



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

*“Estudio de los mecanismos de acción utilizados por las células T reguladoras durante la fase aguda de la infección con *Toxoplasma gondii*”.*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

NOHEMÍ SALINAS JAZMÍN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. MARZO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de noviembre del 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **SALINAS JAZMÍN NOHEMI** con número de cuenta **97195890** con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN UTILIZADOS POR LAS CELULAS T REGULADORAS DURANTE LA FASE AGUDA DE LA INFECCION CON TOXOPLASMA GONDII"**, realizada bajo la dirección del **DR. RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURÁN**:

Presidenta: DRA. PAZ MARÍA SILVIA SALAZAR SCHEITINO
Vocal: DR. EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELÁZQUEZ
Secretaria: DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
Suplente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
Suplente: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de febrero del 2015.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Agradezco a los miembros del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por todo el apoyo que me han brindado durante el desarrollo de mis estudios de posgrado.

Apoyos recibidos:

La beca de estudios de posgrado fue otorgada por CONACyT: Becario 17035

Este proyecto fue parcialmente financiado por:

CONACyT: 102399 y 102984

Papiit (DGAPA): IN-200608 y IN-209111

Por medio de estas líneas quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Rafael Saavedra Durán del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad Universitaria, UNAM, quien fungió como mi tutor y al Comité Tutoral integrado por la Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo del Centro Médico Nacional Siglo XXI (Facultad de Medicina) y Al Dr. Enrique Ortega Soto del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Dedicatoria

A mi familia

A mis amigos y compañeros de vida

A todas las personas que han impulsado mi vida académica y personal

A todos lo que me han apoyado y han luchado a mi lado para superar y aceptar los hechos que no puedo cambiar

Gracias por brindarme el privilegio de vivir y crecer

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUCCIÓN	12
A. <i>Toxoplasma gondii</i>	12
B. <i>Ciclo de Vida de Toxoplasma gondii</i>	12
C. <i>Toxoplasmosis</i>	16
D. <i>Epidemiología</i>	18
E. <i>Respuesta inmune inducida por T. gondii</i>	21
F. <i>Inmunosupresión durante la fase aguda de la infección con T. gondii</i>	25
G. <i>Células T reguladoras</i>	26
H. <i>Mecanismos de supresión de las células T_{regs}</i>	32
I. <i>Células T_{regs} y T. gondii</i>	37
J. <i>Justificación</i>	40
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS	42
1. <i>Animales de estudio</i>	42
2. <i>Parásitos e Infección</i>	42
3. <i>Reactivos</i>	43
4. <i>Cultivos celulares</i>	44
5. <i>Purificación de anticuerpos (mAb) a partir de sobrenadantes de cultivos de hibridomas</i>	45
6. <i>Inmunofluorescencia (IFA) y citometría de flujo</i>	45
7. <i>Purificación de células por “cell sorting”</i>	48
8. <i>Cuantificación de IL-2 en sobrenadantes</i>	51
9. <i>Análisis de la expresión del mRNA de IL-2 por RT-PCR</i>	52
10. <i>Bioensayo de IL-2</i>	53
11. <i>Análisis estadístico</i>	54
IV. RESULTADOS	55
CAPÍTULO 1. <i>Inmunosupresión de células T estimuladas con el anticuerpo anti-CD3</i>	55
CAPÍTULO 2. <i>Análisis de moléculas de superficie en células T_{regs}</i>	60
CAPÍTULO 3. <i>Análisis de los mecanismos de supresión de las T_{regs} durante la infección</i>	64
CAPÍTULO 4. Resumen de hallazgos publicados en el artículo: T cell-suppression in vitro during Toxoplasma gondii infection is the result of IL-2 competition between Tregs and T cells leading to death of proliferating T cells.	72
CAPITULO 5. <i>Información suplementaria</i>	85
V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	88
VI. REFERENCIAS.....	94

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Ciclo de Vida de T. gondii (4).</i>	13
<i>Figura 2. Estadios de T. gondii.</i>	13
<i>Figura 3. Reproducción de T. gondii.</i>	16
<i>Figura 4. Análisis de la seroprevalencia a nivel mundial para T. gondii.</i>	19
<i>Figura 5. Seroprevalencia de anticuerpos contra T. gondii en México.</i>	20
<i>Figura 6. Respuesta Inmune contra T. gondii.</i>	24
<i>Figura 7. Origen de las células T_{regs}.</i>	30
<i>Figura 8. Células T_{regs} "híbridas" .</i>	32
<i>Figura 9. Mecanismos de acción de células T_{regs}.</i>	37
<i>Figura 10. Esquema de la estrategia para purificación de células T.</i>	49
<i>Figura 11. Estandarización de la inducción de la proliferación de linfocitos de bazo de ratones C57BL/6.</i>	56
<i>Figura 12. Estrategia para el análisis cuantitativo de la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T.</i>	57
<i>Figura 13. Inmunosupresión de linfocitos inducida por la infección con T. gondii en ratones C57BL/6.</i>	59
<i>Figura 14. Análisis de la expresión de moléculas de activación en T_{regs} durante la infección con T. gondii.</i>	62
<i>Figura 15. Análisis de la expresión de moléculas en células T involucradas en la regulación por T_{regs} durante la infección con T. gondii.</i>	63
<i>Figura 16. Estandarización de las concentraciones de anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 para estimular la proliferación de linfocitos T purificados.</i>	65
<i>Figura 17. Las APC no participan en la supresión de células T in vitro.</i>	67
<i>Figura 18. La supresión de células T de ratones infectados tiene una intensidad similar en presencia o ausencia de APC.</i>	67
<i>Figura 19. Las células T_{regs} inducen supresión de la proliferación en presencia o ausencia de APC's.</i>	68
<i>Figura 20. El bloqueo con el anticuerpo anti- CTLA-4 no revierte la supresión de la proliferación.</i>	70
<i>Figura 21. El bloqueo con el anticuerpo anti-CD80 no revierte la supresión.</i>	70
<i>Figura 22. Las células T de ratones infectados cursan un estado de anergia durante la infección.</i>	72
<i>Figura 23. Las células Tregs no inhiben la expresión del mRNA de IL-2 en células T de ratones infectados con T. gondii. S.</i>	85
<i>Figura 24. Las células Tregs de ratones infectados son capaces de inducir la muerte de células de ratones no infectados.</i>	87

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de la subpoblaciones de células T_{regs} .	31
Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados durante el desarrollo del presente trabajo.	44
Tabla 3. Descripción de reactivos para el desarrollo del ELISA para cuantificar IL-2.	51
Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación de IL-2 y β -actina.	53

RESUMEN

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) es un parásito intracelular que se distribuye en todo el mundo y se ha estimado que un tercio de la población está infectada. La toxoplasmosis es clínicamente asintomática en individuos aparentemente sanos, pero puede causar complicaciones graves en pacientes inmunocomprometidos y en mujeres no inmunizadas antes del primer embarazo. Durante la infección con *T. gondii* se promueve una respuesta inmune celular tipo Th1, caracterizada por una elevada producción de IL-12 que activa a las células NK y a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ para que produzcan IFN- γ . Los macrófagos activados por IFN- γ producen TNF- α e intermediarios de oxígeno y nitrógeno, que promueven la destrucción del parásito. En ratones infectados con *T. gondii* se ha reportado que durante la fase aguda de la infección existe una marcada disminución de la proliferación (inmunosupresión) de células T en respuesta a diversos mitógenos y antígenos del parásito. En busca de los mecanismos implicados en la supresión de la proliferación, diversos autores han demostrado que en el fenómeno de inmunosupresión participan diversas moléculas como los intermediarios reactivos de nitrógeno, la indolamina-dioxigenasa (IDO), los altos niveles de IL-10 y los bajos niveles de IL-2.

Las células T_{regs} son una población de células T CD4⁺ que mantienen la homeostasis del sistema inmune (participan en el control de la autoinmunidad, respuesta inmunitaria contra tumores, los trasplantes de tejidos y agentes infecciosos) y participan en la supresión inducida por la infección con *T.gondii*.

Recientemente nuestro grupo describió *in vitro* una proliferación reducida a mitógenos de células de bazo de ratones que cursan la fase aguda de la infección con *T. gondii*. Se describió que las células T_{regs} (Foxp3⁺) regulan esta supresión por medio de un mecanismo dependiente de IL-2. En este trabajo se analizó el mecanismo de esta supresión mediada por células T_{regs}. Se evaluó la expresión de moléculas de superficie (CTLA-4, LAG-3, PDL-1, FAS-L, GITR, CD25) en las células T_{regs} que pudieran estar implicadas con la activación de las células T_{regs} y la inmunosupresión de las células T efectoras (T_{efec}).

Encontramos que la eliminación de las células presentadoras de antígeno (APC) de las células de bazo de ratones infectados, no modifican la supresión y que la eliminación adicional de células T_{regs} conduce a la restauración de la proliferación. Este hallazgo demuestra que las células T_{regs} regulan la supresión de la proliferación en ausencia de APC. Por otro lado observamos que la producción de IL-2 por las células T de

ratones infectados fue revocada, pero parcialmente se restauran los niveles de IL-2 cuando se eliminan las células T_{regs}. Adicionalmente, observamos que los niveles de IL-2 y la proliferación de células T se restauran cuando las células T_{regs} y las células T se separaron por *transwells*, lo que indica que las células T_{regs} requieren una estrecha proximidad con las células T para inducir la supresión. Por otro lado, las células T_{regs} de los ratones infectados fueron capaces de reducir la proliferación de células CTLL-2 en un bioensayo de IL-2, lo que sugiere fuertemente que las células T_{regs} compiten con las células T por la IL-2. Además, hemos demostrado que las células T_{regs} de ratones infectados no inhiben la transcripción de IL-2. Encontramos que las células T de ratones infectados mueren después de unas cuantas rondas de división, pero la adición de rIL-2 o la eliminación de células T_{regs} revocaron este efecto. En general, nuestros resultados muestran que la supresión de la proliferación de células T durante la infección aguda con *T. gondii* es el resultado de la muerte de las células T divididas que compiten por la IL-2 con las células T_{regs}. Por lo tanto, en conclusión podemos decir que la inmunosupresión es debida a la muerte de T divididas como consecuencia de la baja disponibilidad de IL-2.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is an intracellular parasite which is distributed throughout the world and it has been estimated that a third of the population is infected. Toxoplasmosis is clinically asymptomatic in healthy individuals but can cause serious complications in immunocompromised patients and pregnant women. During the infection with *T. gondii* promotes a cellular immune response type Th1, characterized by a high IL-12 production that activates NK cells and T lymphocytes CD4⁺ and CD8⁺ to produce IFN- γ . The macrophages activated by IFN- γ , produce TNF- α and intermediaries of oxygen and nitrogen, to promote the destruction of the parasite.

In mice infected with *T. gondii* has been reported that there is decrease in proliferation (immunosuppression) of T cells in response to various mitogens during the acute phase of infection. The study of the mechanisms involved in immunosuppression have shown that the production of reactive intermediates of nitrogen, induction of indoleamine dioxygenase (IDO), high levels of IL-10 and low levels of IL-2.

