevada expresión de PD-L1 son consistentes con lo previamente observado por Terrazas y cols., (2005).

En el presente estudio, no se obtuvieron cambios en la secreción de IL-10 al estimular a PD-1 ni a PD-L1 en MRT ni en AAM's. Las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 fueron secretadas en una cantidad significativamente mayor por los AAM's estimulados ya sea con aPD-1 o aPD-L1 y la secreción de TNF- $\alpha$  aumentó significativamente en MRT y AAM's con ambos estímulos.

Previamente se observó una regulación negativa de IL-1 $\beta$  (Huang *et al.*, 2009), IL-6 (Huang *et al.*, 2010; Peña-Cruz *et al.*, 2010), IL-10 (Chemnitz *et al.*, 2004; Peña-Cruz *et al.*, 2010), IL-12 y TNF- $\alpha$  (Huang *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009) en respuesta al estímulo de PD-1, así como una supresión de la secreción de TNF- $\alpha$  y un aumento en la secreción de IL-10 debida a la señalización por PD-L1 (Kuipers *et al.*, 2006), ambos efectos explicados por el bloqueo de las vías de señalización de TCR en linfocitos estimulados con anti-CD3/CD28 (Chemnitz *et al.*, 2004) o de TLR's en macrófagos y DC's estimuladas con ligandos de TLR's (Huang *et al.*, 2009; Peña-Cruz *et al.*, 2010).

La inconsistencia de los resultados con respecto a éstos antecedentes puede deberse al tipo de activación de las células utilizadas en los ensayos, dado que se ha observado que por lo menos PD-1 tiene la capacidad de bloquear a otras vías de señalización activas al momento de su activación (Okazaki *et al.*, 2001; Chemnitz *et al.*, 2004; Sheppard *et al.*, 2004; Parry *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2009; Franceschini *et al.*, 2009; Peña-Cruz *et al.*, 2010). En los estudios previos de señalización por PD-1 se utilizaron CAM's inducidos por septicemia (Huang *et al.*, 2009), DC's estimuladas con productos bacterianos (Yao *et al.*, 2009) o ligandos de TLR's (Peña de la cruz *et al.*, 2010), linfocitos Th1 (Franceschini *et al.*, 2009) o linfocitos activados con estímulos policlonales (Bennet *et al.*, 2003; Chemnitz *et al.*, 2004; Sheppard *et al.*, 2004; Parry *et al.*, 2005), pero no se han hecho estudios de señalización por éstos receptores en células antiinflamatorias, donde las vías de señalización activas son otras. Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser los primeros en su tipo.

El estímulo por PD-1 o PD-L1 indujo la expresión de la enzima iNOS en AAM's, aunque no tuvo ningún efecto sobre la expresión de los otros marcadores de activación medidos (Arg1, RELM $\alpha$ , Ym1, TREM2). En estudios recientes Dulgerian y cols., (2010) observaron una regulación positiva en la secreción de ON en macrófagos infectados *in vitro* con *Trypanosoma cruzi* al bloquear PD-1 y PD-L1, mientras que Huang y cols., (2009) observaron que la señalización por PD-1 reducía la capacidad fagocítica de los CAM's, volviéndolos menos eficientes ante las infecciones bacterianas. En contraste,

en nuestro estudio encontramos una regulación positiva de iNOS al estimular a PD-1 y PD-L1 lo cual puede deberse a la diferencia en el estado de activación de los macrófagos, ya que aunque los AAM's sufren un incremento en su capacidad endocítica, son incapaces de ejercer funciones microbicidas, dada su baja expresión de iNOS, mientras que en los CAM's ocurre lo contrario (Martínez *et al.*, 2009; Dulgerian *et al.*, 2010).

En cultivos celulares realizados bajo las mismas condiciones, se repitió la regulación positiva de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ , aunque al añadir al inhibidor de NF-kB, Celastrol, la expresión de las citocinas fue abatida a niveles basales, tanto en MRT como en AAM's, sugiriendo claramente que la señal enviada por PD-1 y PD-L1 en estos macrófagos favorece la activación de la vía NF-kB.