T_{regs} cells are a population of T CD4⁺ cells to maintain homeostasis of the immune system (involved in the control of autoimmunity, immune response against tumors, tissue transplantation and infectious agents) and are involved in the suppression induced by *T. gondii* infection.

Recently our group described *in vitro* a reduced T cell proliferation to mitogens is observed in murine cells isolated during the acute phase of *T. gondii*. This phenomenon of suppression is mediated by Foxp3⁺T_{regs} and IL-2 dependent. In this work we analyzed the mechanism of this T_{regs}-mediated suppression. We evaluated the expression of surface molecules (CTLA-4, LAG-3, PDL-1, FAS-L, GITR, CD25) in T_{regs} cells that may be involved with the activation of the T_{regs} cells and the immunosuppression of T_{efec} cells. We found that removal of APC from spleen cells of infected mice did not modify suppression, but further elimination of T_{regs} led to a restored proliferation, demonstrating that T_{regs}-mediate suppression in the absence of APC. Production of IL-2 by T cells from infected animals was abolished but partially restored when T_{regs} were removed. However, IL-2 levels and T-cell proliferation were restored when T_{regs} and T cells were separated by transwells, indicating that T_{regs} cells require close proximity with T cells to induce suppression. T_{regs} from infected mice were able to reduce proliferation of CTLL-2 cells in the classical IL-2 bioassay, strongly suggesting that T_{regs} compete with T cells for IL-2. Further, we showed that T_{reg} from infected mice do not inhibit IL-2 transcription. We found that T

cells from infected mice died after a few rounds of division *in vitro*, but addition of rIL-2 or removal of T_{regs} abolished this effect. Our results showed that suppression of T-cell proliferation during acute *T. gondii* infection is the result of death of proliferating T cells by T_{regs}-mediated IL-2 competition. Thus, immunosuppression is due to death of proliferating T cells as a consequence of low IL-2 availability.

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

APC: Antigen presenting cells (Células presentadoras de antígeno o accesorias)

CFSE: 5, 6-Carboxyfluorescein diacetate, succinimidylester

ConA: Concanavalina A

DC: Células Dendríticas

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

dpi: Días post infección

EFGP: Proteína verde fluorescente

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting (clasificación de células por fluorescencia)

FOXP3: Forkhead box P3 (factor de transcripción FOXP3)

FSC: Forward Scatter (tamaño)

GPI: glicosil fosfatidil inositol

i.p. Vía Intraperitoneal

mAbs: Monoclonal antibodies (Anticuerpos monoclonales)

NRI: Intermediarios reactivos de nitrógeno

PBS: Phosphate Buffered Saline (Buffer salino de Fosfatos)

rIL-2: Interleucina 2 recombinante

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

SFB: Suero Fetal Bovino

SN: Sobrenadante

SSC: Side Scatter (granularidad)

TA: Temperatura ambiente

T_{efec}: Células T efectoras

T_{regs}: Células T reguladoras

I. INTRODUCCIÓN

A. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligatorio del Phylum Apicomplexa, capaz de infectar cualquier animal de sangre caliente incluyendo al humano. El descubrimiento de este parásito en el hígado y bazo del roedor africano *Ctenodactylus gondii*, se remonta a la primera década del siglo XX, en 1908, por Nicolle y Manceaux (1,2). Al inicio creyeron que se trataba de *Leishmania*, pero un año más tarde le denominaron *Toxoplasma gondii* por su forma arqueada (del griego toxon: arco) y por el nombre del roedor en que fue hallado. En años posteriores el parásito fue identificado en diferentes animales y la especie era nombrada de acuerdo al animal donde se había encontrado, hasta que se descubrió que todos pertenecían a la misma y única especie: *Toxoplasma gondii* (2,3). Las primeras descripciones de toxoplasmosis humana fueron realizadas por Castellani, en 1913, pero se toma conciencia de su existencia gracias a los estudios de Janku, en 1923, cuando describió la presencia de *T. gondii* en la retina de un niño que había fallecido con un cuadro de coriorretinitis acompañada de microftalmia. Fue hasta la década de los ochenta que adquirió una gran importancia como enfermedad oportunista en los pacientes infectados con VIH (2,3).

B. Ciclo de Vida de *Toxoplasma gondii*

El ciclo de vida de *T. gondii* comprende dos fases de reproducción: 1) Una fase de reproducción sexual que se produce solamente en felinos (huésped definitivo), y 2) una fase de reproducción asexual que puede ocurrir en todos los animales de sangre caliente (huéspedes intermediarios), incluyendo seres humanos, felinos y aves [Fig. 1] (4). Los felinos son los responsables del mantenimiento del ciclo vital del parásito, ya que en ellos ocurre la reproducción sexual y asexual.

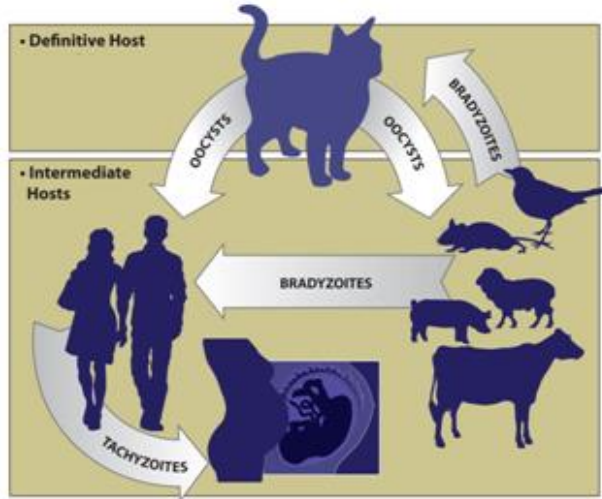


Figura 1. Ciclo de Vida de *T. gondii* (4).

T. gondii presenta tres estadios: el taquizoíto (Fig. 2A), caracterizado por su capacidad de proliferar rápidamente; el quiste tisular que contiene a los bradizoítos (Fig. 2B), y el ooquiste, que contiene a los esporozoítos (Fig. 2C-D) (5). En los huéspedes intermedios, el parasito existe en forma de taquizoíto y bradizoíto, mientras que en el huésped definitivo existen las tres formas mencionadas.

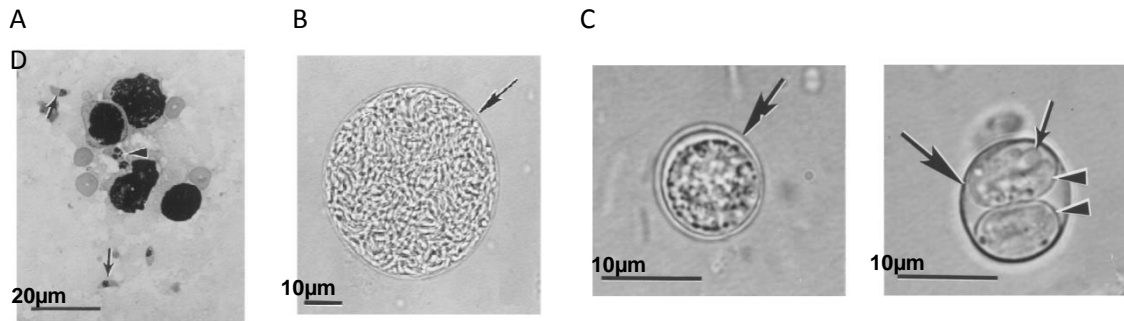


Figura 2. Estadios de *T. gondii*. Fotografías de los estadios de *T. gondii* en microscopía de campo claro. Taquizoítos (A), Quistes que contienen bradizoítos (B) y Ooquistes no esporulados (C) y esporulados (D). Modificado de Hill D.E. 2005 (5).

Taquizoíto

El término "taquizoíto" (del griego; tachos, que significa rápido) fue propuesto por Frenkel (1973) y describe la capacidad del parásito para multiplicarse rápidamente en las células de los huéspedes intermediarios y definitivos. Los taquizoítos son estructuras que tienen forma oval arqueada, miden aproximadamente 2x6 µm e invaden todas las células nucleadas penetrándolas activamente o por fagocitosis (Fig. 3). Una vez dentro de la célula, el parásito queda rodeado por una vesícula parasitófora y se multiplica asexualmente por endodiogenia, un proceso en el que dos células hijas se forman dentro de la célula madre dejándola intacta (Fig. 3). La célula invadida se lisa después de que el parásito se ha dividido varias veces, diseminando más taquizoítos por vía sanguínea que pueden invadir a otras células. El taquizoíto puede dividirse en cualquier tipo celular excepto en eritrocitos (5-7). El taquizoíto es la forma que induce la respuesta inflamatoria y que se transforma en bradizoítos para formar los quistes, una vez concluida la fase aguda de la infección.

Quistes

Los quistes son estructuras que pueden presentar diferentes tamaños (5-100 µm) y por lo tanto pueden contener desde dos hasta miles de bradizoítos. Como se mencionó los quistes se forman una vez concluida la fase aguda de la infección y estos persisten durante la vida del huésped en diferentes tejidos (cerebro, músculo, entre otros). Aunque los bradizoítos son morfológicamente idénticos a los taquizoítos se diferencian en que los bradizoítos se replican lentamente.

Cuando el huésped definitivo se infecta por el consumo de alimentos contaminados con quistes tisulares, se inicia el ciclo de vida de *T. gondii*. Por acción de las enzimas digestivas los quistes liberan bradizoítos a la luz intestinal, promoviendo la infección de enterocitos.

Dentro de los enterocitos los bradizoítos llevan a cabo un proceso de desarrollo y diferenciación celular conocido como gametogonia (proceso de reproducción sexual) que conduce a la formación del ooquiste (Fig. 3). A diferencia de los bradizoítos, los taquizoítos libres son eficazmente eliminados por la inmunidad del hospedador, a pesar de que algunos logran infectar otras células formando bradizoítos, manteniendo así el ciclo de vida de este parásito.

Ooquistes

Los ooquistes son estructuras de forma ovoide que miden de 10-12µm de diámetro, se producen en el intestino delgado de los hospederos definitivos como resultado de la fase de reproducción sexual del parásito. Después que los gatos ingieren los quistes, la acción de las enzimas proteolíticas del estómago y del intestino disuelven la pared del quiste, los bradizoítos penetran células del epitelio intestinal e inician los ciclos de reproducción sexual que culminan con la formación de los ooquistes. Simultáneamente con el desarrollo del ciclo enteroepitelial, los bradizoítos penetran a la lámina propia del intestino del gato y se multiplican como taquizoítos. Durante la infección activa los felinos excretan hasta 10^7 de ooquistes en la materia fecal durante 7 a 21 días, contaminando suelo, hortalizas y fuentes de agua (8,9). Cuando el ooquiste es excretado por los felinos se encuentra en forma no esporulada. En las condiciones adecuadas de humedad y temperatura los ooquistes esporulan y se vuelven infecciosos; esto puede tomar entre 1 y 5 días, produciendo en su interior 8 esporozoítos (5,7,10). Los ooquistes son muy resistentes a diferentes condiciones ambientales; por ejemplo, se ha reportado que en suelos húmedos la infectividad de los quistes puede mantenerse por más de 1 año (10).

En el caso de los seres humanos, una vez ingerido el ooquiste o el quiste tisular se produce la liberación de esporozoítos y bradizoítos respectivamente, los cuales rápidamente se diferencian a taquizoítos, la forma dinámica e invasiva que atraviesa eficientemente el epitelio intestinal, diseminando el parásito en todo el organismo. La presencia del parásito en el organismo activa la respuesta inmune (Th1, ver sección E) del huésped, caracterizada por la activación de células efectoras tales como macrófagos, linfocitos T y células NK, con la consecutiva liberación de citocinas y producción de anticuerpos. El IFN- γ es uno de los componentes que induce la diferenciación de los taquizoítos intracelulares a la forma de bradizoíto con la consecutiva modificación de la célula infectada para que permita la formación de un quiste tisular (4,11).

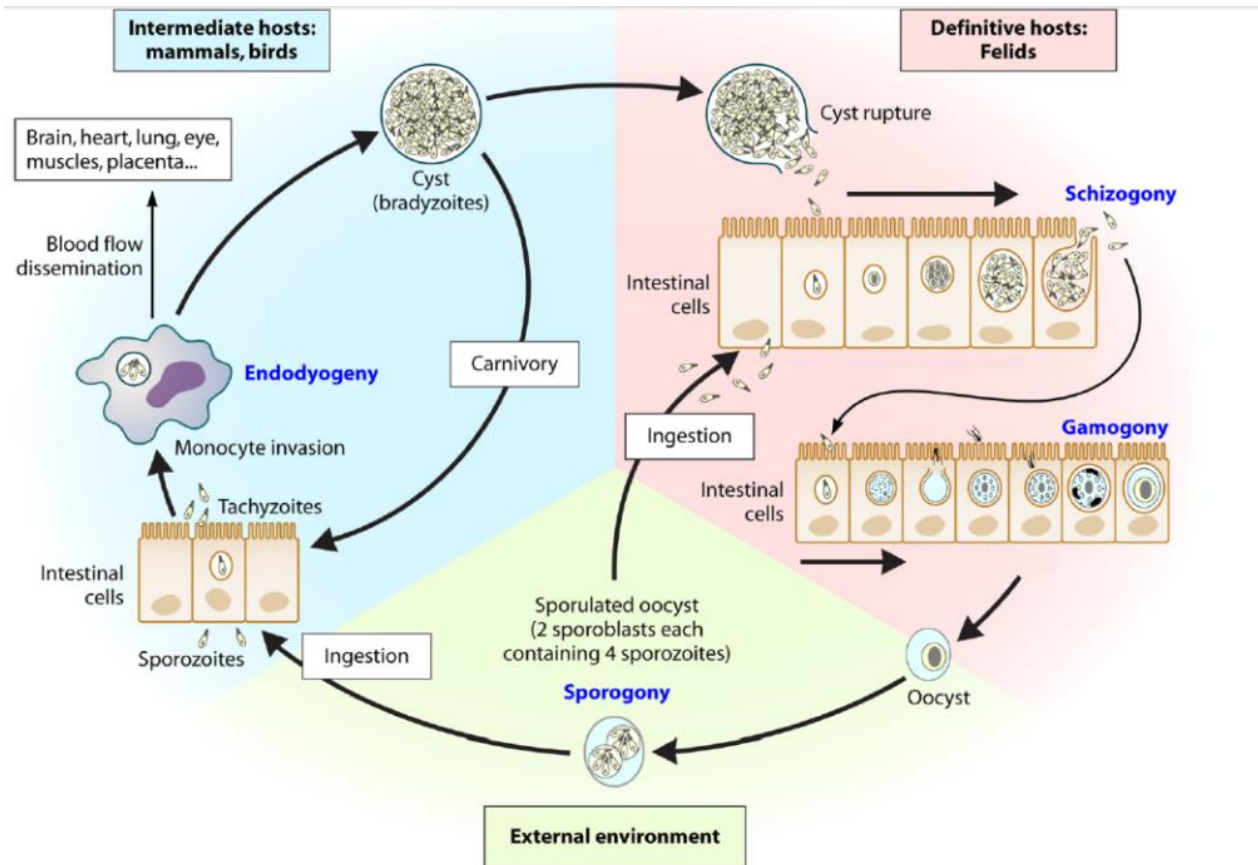


Figura 3. Reproducción de *T. gondii*. La reproducción sexual se lleva a cabo en el intestino del huésped definitivo; inicia con el consumo de presas infectadas con bradizoítos (quistes) y termina con la liberación de ooquistes inmaduros presentes en las heces. Mientras que la reproducción asexual se lleva a cabo en huéspedes intermedios, inicia al ingerir quistes tisulares u ooquistes los cuales contienen bradizoítos o esporozoítos respectivamente, y al ser liberados por las enzimas gástricas, se diferencian a taquizoítos los cuales van a diseminarse a través de la circulación sanguínea alcanzando diferentes órganos como placenta, cerebro, ojo, etc; donde desarrollan diferentes patologías (1).

C. Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una infección asintomática en la mayoría de los individuos inmunocompetentes (90%), sin embargo en los individuos que desarrollan manifestaciones clínicas (10%) es difícil dar un diagnóstico asertivo, debido a que los síntomas son muy inespecíficos, por ejemplo: fiebre, linfadenopatía, dolor muscular, letargia y malestar general. Los individuos inmunocompetentes son capaces de responder a la infección y controlarla (12,13).

Los seres humanos se pueden infectar principalmente por: i) ingesta de carne cruda o mal cocida que contiene quistes; ii) ingesta de agua o alimentos contaminados con oocistos; o iii) vía congénita a través de la transmisión transplacentaria (1,12,14,15). El periodo de incubación varía entre 10-23 días después de la ingesta de carne cruda o mal cocida y entre 5-30 días después de la ingesta de oocistos (16).

En la toxoplasmosis se han descrito tres etapas o fases: i) Aguda. Durante esta etapa el parásito penetra en la mucosa intestinal, alcanza la corriente sanguínea y se disemina por todo el cuerpo infectando diferentes células del organismo. La presencia de *T. gondii* en el organismo induce que el sistema inmune del huésped reaccione y monte una respuesta en contra del parásito (Th1). ii) Crónica. Cuando la fase aguda es controlada, los parásitos forman quistes intracelulares que contienen formas inactivas de metabolismo lento (bradizoítos). Estos quistes tisulares pueden permanecer latentes en los tejidos durante toda la vida sin producir efectos patológicos. iii) Recurrente. En algunos casos en que el sistema inmune del paciente se suprime, las paredes del quiste se rompen, liberando parásitos activos y proliferantes (taquizoítos), lo que origina la recurrencia de la enfermedad. En casos de inmunosupresión como en los individuos infectados con VIH, el parásito puede reactivarse del quiste tisular, diferenciarse de nuevo a taquizoíto e iniciar su diseminación tisular alcanzando incluso el encéfalo y provocar la muerte del individuo (1,12).

Dadas las características de la infección con *T. gondii*, los principales grupos de riesgo son los sujetos inmunocomprometidos y mujeres embarazadas. Diferentes estudios señalan que entre un 30-50% de estos pacientes seropositivos para *T. gondii*, que tienen infección por VIH desarrollarán un cuadro de toxoplasmosis cerebral, cuando sus cifras de células CD4⁺ estén por debajo de 100/mm³. En la mayoría de los casos de pacientes inmunocomprometidos incluyendo aquellos con VIH, la encefalitis toxoplásmica es una de las principales causas de mortalidad (17-21).

La toxoplasmosis congénita tiene lugar cuando la fase aguda de la infección sucede en mujeres gestantes (22). Cuando las mujeres se infectan por primera vez durante el embarazo (primoinfección) existe riesgo de infectar al feto, por lo que la probabilidad de transmisión y de daño al feto depende del trimestre del embarazo en que esto ocurra. Si la infección de las mujeres se produce durante el primer trimestre la tasa de transmisión es del 15-25% pero las lesiones fetales suelen ser más graves (aborto); en el segundo trimestre el riesgo de transmisión de la infección aumenta de un 30-54% con la posibilidad de dejar secuelas tales como hidrocefalia, microcefalia, calcificaciones intracraneales, epilepsia, anemia, ictericia, erupción, petequias debido a la trombocitopenia y/o retraso psicomotor; si la infección materna es durante el tercer trimestre de embarazo, la tasa de transmisión es del 30-60%, siendo en el 15% de los casos una afección leve (parto prematuro) o sintomática (retinocoroiditis o coriorretinitis). En algunos casos los neonatos son normales al

nacimiento pero en la infancia pueden presentar epilepsia, retardo psicomotor, dificultades para el aprendizaje y lesiones oculares (13,18,19,23,24).

D. Epidemiología

La toxoplasmosis es una infección que afecta al 30% de la población mundial (Fig. 4); no obstante, hay variaciones en la prevalencia entre las diversas regiones geográficas del mundo (1,5,23). Por ejemplo, Bélgica reporta una seropositividad de 16.9% en personas mayores de 30 años; Holanda informa una tasa del 64% entre la población de 20 a 22 años y en Estados Unidos varía entre el 10-30% pero en algunas regiones alcanza hasta un 67% en individuos mayores de 50 años. En América Central, Francia, Turquía y Brasil la seroprevalencia es mucho mayor en algunas regiones (aproximadamente de hasta el 90%). En países como El Salvador y Haití, se reporta en general una seroprevalencia superior al 90% entre los adultos. En la región costera de México la seroprevalencia alcanza hasta un 60%. Sin embargo, los niveles de positividad disminuyen considerablemente en países como Italia (40.7%), Dinamarca (27.4%), Finlandia (20.3%), Noruega (10.9%) y Reino Unido (7.7%). En general en Europa, la prevalencia varía del 9% al 67%. (1,23). En contraste, en Asia se han reportado prevalencias muy variables, por ejemplo en Corea es del 0.8% y en Vietnam del 11.2%, mientras que en la India, Malasia y Nepal se presentan prevalencias que van desde un 41.8% hasta un 55.4% (1).