Múltiples autores han observado una regulación negativa de IL-1 $\beta$  (Huang *et al.*, 2009), IL-6 (Huang *et al.*, 2010; Peña-Cruz *et al.*, 2010), IL-12 y TNF- $\alpha$  (Huang *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009) en respuesta al estímulo de PD-1, así como la supresión de la secreción de TNF- $\alpha$  debida a la señalización por PD-L1 (Kuipers *et al.*, 2006) y la regulación negativa de iNOS por la señalización de ambos receptores (Dulgerian *et al.*, 2010) en células inducidas mediante estímulos proinflamatorios capaces de activar las vías de señalización que detonan la translocación nuclear de NF-kB (Okazaki *et al.*, 2001; Chemnitz *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2009, Yao *et al.*, 2009, Peña-Cruz *et al.*, 2010), tales como las de BCR, TCR y TLR's (Bonizzi y Karin, 2004), sugiriendo que PD-1 y PD-L1 son capaces de bloquear a éstas vías, impidiendo la activación de NF-kB. Más aún, datos recientes sugieren una interacción negativa entre TLR2 y la vía de STAT6 (Reyes *et al.*, 2011), por lo cual es posible que PD-1 y PD-L1 favorezcan la activación de NF-kB al bloquear la vía de STAT6, aunque es necesaria más investigación para clarificar este punto.

Ishiwata y cols., (2010) observaron que el bloqueo *in vivo* de PD-L2, pero no de PD-1 influye positivamente en el reclutamiento de eosinófilos y la secreción de IgE, lo cual puede deberse a la existencia de un segundo ligando para PD-L2 o a la señalización inversa por éste receptor. El estudio de la señalización inversa por los ligandos de PD-1 y por PD-1 en las distintas APC's con diversos estados de activación, así como sus mecanismos de señalización, puede ayudar al estudio completo de la vía, otorgándonos nuevas posibilidades de inmuno-regulación mediada por fármacos dirigidos hacia ésta vía. Estudios subsecuentes que profundicen en éstos temas son necesarios.

La inducción de citocinas proinflamatorias y de iNOS en AAM's mediada por la activación de PD-1 y PD-L1, puede favorecer la inmunidad frente a la cisticercosis, ya que la protección contra éste parásito es mediada por respuestas tipo Th1 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002b; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2004) y ON (Alonso-Trujillo *et al.*, 2007).

## XII CONCLUSIONES

- 1.- Los AAM's expresan a PD-1.
- 2.- La expresión de PD-1 y PD-L1 en AAM's se incrementa en el transcurso de la infección con *T. crassiceps*.
  - 2.- Cuando PD-1 y PD-L1 se ligan a sus agonistas, inducen a los AAM's a producir altos niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ , aunque los niveles de secreción de IL-10 permanecen sin cambios.
- 3.- La activación de PD-1 y PD-L1 regula positivamente la expresión de la enzima iNOS en AAM's, aunque la expresión de los marcadores de activación alternativa (Arg1, Ym1, RELMa, TREM2) permanecen sin cambios.
- 4.- La regulación positiva de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$  en AAMs por la activación de PD-1 y PD-L1 es dependiente de la activación de NF-kB.
- 5.- El presente estudio es el único acerca de la señalización de los receptores PD-1 y PD-L1 en células con actividad antiinflamatoria-supresora.

## XIII Anexo 1

Tinción de muestras para citometría de flujo.

- 1) Se introdujeron 1,000,000 de células totales en tubos para citometría de flujo (Sarstedt, Numberecht, Alemania).
- 2) Se agregó 1ml de buffer FACS (BD Biosciences, México, México DF) por tubo.
- 3) Se centrifugó a 3000 rpm/10 min y se decantó el sobrenadante.
- 4) Los receptores Fc se bloquearon para evitar la unión no específica de los anticuerpos usando  $\alpha$ -CD16/32 a una concentración de 0.25  $\mu$ g/1,000,000 células.
- 5) Las células fueron resuspendidas e incubadas 15 min a 4 °C.
- 6) Se agregó 1 ml de buffer de FACS a cada tubo y se centrifugó a 3000 rpm/10 min procediendo a decantar el sobrenadante.
- 7) Las células se resuspendieron y se les agregó 1  $\mu$ g de anticuerpo (dirigido al marcador buscado) por cada millón de células.
- 8) Las muestras se incubaron 20 min a 4 °C.
- 9) Se agregó 1ml de buffer de facs por tubo y se centrifugó a 3000 RPM por 10 min.
- 10) Se decantaron los sobrenadantes y se resuspendieron las células con 100  $\mu$ l de paraformaldehído al 4 %.
- 11) Las muestras se guardaron a 4 °C en la oscuridad hasta su posterior lectura.