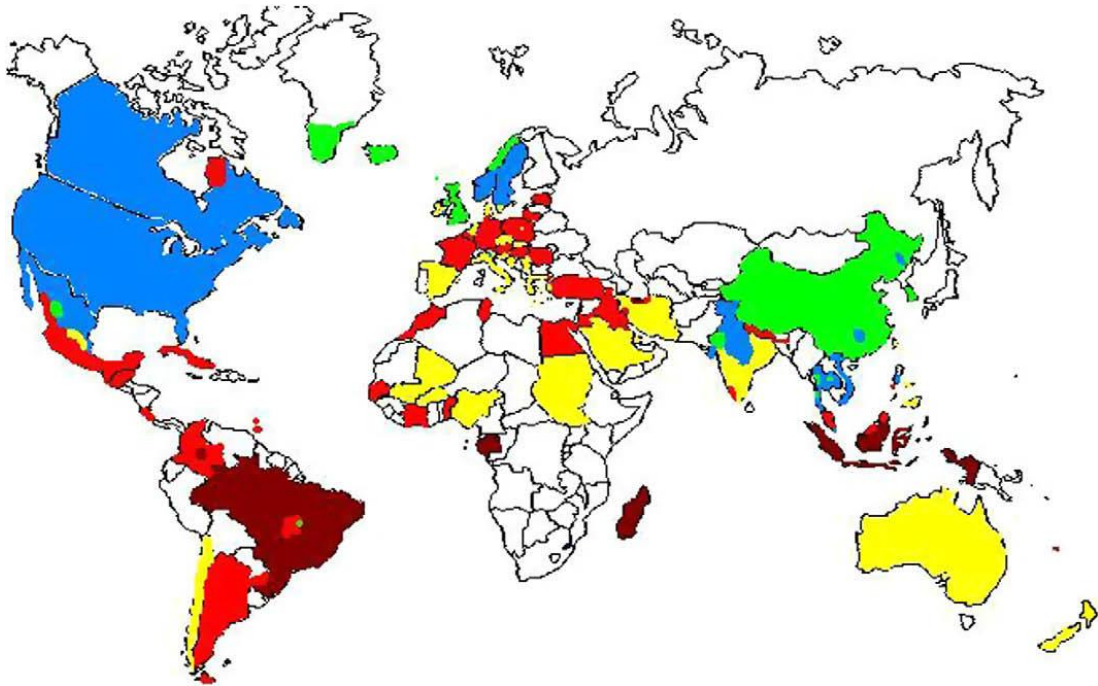


Figura 4. Análisis de la seroprevalencia a nivel mundial para *T. gondii*. Rojo oscuro = prevalencia por encima del 60%; Rojo = prevalencia entre 40-60%; Amarillo= prevalencia entre 20-40%; azul prevalencia entre 10-20%; verde: prevalencia <10%. Blanco= no hay datos (23).

La encuesta Nacional Seroepidemiológica realizada en México en 1992, demostró una prevalencia en el país de un 32%, que varía desde el 13% en la zona norte del país, y con un máximo de hasta el 64% en ciudades costeras (25) [Fig 5]. En un estudio adicional se reportó para Tabasco una prevalencia del 60% en mujeres embarazadas, en el centro de México 34.9%, en Mérida 47% y en Durango 6.1%, llegando a un estimado de que cada año, 2 de cada 1000 recién nacidos presentan toxoplasmosis congénita (25-27).

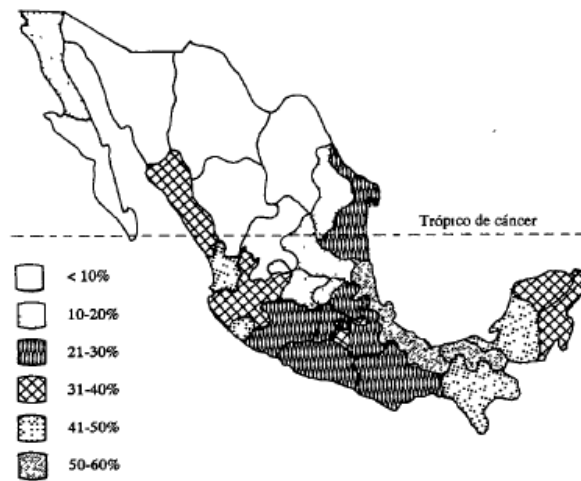


Figura 5. Seroprevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* en México (28).

Las variaciones en la seroprevalencia se han atribuido a diversos factores que van desde factores climáticos que afectan a la supervivencia de los ooquistes en el medio ambiente, hasta los factores antropogénicos, sin embargo no existe un factor exclusivo que se asocie a la prevalencia de la infección en una región determinada. Dado que algunos autores han observado las prevalencias más altas en países tropicales con un clima húmedo y cálido, y las prevalencias más bajas en los países áridos o para países más fríos, han atribuido al clima, como un factor que puede afectar la prevalencia en una región (1,5,9). Otros autores, también han observado que hay diferencias en las tasas de seroprevalencia con relación a la altitud, correspondiendo las más altas a las áreas de mayor elevación sobre el nivel del mar (5). Los factores antropogénicos explican una gran parte de las variaciones en la seroprevalencia en humanos, entre los que se incluyen hábitos alimentarios (método de cocción de la carne, el lavado de manos, tipos de carne o verduras, y la limpieza de verduras, etc), nivel económico, nivel social, hábitos culturales y la calidad del agua. Se ha observado que la tasa de adquisición de la infección en relación con la edad también varía en función del país y nivel socioeconómico (1,9). El 84% de sujetos de un nivel socioeconómico bajo adquieren la infección antes de los 15 años, mientras que los sujetos de un nivel socioeconómico más alto adquieren la infección después de los 20 años (alrededor de 20 % para el grupo de edad de 20 a 29 años y del 70 % para el grupo de edad de 40 a 49 años) (1).

E. Respuesta inmune inducida por *T. gondii*

a) Infección aguda

Después de la ingestión e invasión de los parásitos al epitelio intestinal, el curso de la infección se puede dividir en una fase aguda (típicamente dura hasta 14 días después de la infección) seguida de una etapa crónica o de latencia (29). Una de las características clave de la infección por *T. gondii* es la inducción de una respuesta Th1 muy fuerte (Fig. 6) (29). Esta robusta respuesta inflamatoria está orquestada por las células del epitelio intestinal y el propio parásito. Al principio de la infección, en el intestino existe una liberación local de quimiocinas que conducen a la atracción y activación de células tales como granulocitos, macrófagos y células dendríticas (DC). Los neutrófilos atraídos tempranamente fagocitan parásitos libres, contribuyendo a la reducción de la carga de parasitaria. Sin embargo, otras células fagocíticas, tales como las DC y los macrófagos, también juegan un papel fundamental en la iniciación de la respuesta inmune (30-33). La interacción de la profilina de *T. gondii* con el TLR11 de las DC es importante para la producción de la primera citocina que aparece en respuesta a la infección, la IL-12 (34). Por otro lado, la ciclofilina-18, una molécula secretada por el parásito que se une a CCR5 incrementa la producción de IL-12 por las DC (35,36). Adicionalmente, los macrófagos son estimulados para producir altos niveles IL-12 y TNF- α , en respuesta a la detección de glicosilfosfatidilinositol (GPI) por TLR2 y TLR4 (Fig. 6a) (29). Los altos niveles de IL-12 sintetizados por las DC, conduce a la activación de células NK, $\gamma\delta$ T y de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y consecuentemente a la producción de altos niveles de IFN- γ , así como de otras citocinas (IL-2, TNF- α , IL-6 e IL-1) polarizando la respuesta Th1 (Fig. 6b) (29-33). La actividad citotóxica y la proliferación de las células NK es favorecida por la IL-18 y la IL-15, que son producidas por los macrófagos y las DC. Además favorece la expresión del receptor NKG2D, el cual se une a su ligando en la membrana de las DC favoreciendo la producción de más IL-12.

La producción de IFN- γ durante la fase aguda de la respuesta inmune innata y adaptativa es indispensable para el control de la infección ya que activa a los macrófagos para que puedan llevar a cabo sus funciones efectoras (32,37,38). La activación de los macrófagos hace que estas mismas células produzcan TNF- α , el cual funciona como cofactor ayudando a que los macrófagos lleven a cabo las funciones efectoras que dan como resultado la inhibición de la replicación y la eliminación del parásito. La activación de los macrófagos se

da cuando el IFN- γ , se une a su receptor (R-IFN- γ) y la cascada de señalización activa STAT1, un factor de transcripción nuclear que controla la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno (NRI), de especies reactivas de oxígeno (ROS), la degradación de triptófano, la acumulación de GTPasas p47 (IRGs) y proteínas de unión a gunilato (GBPs) en las vacuolas parasitóforas (39). La función de IRGs y GBPs depende de la proteína de la autofagia ATG5, para inducir la autofagia y la expresión de la enzima Indolamina dioxigenasa (Fig. 6c) (29). Adicionalmente, se ha reportado que los macrófagos también pueden controlar al parásito por autofagia de manera independiente de IFN- γ y TNF- α (40).

Los linfocitos T tienen un papel crucial en la respuesta inmune contra *T. gondii*, tanto en el control de la fase aguda como en el control de la reactivación durante la fase crónica. La cooperación entre linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ es sinérgica y se requiere la producción de IFN- γ por parte de ambas poblaciones (41,42), aunque la mayor proporción de esta citocina es producida por los linfocitos CD8⁺ (37). Se ha demostrado que después de la infección, los linfocitos CD4⁺ se activan y producen IL-2, la cual ayuda a los linfocitos CD8⁺ a optimizar y mantener su producción de IFN- γ . Además de producir altos niveles de IFN- γ , los linfocitos CD8⁺ participan en la eliminación del parásito ejerciendo su actividad citotóxica sobre células infectadas, mediante mecanismos clásicos de citotoxicidad. Adicionalmente, se sabe que el IFN- γ aumenta la expresión de moléculas de clase II para favorecer la activación y proliferación de células CD4⁺ (43). Aunque la inmunidad protectora contra *T. gondii* es mediada por células y no por anticuerpos, se ha descrito una expansión de células B que producen altos niveles de IgM e IgG, lo que distingue la infección aguda de la crónica, respectivamente. Se han atribuido varias funciones a estos anticuerpos, incluyendo la opsonización de parásitos extracelulares y su subsecuente fagocitosis y muerte. Los ratones deficientes de células B sobreviven a la fase aguda de la infección, pero mueren por el desarrollo de encefalitis toxoplásmica, en las semanas 3 a 4 post-infección, demostrando el papel protector de los anticuerpos (15,35,43,44).

b) Regulación de la respuesta inmune en la infección con *T. gondii*

Aunque la respuesta Th1 es la responsable de controlar la infección, se sabe que la fuerte inflamación causada principalmente en intestino, bazo e hígado por la infección, conduce a serios daños en el huésped. Por lo que el organismo produce citocinas para prevenir la sobreproducción de citocinas Th1 tales como: IL-

10, IL-27 y TGF- β . Adicionalmente existen otros mecanismos de regulación y evasión mediados por *T. gondii* que también puede favorecer la producción de citocinas anti-inflamatorias y de lipoxina A (LXA₄) (29,43).

Se ha descrito que la IL-10 inhibe las funciones efectoras de macrófagos activados por IFN- γ (45), de las células NK (43) y que es una citocina importante en la regulación de una infección primaria con *T. gondii* (46,47). En animales deficientes de IL-10 (IL-10^{-/-}) se ha observado que la mortalidad aumenta durante la fase aguda de la infección. En estos animales se observa un cuadro de necrosis en el hígado y el intestino delgado, debido a que son incapaces de controlar la producción exacerbada de IL-12, IFN- γ y TNF- α (47,48). Se ha reportado que los linfocitos T CD4⁺ Th1 juegan un papel dual durante la infección, ya que producen tanto IFN- γ como IL-10 (47,49,50). Recientemente, se reportó que también las células NK producen IL-10 durante la fase aguda de la infección, particularmente en hígado y pulmón, lo cual limita la producción de IL-12 por células dendríticas (51,52). Por otro lado, se ha descrito que en la fase crónica, la neutralización de IL-10 favorece la infiltración de leucocitos al sistema nervioso central (53).

El mecanismo dependiente de TGF- β es un mecanismo autócrino, en el que los macrófagos, después de la infección, producen TGF- β provocando la reducción en la producción de TNF- α y de su receptor (54,55). El efecto autócrino del TGF- β , también conduce a la inducción de apoptosis en monocitos (54) y la inhibición de producción de óxido nítrico por los macrófagos. Recientemente se demostró que los linfocitos intraepiteliales CD8⁺ productores de TGF- β son importantes para la inmunorregulación de la infección con *T. gondii* en intestino (32,42).

Adicionalmente, la IL-27 también participa en el control de la respuesta inflamatoria observada durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* (56-58). Los ratones deficientes en el receptor de dicha citocina desarrollan una hiperactividad de linfocitos T, caracterizada por la alta producción de IFN- γ y los animales mueren a causa de una inflamación descontrolada. Se ha sugerido que la IL-27 es producida por las DC y limita el desarrollo de una respuesta Th1 a través de la inhibición de la producción de IL-2 (43,59). Adicionalmente, se ha observado que los bajos niveles de IL-2 durante la fuerte respuesta Th1 inducida por *T. gondii* limitan la actividad regulatoria de las células T_{regs}, conduciendo al desarrollo de necrosis en el intestino (60).

El eicosanoide lipoxina A₄ se reportó como modulador de la respuesta inmune contra *T. gondii* tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección. Si bien no se ha determinado cuál es la (s) célula(s)

productora de esta molécula durante la infección, se ha reportado que la LXA₄ regula la producción de IL-12 por células dendríticas, ya que disminuye la expresión de CCR5 y además se ha descrito que su inmunomodulación es independiente de la IL-10 (15,43).

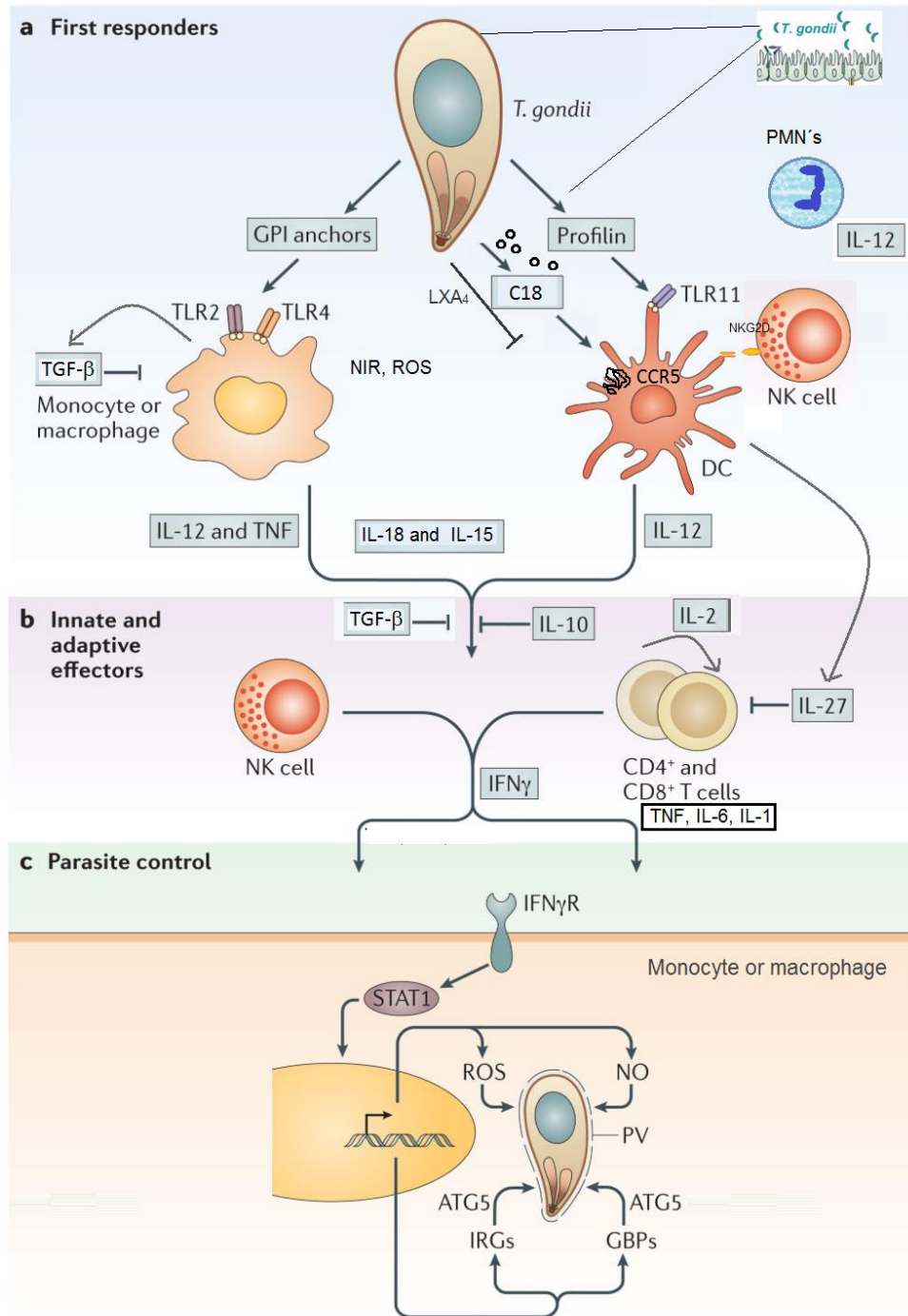


Figura 6. Respuesta Inmune contra *T. gondii*. Modificada de Hunter CA 2012 (29).

F. Inmunosupresión durante la fase aguda de la infección con *T. gondii*

En células de bazo de ratones que cursan la fase aguda de la infección con *T. gondii*, se ha observado disminución en la proliferación (inmunosupresión) de células T en respuesta a diversos mitógenos como fitohemaglutinina (PHA) y concavalina A (Con A) y a antígenos de *T. gondii* (38,61-69). Esta supresión de la proliferación de células T inducida durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* no sólo ha sido reportada en el ratón, sino también en el humano (68,70-73). Dicha inmunosupresión se ha detectado en células T de bazo pero no en células T de nódulos mesentéricos (74). Los primeros análisis que se realizaron para evaluar las células y moléculas involucradas en la inmunosupresión mostraron que los macrófagos eran responsables parcialmente de dicha inmunosupresión ya que la eliminación de células adherentes de bazo restauraba parcialmente la proliferación (38,68).

Otros reportes han descrito que la supresión de la proliferación de células T se mantiene en cultivos de células enriquecidas con fibras de nylon (68) o con perlas magnéticas (65). Cabe señalar, que aunque la supresión de la proliferación de células T en los cultivos enriquecidos se mantenía, ésta fue menos fuerte que en los cultivos enriquecidos, por lo que los autores sugirieron que la presencia de células T "supresoras" podrían participar en la supresión, junto con los macrófagos (65,68).

Se describió que el mecanismo supresor de los macrófagos era dependiente de IFN- γ y mediado por la alta producción de intermediarios reactivos del nitrógeno (NRI), ya que anticuerpos bloqueadores de IFN- γ o la adición *in vitro* de acetato de NG-monometil-L-arginina (un inhibidor específico de la enzima óxido nítrico sintetasa) restauraban parcialmente la proliferación celular (38,63,75). También se describió que la IL-10 mediaba la inmunosupresión, ya que durante este periodo se producen altas cantidades de esta citocina y el uso de anticuerpos neutralizantes de IL-10 restaura parcialmente la proliferación (61,64,76). Sin embargo, en experimentos en donde se utilizaron ratones IL10^{-/-} (ratones *knockout* para el IL-10) e IRF^{-/-} (ratones *knockout* para el interferon regulatory factor) demostraron que tanto IL-10 como la vía dependiente de IFN- γ eran dispensables para la inmunosupresión, ya que la proliferación de los esplenocitos obtenidos de ambos ratones *knockout*, también se encontró suprimida durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* (46,76).

En ratones se ha observado que la inmunosupresión coincide con una reducción en la viabilidad celular (65,69,77) y en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (69,78), así como con el incremento en la producción de IFN- γ (61) e IL-10 (64) y la reducción en los niveles de IL-2 (60,61,63,68,69,79,80). Algunos autores han

atribuido la disminución de los niveles de IL-2 a la reducción de células CD4⁺ productoras de IL-2 (60,63,79). Se sabe que la IL-2 es una citocina que favorece la actividad, proliferación y mantenimiento de células T CD4⁺ y CD8⁺.

Diversos estudios han descrito la vital importancia de la actividad de las células T citotóxicas y la IL-2 para el control de la infección con *T. gondii*, ya que la neutralización de IL-2 conduce a una ineficiente actividad citotóxica de las células T CD8⁺ (81). Aunque no es claro cuál es el o cuales son los mecanismos por los que se observa una disminución de células productoras de IL-2, se sabe que durante la infección con *T. gondii* se produce IL-27, es una citocina que puede inhibir directamente la producción de IL-2 en células T CD4⁺ (56), lo que favorece la supresión de la proliferación. Por otro lado, se ha descrito que *T. gondii* puede inhibir la expresión de moléculas de clase II (del complejo principal de histocompatibilidad [MHC II]), influyendo directamente en la activación y proliferación de células T CD4⁺, así como en la capacidad de estas células para producir IL-2 (82,83). Además, se ha evidenciado la importancia de la IL-2 en la proliferación de células T, ya que su ausencia durante la infección genera inmunosupresión y la reconstitución de esta citocina restaura la proliferación (63,68,69).

Recientemente nuestro grupo describió que la inmunosupresión descrita previamente también es regulada por las células T_{regs} activadas, ya que utilizando ratones transgénicos Foxp3EGFP la eliminación selectiva de las células T_{regs} conduce a una recuperación total de la proliferación de linfocitos T en cultivos de células de bazo. Además, también se describió, que la inmunosupresión depende de un mecanismo dependiente de IL-2, pero no de IL-10 (69).

G. Células T reguladoras

El sistema inmune tiene la capacidad de proteger al hospedero no sólo de microorganismos patógenos, sino también de enfermedades autoinmunes; con el objeto de que su funcionamiento sea eficiente se requiere de un estricto control y autorregulación.