## XIV Anexo 2

### • Sensibilización de placas

- 1) Se diluyó el anticuerpo de captura en concentración de 2  $\mu$ g/ml en 10 ml de PBS (80 g NaCl, 11.6 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 2.0 g KCl; aforado a 10 L pH a 7.0) y se agregaron 100  $\mu$ l de la dilución a cada pozo en placas Maxi Sorp (NUNC, USA).
- 2) Se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó a 4°C toda la noche.

### • Bloqueo de uniones no específicas

- 3) Posteriormente se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween (1 ml de Tween-20 en 2 L de PBS 1X) y se secó golpeándola levemente en toallas dobladas.
- 4) Se agregaron 200  $\mu$ l de Blocking Buffer (0.2 g de albúmina sérica de bovino/20 ml de PBS para cada placa) por pozo.
- 5) La placa se cubrió con papel aluminio y se incubó a 37 °C durante 2.5 hrs.
- 6) La placa se lavó 3 veces con PBS-Tween y se secó golpeándola en toallas.

### • Realización de la curva patrón y preparación de muestras

- 7) Se agregaron 100  $\mu$ l de PBS en los pozos destinados a la curva patrón excepto en el primero de la línea.
- 8) Se agregaron 10  $\mu$ g de citosina recombinante/200  $\mu$ l de PBS en los primeros dos pozos y de ellos se tomó 100  $\mu$ l, disolviéndolos en el siguiente pozo con PBS. El procedimiento de disolución se repitió sucesivamente hasta llegar a los pozos destinados para el blanco, a los cuales no se les agregó la citocina.

- 9) La placa se cubrió y se incubó de 2-4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
- 10) Las muestras se colocaron directamente y se incubaron a 4°C toda la noche.

- **Detección**

- 11) La placa se lavó 4 veces con PBS-Tween.
- 12) El anticuerpo biotinilado a concentración 1µg/ml se diluyó en 10 ml de PBS y se agregaron 100 µl a cada pozo.
- 13) La placa cubierta de papel aluminio se incubó 1 hr a 37 °C.
- 14) Se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween.
- 15) Se diluyeron 5µl de avidina o estreptavidina en 10 ml de PBS-BSA y se agregaron 100 µl por pozo.
- 16) La placa cubierta se incubó a 37 °C por 30 min.
- 17) La placa se lavó 6 veces con PBS/Tween.
- 18) Se agregaron 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 11 ml de ABTS (150 mg de 2,2'-Azino-bis-(3-etilbenziasolina-6-sulfónica) en 500mg de ácido cítrico anhidro 0.1 M en ddH<sub>2</sub>O y ajustar pH a 4.35) e inmediatamente después se pusieron 100 µl de la solución en cada pozo.
- 19) La placa se incubó en la oscuridad y a temperatura ambiente hasta desarrollar color.
- 20) La placa se leyó a 405 nm en un lector de placas Multiscan Ascent (TermoLab Systems, USA).

### **XV Anexo 3**

Reversotranscripción (Kit SuperScript Fermentas, México, México DF):

- 1) Se realizó una solución de: 1 µg de RNA de la muestra y 1 µl de oligo dT a la cual se le ajustó el volumen final a 12 µl usando agua molecular.
- 2) La solución se calentó a 65 °C por 5 minutos en un termociclador.
- 3) A la mezcla se le agregaron 8 µl de la siguiente solución: 4 µl de buffer 5x, 2 µl de dNTP's 10 µM, 1 µl del inhibidor RiboLock y 1 µl de la enzima SuperScript.
- 4) Las muestras se calentaron en el termociclador a 42 °C por 60 min, 70 °C por 5 min y finalmente 10 °C por 3 min.

PCR (Kit Kappa Taq PCR, México, México DF):

- 1) Se realizó una solución de 2.5 µl de buffer 10x, 0.5 µl de dNTP's 10 µM, 0.5 µl de primer F y R (Cuadro 2), respectivamente, 0.5 µl de Taq Polimerasa y 2 µg de cDNA.
- 2) El volumen final de la solución se ajustó a 23 µl con agua molecular.
- 3) La muestra se calentó en el termociclador a 94 °C por 40 seg, 54 °C por 60 seg y 72 °C por 45 seg durante 35 ciclos para todos los genes.

**Cuadro 2.** Primers usados para la amplificación de los marcadores

Gen	Secuencia	Temperatura de alineamiento (°C)
GAPDH	F- CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC R-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	54
iNOS	F-CTGGAG GAG CTC CTG CCT CATG R-GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG	65
Arg-1	F-CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG R-CAG ATA TGC AGG GAG TCA CC	54
Relm- $\alpha$	F-GGTCCCAGTGCATATGGATGAGACCATAGA R-CACCTCTTCACTCGAGGGACAGTTGGCAGC	62
Ym-1	F-TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG R-TTTGTCTTAGGAGGGCTTCTC	56

## XVI Referencias

- Abbas, A. K., Litchman, A. H., Pillai, S. 2007. Cellular and molecular immunology. *Saunders, El Sevier*. Filadelfia, USA. 6<sup>th</sup> ED. 575 pp.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., Honjo, T. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* **8**(5): 765-772.
- Alonso-Trujillo, J., Rivera-Montoya, I., Rodríguez-Sosa, M., Terrazas, L.I. 2007. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol. Res.* **100**:1341-1350.
- Ansari, M. J. y Sayegh, M. H. 2006. Costimulation couture: a designer approach to regulating autoimmunity. *J. Clin. Inv.* **116**(8):2080-2083.
- Anthony, R. M., Rutitzcky, L. I., Urban Jr, J. F., Stadecker, M. J. y Gause, W.C. 2007. Protective immune mechanisms in helminth infections. *Nat. Rev. Immunol.* **7**(12): 975–987.
- Bennett, F., Luxenberg, D., Ling, V., Wang, I., Marquette, K., Lowe, D., Khan, N., Veldman, G., Jacobbs, K. A., Valge-Archer, V. E., Collins, M & Carreno, B. M. 2003. PD-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, IL-21, but not CD28, IL-7, IL-15 responses. *J. Immunol.* **170**:711-718.
- Bonizzi, G. & Karin, M. 2004. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**(6): 280-289.
- Bretscher, P., and Cohn, M. 1970. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science.* **169**:1042–1049.
- Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H., Freeman, G. J. 2007. Programmed Death-Ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T-cell responses. *Immunity.* **27**:111-122.
- Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with the Immunoreceptor Tyrosine Switch-Based Motif of PD-1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.* **173**: 945-954.
- Collins, M., Ling, V., Carreno, B. M., 2005. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Gen. Biol.* **6**:223-229.
- Cooley, D.G., Sasser, L.E., Reed, A.M. 2005. PD-L2+ dendritic cells and PD1+ CD4+ T cells in schistosomiasis correlates with morbidity. *Parasite Immunol.* **27**:45-53
- Cook, P.C., Aynsley, S.A., Turner, J.D., Jenkins, G.R., Van Rooijen, N., Leeto, M., Brombacher, F., Mountford, A.P. 2011. Multiple helminth infection of the skin causes lymphocyte

hiporesponsiveness mediated by Th2 conditioning of dermal myeloid cells. *Plos Path.* **7**(3):1-14.

Dulgerian, L. R., Garrido, V. V., Stempin, C. C., Cerbán, F. M. 2010. Programmed Death-Ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Tripanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. *Immunology*. Article ID: 13329-40.

Franceschini, D., Paroli, M., Francavilla, V., Videtta, M., Morrone, S., Labbadia, G., Cerino, A., Mondelli, M. U. & Barnaba, V. 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. *J. of Clin. Inv.* **119**: 551-554.

Heldwein, K., Biedermann, H., Hamperl, W., Bretzel, G., Loscher, T., Laregina, D., Frosch, M., Buttner, D., Tappe, D. 2006. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a Non-Hodgkins lymphoma patient. *Am. J. of Trop. Med. Hyg.* **75**(1): 108-111.

Herbert, D., Holscher, C., Mohrs, M., Arendse, M., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, M., Hall, P., Mossmann, H., Claussen, B., Forster, I., Brombacher, F. 2004. Alternative activation of macrophages is essential for survival during Schistosomiasis and downregulates Th1 responses and immunopathology. *Immunity*. **20**: 623-635.

Hoberg, E. P., Ebinger, W., Render, J. A. 1999. Fatal cisticercosis by *Taenia crassiceps* in a presumed immunocompromised canine host. *J. of Parasitol.* **85**(6): 1174-1178.

Huang, X., Venet, F., Wang, Y. L., Lepape, A., Yuan, Z., Chen, Y., Swan, R., Kherouf, H., Monneret, G., Chung, C. & Ayala, A. 2009. PD-1 expressed by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *PNAS*. **16**(15): 6303-6308.