Las células T reguladoras (T_{regs}) son una subpoblación de células T CD4⁺, que comprenden del 5 al 10% del total de células T CD4⁺ en sangre periférica. Se ha demostrado que esta población celular es capaz de mantener la tolerancia y homeostasis del sistema inmune, ya que tanto en humanos como en modelos murinos se ha demostrado que su ausencia induce el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas y

autoinmunes (84,85). En general, gracias a diversos estudios, se ha descrito que las células T_{regs} no sólo están involucradas en enfermedades autoinmunes, sino que también participan en la modulación de la respuesta inmune contra tumores, trasplantes de tejidos y agentes infecciosos (84,86,87) .

i) Antecedentes de las células T_{regs}

Después del descubrimiento en 1960 de las funciones de los linfocitos T cooperadores (Th), Gershon y Kondo propusieron la existencia de una población de células con capacidad de suprimir la respuesta inmune (88,89). Sin embargo, como en ese momento no se pudo identificar ningún marcador celular o alguna molécula soluble específica de dicha población, esta idea fue abandonada. En la década de los 70 algunos grupos demostraron la existencia de células supresoras (T supresoras) que eran capaces de mediar efectos biológicos al producir sustancias solubles. Estas células fueron caracterizadas por expresar el marcador de superficie Lyt-2⁺ (CD8⁺) (90,91).

Los estudios realizados para describir y caracterizar a la células T supresoras eran inconsistentes e irreproducibles entre distintos laboratorios, lo cual con el tiempo se le atribuyó a las limitantes de las técnicas utilizadas en aquellos años. Hasta la década de los 80, se retomó el interés en este campo de células supresoras con la descripción de las células Th1 y Th2. Se propuso que la supresión era el resultado de la actividad de las citocinas inmunoregulatoras producidas por estas subpoblaciones celulares (92). Sin embargo hacia finales de los 80's se abandonó la idea de la existencia de las células T supresoras.

La importancia de las células T con capacidad regulatoria se demostró en 1985 con los primeros experimentos de Sakaguchi (93), en los cuales la transferencia adoptiva a ratones desnudos de esplenocitos depletados de ciertas poblaciones llevaba al desarrollo de patologías autoinmunes. Al fenotipificar las células involucradas en el desarrollo de la autoinmunidad demostraron que las células T con capacidad regulatoria eran linfocitos CD4⁺ que expresaban altos niveles de CD5 (Ly-1⁺) y bajos niveles de CD45 (93,94). Utilizando el mismo modelo se descubrió en 1995 que la expresión constitutiva de CD25 en linfocitos CD4⁺ distingue a la población de células llamadas T_{regs}, que contiene células autorreactivas (95).

La fenotipificación de células T_{regs} como CD4⁺CD25⁺ permitió realizar estudios más finos sobre el origen y funciones de esta población celular. Sin embargo, el uso de CD25 para identificar células T_{regs} tiene la desventaja de que esta molécula también se expresa en células activadas y por lo tanto no es un marcador

específico de células T_{regs}; un problema semejante ocurre con otras moléculas que se han utilizado para caracterizar a esta población, como CTLA-4 (96) y GITR (97). En el año 2003 se describió que el factor de transcripción Foxp3 (factor forkhead box P3) se expresa constitutivamente en T_{regs} y que es una molécula necesaria para el desarrollo y la función de estas células (98,99), convirtiéndose en el marcador más confiable para la identificación de T_{regs}. Por lo tanto, estas células podían ser ahora claramente distinguidas por el fenotipo CD4⁺Foxp3⁺.

Ratones deficientes de Foxp3, llamados *scurfy*, no desarrollan células T_{regs} naturales y desarrollan el síndrome de linfoproliferación autoinmune, lo que ocasiona la muerte entre la 4ta y 5ta semana posterior al nacimiento (99). Este proceso es muy similar al síndrome IPEX (Inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía, ligada al cromosoma X en humanos, ya que esta autoinmunidad es causada por mutaciones en el gen FoxP3 (100).

ii) Subpoblaciones de células T_{regs}

Las células T_{regs} se clasifican principalmente en dos subpoblaciones: las células T_{regs} naturales (nT_{regs}) y las células T_{regs} inducidas (iT_{regs}). Las células nT_{regs} se originan en el timo (Fig. 7) y se caracterizan por expresar constitutivamente las moléculas CD25, CTLA-4 y FoxP3 (CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺Foxp3⁺) (85). El factor de transcripción Foxp3 confiere a las T_{regs} su capacidad supresora, adicionalmente este factor induce su estado anérgico e inhibe su capacidad de producir IL-2, debido a que Foxp3 inhibe la actividad de NF-AT y NF-κB (101). A nivel periférico o *in vitro*, células T *naïve* CD4⁺ o CD8⁺ en presencia de ciertas citocinas y/o estímulos, pueden diferenciarse a células T_{regs} (Tr1, Th3 o T_{regs} CD8⁺), denominadas en general como iT_{regs} (Fig. 8, Tabla 1) (84,102). Aun cuando las dos subpoblaciones de T_{regs} son capaces de suprimir la respuesta inmune, se han podido identificar diferencias entre las células nT_{regs} y las células iT_{regs}. Las diferencias entre estas dos poblaciones radican en la expresión de ciertos marcadores de superficie, la forma de ejercer supresión, el origen, la expresión de Foxp3, así como por las células blanco a las que suprimen (Tabla 1).

Las células Tr1 se inducen *in vitro* en presencia de IL-10, y anticuerpos como anti-CD3 y anti-CD46 poseen una función supresora que no depende de la expresión de Foxp3 y se caracterizan por ejercer su acción supresora predominantemente por IL-10 en tejidos inflamados (84,103).

Las células Th3 son células productoras de TGF- β y tanto en las placas de Peyer, como en los ganglios mesentéricos, se les considera como las causantes de los mecanismos de tolerancia oral (84,104). Aunque se sabe que Foxp3 regula muchas funciones supresoras de las células T_{regs} de ratones, cabe señalar que las células T humanas activadas pueden expresar Foxp3 de manera transitoria, por lo que esta molécula no es exclusiva de T_{regs} en el humano (100,105).

Diversos estudios han descrito que las nT_{regs} expresan Foxp3 de manera más estable que en las iT_{regs}; esta diferencia se relaciona con modificaciones epigenéticas, ya que en las nT_{regs} los dinucleótidos CpG en el locus de Foxp3 (en el promotor, en CNS2 y en TSDR) se encuentran desmetilados mientras que en iT_{regs} generadas *in vitro* dichos motivos permanecen metilados (106-109). A pesar de las diferencias descritas entre estas dos poblaciones es importante señalar que ha sido complicado determinar la importancia de las nT_{regs} e iT_{regs} durante procesos inmunológicos debido a la falta de marcadores específicos que distingan a estas poblaciones. La plasticidad de las células T_{regs} ha sido evidenciada recientemente, ya que se ha demostrado que las células T_{regs} tienen la capacidad de convertirse en células Th1, Th17 o THF, lo cual depende del microambiente en el que se encuentren (110-112).

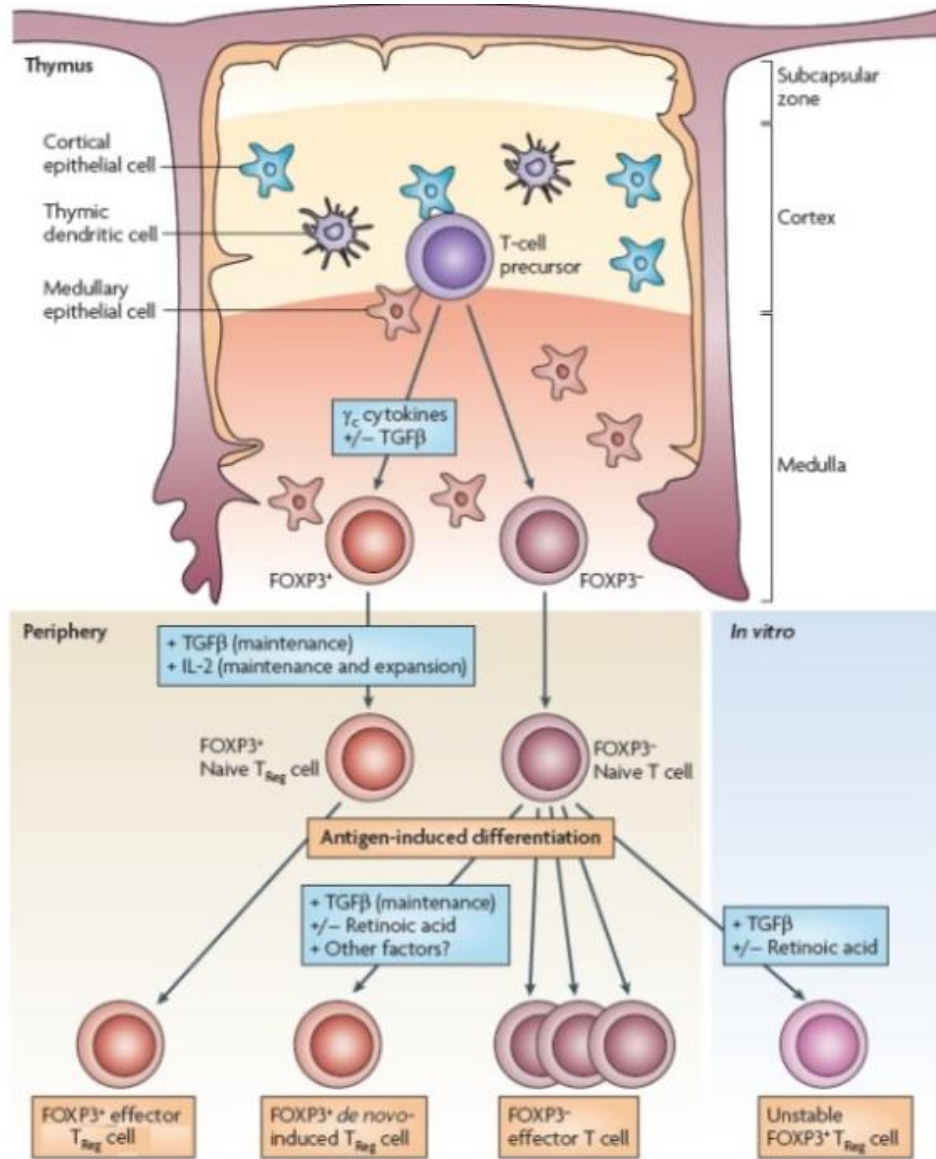


Figura 7. Origen de las células T_{regs}. Las células nT_{regs} se originan en el timo, en este órgano adquieren la expresión de Foxp3, esta población celular requiere de TGF- β y de IL-2 para su mantenimiento y expansión en la periferia. Las iT_{regs} pueden generarse en bazo, nódulos linfáticos, tejido inflamado, en el tejido linfoide asociado al intestino o *in vitro*, a partir de células T CD4⁺Foxp3⁻ o T convencionales (Tconv) en condiciones de exposición crónica a ciertos antígenos y en presencia de TGF- β y ácido retinoico adquieren la expresión de Foxp3 (106).

Tabla 1. Características de la subpoblaciones de células T_{regs}.