Huber, S., Hoffmann, R., Muskens, F., Voehringer, D. 2010. Alternatively activated macrophages inhibit t-cell proliferation by STAT6-dependent expression of PD-L2. *Blood*. **116**: 3311-3320.

Ishiwata, K., Watanabe, N., Guo, N., Tomihara, K., Brumlick, M.J., Yagita, H., Pardoll, D., Shen, L., Shin, T. 2010. Costimulator B7-DC attenuates strong Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.* **184**:2086-2094.

Jenkins, S. J., Allen, J. E. 2010. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes and cestodes. *J. of Biomed. and Biotech.* Article ID: 378498675.

Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., Sharpe, A. H. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Ann. Rev. Immunol.* **26**:677-704.

Keir, M. E., Francisco, L. M., Sharpe, A. H. 2007. PD-1 and its ligands in T cell immunity. *Curr. Op. Immunol.* **19**: 309-314.

Kindt, T. J., Goldsby, R.A., Osborne, B. A. 2006. Kuby: Immunology. *Trade Paperback*. Texas, USA. 6<sup>th</sup> Ed. 476 pp.

- Kuipers, H., Muskens, F., Willart, M., Hijdra, D., Assema, F. B. J., Coyle, A. J., Hoogsteden, H. C., Lambrecht, B. N. 2006. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell mediated CD4+ T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **36**:2472-2482.
- Lachtman, Y. E., Liang, S. C., Wu, Y., Chernova, T., Sobel, R. A., Klemm, M., Kuchroo, V. K., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. 2004. PD-L1 deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen presenting cells and host tissues negatively regulates t cells. *PNAS.* **101**(29): 19691-10696.
- Lafferty, K.J., Prowse, S.J., Simeonovic, C.J., and Warren, H.S. 1983. Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Ann. Rev. Immunol.* **1**:143–173.
- Lafferty, K.J., and Woolnough, J. 1977. The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol. Rev.* **35**:231–262.
- Lázár-Molnár, E., Yan, Q., Cao, E., Ramagopal, U., Nathenson, S. G. & Almo, S. C. 2008. Crystal structure between programmed death-1 (PD-1) and it's ligand PD-L2. *PNAS.* **105**(30): 10483-10488.
- Lin, D. Y., Tanaka, Y., Iwasaki, M., Gittis, A. G., Suu, H., Mikami, B., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., Garbokzi, D. N. 2007. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen binding the Fv domains of antibodies and T cell receptors. *PNAS.* **105**(8): 3011-3016.
- Locke, P. & Allison, J. P. 2003. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *PNAS.* **100**(9): 5336-5341.
- Locke, P., Allison, J.P. 2004. Emmerging mechanisms of immune regulation: The extended B7 family and regulatory T cells. *Arth. Res. Ther.* **6**: 208-2014.
- Maizels, R.M., Balic. A., Gomez-Escobar, N., Nair, M. Taylor, M.D. & Allen, J. E. 2004. Helminth parasites: Masters of regulation. *Immunol. Rev.* **201**: 89-116.
- Maizels, R. M., Pearce, E. J., Artis, D., Yazdanbakhsh, M., Wynn, T. A. 2009. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J. Exp. Med.* **206**(10): 2059-2056.
- Martin-Orozco, N., Wang, Y., Yagita, H., Dong, C. 2006. Programmed Death- Ligand 1/PD-1 interaction is required for CD8+ T lymphocyte tolerance to tissue antigens. *J. Immunol.* **177**(12):8291-8297.
- Martínez, F. O., Helming, L., Gordon, S. 2009. Alternative activation of macrophages: An Immunologic functional perspective. *Ann. Rev. Immunol.* **27**:451-83.
- McSorley, H. J., Harcus, Y. M., Murray, J., Taylor, M. D., Maizels, R. M. 2008. Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*. *J. Immunol.* **181**:6456-6466.
- Mylonas, K. J., Naair, M. G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D., Allen, J. E. 2009. Alternatively Activated Macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J. Immunol.* **182**:3084-3094.

- Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., Honjo, T. 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits BCR mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *PNAS*. **98**(24): 13866-13871.
- Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirt, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B. & Riley, J. L. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molec. And Cell. Biol.* **25**(21): 9543-9553.
- Peña-Cruz, V., McDonough, S. M., Diaz-Griffero, F., Crum, C. P., Carrasco, R. D. & Freeman, G. 2010. PD-1 on immature and PD-1 ligands on migratory human Langerhans cells regulate antigen presenting cell activity. *J. Invest. Dermatol.* **130**(9): 2222-2230.
- Reyes, J. L., & Terrazas, L. I. 2007. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite. Immunol.* **29**:609-619.
- Reyes, J.L., Terrazas, C. A., Alonso-Trujillo, J., van Rooijen, V., Satoskar, A. R., Terrazas, L. I. 2010. Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo. *Int. J. Parasitol.* (2010), doi:10.1016/j.ijpara.2009.11.014
- Reyes, J. L., Gonzáles, M. I., Ledesma-Soto, Y., Satoskar, A. R., Terrazas, L. I. 2011. TLR2 mediates immunity to experimental cysticercosis. *Int. J. of Biol. Sci.* **7**(9): 1323-1333.
- Reyes, J.L., Terrazas, C.A., Vera-Arias, L. Terrazas, L.I. 2009. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Inf. Gen. Evol.* **9**:1115-1127.
- Rodríguez-Sosa, M., David, J.R., Bojalil, R., Satoskar, A.R., Terrazas, L. I. 2002b. Susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 responses induced via STAT6 signaling. *J. Immunol.* **168**:3135-3139.
- Rodríguez-Sosa, M., Saavedra, R., Tenorio, E. P., Rosas, L.E., Satoskar, A.R., Terrazas, L.I. 2004. A STAT4 dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Inf. and Immun.* **72**(8): 4552-4560.
- Rodríguez-Sosa, M., Satoskar, A. R., Calderón, R., Gomez-Garcia, L., Saavedra, R., Bojalil, R., Terrazas, L. I. 2002. Chronic Helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low IL-12 production and Th2 biasing ability. *Inf. and Immun.* **70**(7): 2656-3666.
- Rodríguez-Sosa, M., Sosas, L. E., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., Terrazas, L. I. Macrophage Migration Inhibitory Factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Inf. and Immun.* **71**(3): 1247-1254.
- Schmid-Hempel, P. 2009. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for “macroscopic phenomena” such as virulence. *Phil. Trans. R. Soc. B* **364**: 85–98.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. 2011. The pro and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Bioch. et Bioph. Acta.* **1813**: 878-888.

- Sethi, G., Ahn, K. S., Pandley, M. K., Aggarwal, B.B. 2007. Celastrol, a novel triterpene potentiates TNF-induced apoptosis and suppress invasion of tumor cells by inhibiting NF-kB gene products and TAK1-mediated NF-kB activation. *Blood*. **109**:2727-2735.
- Sharpe, A. H., Freeman, G. J. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:116-126.
- Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., Freeman, G. J. 2007. The function of programmed death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* **8**(3): 239-245.
- Sheppard, K. A., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J. M., Carter, L. L., Wood, C. R. & Chaudhary, D. 2004. PD-1 inhibits T-cell receptor induced fosforilation of the ZAP70/CD3 $\zeta$  signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *FEBS Letters*. **574**: 37-41.
- Smith, P., Walsh, C.M., Mangan, N.E., Fallon, R.E., Sayers, J.R., McKenzie, A.N.J., Fallon, P.G. 2004. Schistosoma mansoni worms induce anergy of T cells via up regulation of programmed Death Ligand-1 in macrophages. *J. Immunol.* **173**:1240-1248.
- Stempin, C.C., Dulgerian, L.R., Garrido, V.V., Cerban, F.M. 2010. Arginase in parasitic infections: Macrophage activation, immunosuppression and intracellular signals. *J. of Biom. and Biot.* Article ID 683485.
- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, G. 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., Montero, D., Terrazas, C.A., Reyes, J.L., Rodríguez-Sosa, M. 2005. Rol for the Programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int. J. for Parasitol.* **35**: 1349-1358.
- Yao, S., Wang, S., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., Flies, F., Xu, H., Ruff, W., Broadwater, M., Choi, I., Tamada, K. & Chen, L. 2009. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood*. **113** (23): 5811-5818.
- Wang, J., Okazaki, I., Yoshida, T., Chikuma, S., Kato, Y., Nakaki, F., Hiai, H., Honjo, T., Okasaki, T. 2010. PD-1 deficiency results in the development of fatal cardiomyopathy in MRL mice. *Int. Immunol.* **22**(6):443-452.
- Zhu, B., Guleria, I., Khosroshai, A., Chitnis, T., Imitola, J., Azuma, M., Yagita, H., Sayegh, H.H., Khoury, S.J. 2006. Differential role of Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death Ligand 2 in regulating the susceptibility and cronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **176**: 3480-3489.