Property	Natural Treg (nTreg)	Induced Treg (iTreg) - Tr1	Induced Treg (iTreg) - Th3
Development	Thymus	Periphery	Periphery
Phenotype	CD4+CD25+CD127 ^{low}	CD4+CD25 ⁻	CD4+CD25 ⁺ from CD25 ⁻ precursors
Other Associated Markers	CTLA-4+GITR+Foxp3+	CD45R ^{low} Foxp3 ⁻	CD25 ^{low} -variableCD45R ^{low} Foxp3 ⁺
Suppression	Contact-, Granzyme-B dependent, makes TGF beta, Cytokines	IL-10 mediated	TGF beta mediated
Target Cells	APC and Effector T Cells; innate cells	Effector T Cells	Effector T Cells
CD28 Involvement	Thymic development and maintenance in periphery	Unnecessary for development or function	Unnecessary for development or function
<i>in vivo</i> Role	Suppression of autoimmunity; inhibition of allograft rejection and of immune responses induced by microbial infection; mediation of UV-induced immunosuppression	Mucosal immunity, inflammatory response	Mucosal immunity, inflammatory response
<i>in vitro</i> Expansion	TCR/CD28 stimulation and IL-2	CD3, IL-10, Retinoic Acid	CD3, TGF beta

Adaptada de: Roncarolo MG (103), Collison LW (113), Sakaguchi S (111,114), Beissert S (84).

Por otro lado, se ha reportado la existencia de células T_{regs} “híbridas”, es decir células T_{regs} que coexpresan Foxp3 con factores de transcripción y citocinas características de otros linajes, como ROR γ t/IL-17, T-bet/IFN- γ y GATA3⁺/IL-4 (Fig. 8). Estas células mantienen sus propiedades supresoras *in vitro*, pero se desconoce su función *in vivo* (101,112). Sin embargo, se ha sugerido que estas poblaciones son subtipos de T_{regs} especializadas que suprimen la actividad de células de una determinada respuesta polarizada (Fig. 8). Se sugiere que para generar estas poblaciones híbridas se requiere un microambiente específico, la combinación de señales vía TCR junto con ciertas señales de coestimulación, así como la remodelación de cromatina (112).

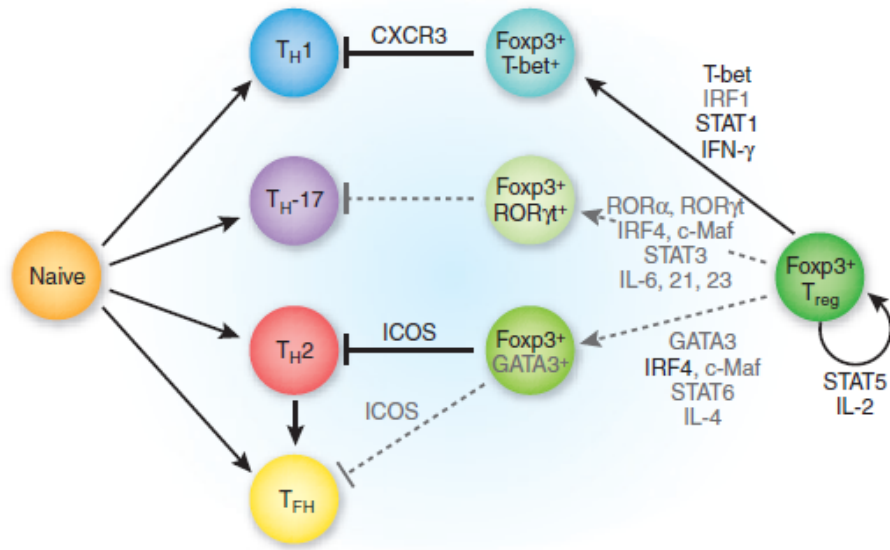


Figura 8. Células T_{regs} "híbridas" (110).

H. Mecanismos de supresión de las células T_{regs}

Las células nT_{regs} emplean múltiples mecanismos de acción por medio de los cuales suprimen la respuesta de varios tipos celulares, ya sea inhibiendo su activación y/o su expansión. Estos mecanismos pueden agruparse en (Fig. 9):

i) Supresión mediada por citocinas

Los mecanismos dependientes de citocinas inhibitorias incluyen a la IL-10, el TGF-β y la IL-35 producidas por las T_{regs}. La IL-10 tiene la capacidad de inhibir la activación de células presentadoras de antígeno (APC) y de limitar la activación de células T. Esta citocina también actúa directamente en linfocitos T inhibiendo tanto su proliferación como la producción de otras citocinas como IL-2, IFN-γ, IL-4 e IL-5. Además, la IL-10 promueve la generación de células Tr1 que son células Fxp3⁻ con la capacidad de generar grandes cantidades de IL-10 (84,92,115).

Por otro lado, el TGF-β unido a la membrana de las T_{regs}, se puede unir a su receptor e inhibir tanto la proliferación celular como las respuestas tipo Th1 y Th2 (102,116). En modelos *in vitro*, se ha observado que la neutralización de IL-10 y TGF-β no inhibe la capacidad supresora de células T_{regs}. Sin embargo, en un

modelo de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) se ha descrito que en ratones deficientes de IL-10, las células T_{regs} son incapaces de suprimir (117). En contraste, en un modelo de gastritis autoinmune se ha descrito que las células T_{regs} deficientes de IL-10 son capaces de suprimir (118).

Recientemente, se describió que las células T_{regs} secretan grandes cantidades de IL-35 (113,119) y que en ratones incapaces de producir esta citocina, las células T_{regs} tienen menor actividad supresora *in vitro* y son incapaces de controlar la inflamación en un sistema de enfermedad inflamatoria intestinal *in vivo* (115).

ii) Supresión mediada por trastornos metabólicos

Los mecanismos dependientes de disrupción metabólica incluyen la hidrólisis de ATP extracelular y la privación de IL-2.

a) Hidrolisis de ATP

La adenosina es un nucleósido que tiene un importante papel en eventos fisiológicos y fisiopatológicos (35). Este nucleósido se puede formar a partir de AMP ya sea intracelularmente por la citosólica 5'-nucleotidasa o extracelularmente por dos ectonucleotidasas (CD39 y CD73). La hidrólisis de ATP extracelular por las células T_{regs} se debe a que estas células expresan CD39 y CD73 (120). La enzima CD39 hidroliza el ATP del medio transformándolo en AMP, el cual es rápidamente degradado por CD73 en adenosina.

Tanto la adenosina como el ATP son reconocidos por los receptores P1 o P2 purinérgicos (A_{2A}R), dando lugar a efectos anti y proinflamatorios dependiendo del tipo de receptor al que se una. El reconocimiento de adenosina por su receptor A_{2A}R es un mecanismo importante de la regulación de la inflamación ya que actúa a través de la inhibición de diversas citocinas proinflamatorias y por otro lado también favorece la inhibición de la proliferación de células T. Las células T_{regs} también pueden transferir el AMP cíclico a células T a través de uniones comunicantes, inhibiendo la proliferación (120).

b) Privación de IL-2

La privación de IL-2 hacia las células T por acción de las células T_{regs} ha sido un mecanismo difícil de comprobar y que ha causado controversia entre diferentes grupos (114,121-124). Los primeros estudios

realizados *in vitro* para estudiar la capacidad de las células T_{regs} para regular la proliferación de células efectoras demostraron que la supresión de la proliferación era un mecanismo dependiente de IL-2 (124).

Debido a que las células T_{regs} no pueden producir IL-2 deben de consumir dicha citocina del medio que las rodea (101). Sakaguchi propuso que las células T_{regs} pueden consumir la IL-2 que producen las células T, ésta hipótesis apoyada por varios autores, la basó en la premisa de que las células T_{regs} expresan muchos de receptores de gran afinidad para la IL-2 (CD25) en su superficie (85,95,114,122-125).

Se sabe que las células T_{regs} requieren de IL-2 para regular su expansión, supervivencia así como su función supresora (98,116,126). Diversos investigadores se han enfocado en demostrar como las células T_{regs} consumen la IL-2 para cubrir sus requerimientos. Algunos grupos han demostrado que las células T_{regs} pueden consumir la IL-2 presente en el medio, ya que cuando se bloquea con anticuerpos anti-IL-2 observan que disminuye la capacidad de las T_{regs} para consumir esta citocina, conduciendo a la pérdida o disminución de la capacidad supresora (127,128). Otros grupos han observado que las células T_{regs} puede ejercer una acción supresora sobre células T deficientes del receptor para IL-2 (CD25), sugiriendo que la IL-2 no es una citocina esencial para suprimir la proliferación (129).

Por otro lado, hay grupos que han aplicado modelos matemáticos para explicar la competencia que existe entre las células T y T_{regs} por la IL-2 debido a que ambas poblaciones expresan el receptor de alta afinidad para IL-2 (como lo había propuesto S. Sakaguchi) y necesitan de esta citocina para llevar a cabo sus funciones (122,125,130).

Adicionalmente también se ha demostrado que *in vitro*, la competencia por la IL-2 depende de la distancia que existe entre las células T_{regs} y las células T, así como de la concentración de la citocina en el medio y de la cantidad de receptores en la superficie celular (122,125,131).

Recientemente, Pandiyan y colaboradores demostraron en un modelo *in vitro* que las T_{regs} son capaces de privar a las células T activadas de IL-2 conduciendo a la apoptosis de éstas últimas. En este estudio, células T_{regs} fueron cocultivadas con células T en presencia de IL-2 unida a una proteína de fusión (IL-2Fc), y cuando midieron la IL-2Fc intracelular observaron que la IL-2Fc principalmente se encontraba en el interior de las células T_{regs}. (123). Adicionalmente, en este mismo trabajo se describió *in vivo* en un modelo de enfermedad

inflamatoria del intestino, la apoptosis mediada por Bim de células T en presencia de T_{regs}, sugiriendo que la privación de citocinas es un mecanismo de supresión mediado por células T_{regs} que se puede llevar a cabo *in vivo* (123).

Otros autores han propuesto que las células T_{regs} inducen la inhibición de la expresión de IL-2, debido a que en los cultivos detectan bajos niveles de IL-2 y observan una disminución de mRNA en las células T. Sin embargo, cabe señalar que en estos estudios los cultivos se realizaron con células CD4⁺CD25⁺, consideradas como T_{regs}.(124,127,128).

iii) Supresión mediada por contacto célula-célula

Los mecanismos dependientes del contacto célula-célula que involucran moléculas de membrana, tales como CTLA-4, LAG3, granzimas, PD-1-PDL-1 o FasL, ocurren ya sea utilizando a las DC como intermediarias o directamente al contacto con la célula T.

Se ha demostrado que existe contacto entre las células T_{regs} y las DC y que esta interacción es importante para que las T_{regs} puedan ejercer sus funciones supresoras. Estudios *in vivo* han reportado que las T_{regs} impiden que las DC y las células CD4⁺ interactúen de manera estable, reduciendo el tiempo de contacto, lo cual impide la activación apropiada de las células T (132,133). Se ha demostrado también que las células T_{regs} impiden la maduración de las APCs, lo cual se ve reflejado en una activación deficiente de las células T (134). La inhibición de la activación de las DC parece depender por un lado de la interacción de LAG-3 en las T_{regs} con el MHC II en las DC (135,136). Por el otro, se sabe que la interacción de la molécula CTLA-4 en células T_{regs} inhibe la expresión de las moléculas de coestimulación CD80 y CD86 en las DC (132), probablemente por trans-endocitosis (115,121). CTLA-4 también induce la producción de indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) en las DC, una molécula con efectos reguladores en células T (137,138). Adicionalmente las células T_{regs} también pueden inducir la apoptosis vía granzimas/perforinas, PD-1-PDL-1o vía Fas-FasL (126,139-142).

Otro mecanismo utilizado por las células T_{regs} es el entrecruzamiento de CTLA-4 directamente con B7 en las células T para modular su proliferación (143).

La complejidad en la función de las células T_{regs} en los diferentes microambientes, sugieren que los mecanismos de supresión descritos no son excluyentes y aún cabe la posibilidad de describir nuevos mecanismos diferentes a los aquí descritos. La información reportada sugiere que dependiendo del antígeno y el microambiente, las células T_{regs} utilizan uno o varios mecanismos, por ejemplo los mecanismos observados *in vitro* no siempre funcionan *in vivo* y viceversa. También se ha observado que el o los mecanismo (s) de supresión utilizados por las T_{regs} dependen del nivel de inflamación y del tipo de respuesta inmune que sea necesario controlar, demostrando que una de las características fundamentales de esta población es su gran versatilidad (128,144).

Aunque diversos autores han tratado de dilucidar los eventos celulares y moleculares que se desarrollan tanto *in vivo* como *in vitro*, durante la ejecución de los mecanismos de supresión mediados por células T_{regs}, sigue siendo una interrogante (i) la forma y la medida en que cada mecanismo de acción contribuye al mantenimiento de la auto-tolerancia y la homeostasis del sistema inmune, (ii) cómo los hallazgos *in vitro* se correlacionan con la supresión *in vivo*; (iii) cómo los mecanismos de supresión son controlado por el factor de transcripción Foxp3 y, (iv) qué mecanismos son adecuados para un control eficaz de la respuesta inmune a través de células T_{regs} (114).

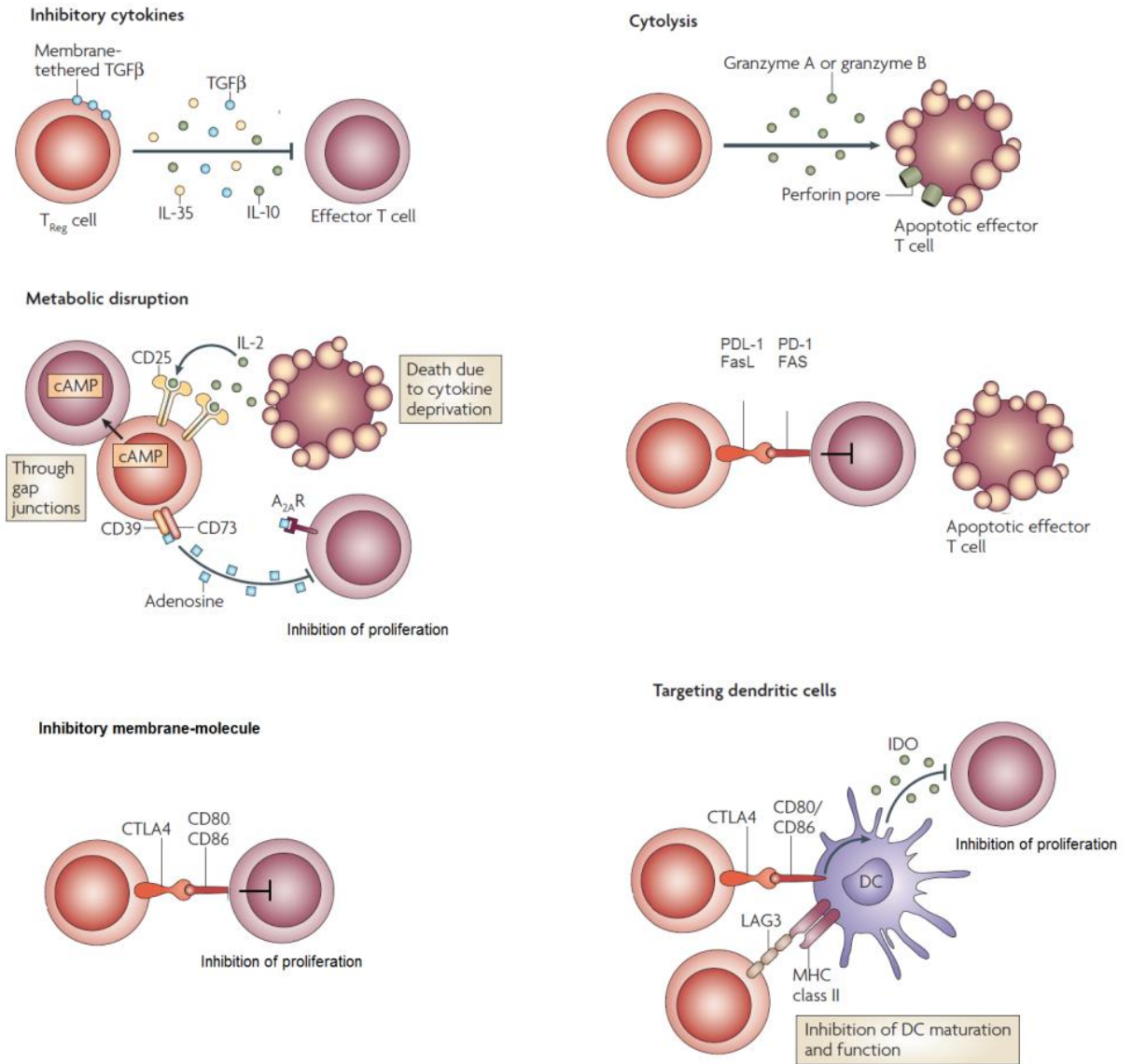


Figura 9. Mecanismos de acción de células T_{regs}. Modificado de Vignali 2008 (115).

I. Células T_{regs} y *T. gondii*

Aún cuando el papel de las células T_{regs} durante la infección con *T. gondii* ha sido poco explorado, los reportes que existen han sido muy contundentes. En el año de 2007 se reportó que la depleción con el mAb anti-CD25 no tenía efecto en la infección con este parásito ni en la fase aguda ni en la fase crónica de la infección (48), lo que sugería que las células T_{regs} no son importantes para la protección contra *T. gondii*. Posteriormente se demostró que en este modelo de infección, la depleción con altas cantidades de anticuerpo

llevan principalmente a la eliminación de células CD4⁺ efectoras (145) y de otras poblaciones celulares que expresan CD25 (78). Dadas las limitantes que implicaron el uso del mAb anti-CD25 en los estudios descritos los resultados no son realmente concluyentes. Morampudi y col. compararon la progresión de la enfermedad aguda causada por *T. gondii* en ratones BALB/c y C57BL/6 y examinaron el efecto de la disminución parcial de las células T_{regs}. En estos experimentos evaluaron la mortalidad y observaron que los ratones BALB/c sobrevivían a la infección (mantuvieron su resistencia a la infección), mientras que los ratones C57BL/6 sucumbían a la infección. Adicionalmente, se observó un aumento en la carga de parásitos en ratones BALB/c, especialmente en la lámina propia, pero no en ratones C57BL/6. El aumento en la carga parasitaria correlacionó con el aumento de citocinas pro-inflamatorias en ratones BALB/c, lo cual no se presentó en ratones C57BL/6. En conjunto, los hallazgos de Morampudi y col., proporcionan evidencia de la participación de las células T_{regs}, en la resistencia a la infección por *T. gondii* en ratones BALB/c (146), apoyando los datos de Jankovic y col (48).

Sin embargo, Ge y col. demostraron que durante la infección con *T. gondii* se observa una reducción (depleción natural) en el número de T_{regs} durante la fase aguda de la infección, y sugirieron que esta reducción favorece la inducción de abortos durante la infección con *T. gondii* en un modelo murino (147).

Oldenhove y col. reportaron que la reducción natural de T_{regs} se relaciona con la elevada inflamación característica de la infección con *T. gondii* (60); en este artículo se sugiere que el nivel de inflamación en el intestino impide la generación de células iT_{regs}, lo cual es en parte responsable de la reducción de T_{regs} que se observa durante la infección. Los autores demuestran que este ambiente Th1 obliga a las T_{regs} a expresar el factor de transcripción T-bet, lo que sugiere que la reducción de T_{regs} también está influenciada por una conversión de T_{regs} a células efectoras tipo Th1. La influencia del ambiente proinflamatorio en la reducción de las células T_{regs} se enfatiza al comparar modelos de susceptibilidad y resistencia, pues dicha reducción es más pronunciada en animales infectados con una cepa virulenta del parásito y también en animales de la cepa de ratón susceptible a la infección, demostrando que esta reducción de células Th1 (CD4⁺) está relacionada con la falta de IL-2 en el mismo periodo, ya que el tratamiento de los animales con complejos IL-2/anti-IL-2 mAb incrementa la cantidad de T_{regs}, la sobrevivencia de los animales infectados y reduce la inflamación intestinal (60). Benson y col., proponen que la disminución en número y de la actividad de células T_{regs} se debe a un mecanismo inducido por las células T efectoras. Estos autores proponen que la pérdida

parcial de las células T_{regs} inducida por la infección es esencial para el inicio de una potente respuesta Th1 y por ende la protección del huésped frente a *T. gondii*. Sugieren que la disminución de las células T_{regs} es una consecuencia causada por la expansión de las células T CD4⁺ que producen una cantidad limitada de IL-2, ya que la administración de rIL-2 (IL-2 recombinante) previene completamente la pérdida de células T_{regs} en ratones infectados. Pero la restauración de las células T_{regs} da lugar a una susceptibilidad mucho mayor a *T. gondii* (79).

Recientemente nuestro grupo describió que las células T_{regs} tienen un papel importante en la respuesta protectora contra *T. gondii*, ya que su eliminación lleva a un aumento en la tasa de mortalidad en la cepa resistente BALB/c (78). Por otro lado también describimos que las células T_{regs} activadas durante la infección con *T. gondii* en ratones C57BL/6 tienen aumentada su capacidad supresora. Utilizando ratones transgénicos Foxp3^{EGFP} demostramos que la eliminación selectiva de las células T_{regs} conduce a una recuperación total de la proliferación de linfocitos T en cultivos de células de bazo y que los mecanismos de inmunosupresión mediados por las células T_{regs} dependen de IL-2, pero no de IL-10 (69).

J. Justificación

La respuesta inmune frente a antígenos requiere una coordinación perfecta de todas las células que participan en las diferentes fases de esa respuesta. El objetivo de la respuesta es la destrucción rápida de los microorganismos pero debe garantizar al mismo tiempo el mínimo daño sobre la totalidad de las células y tejidos del organismo.

Durante la infección aguda con *T. gondii* se ha descrito un periodo de inmunosupresión que se caracteriza por la reducción en la proliferación de linfocitos T en respuesta a mitógenos o antígenos *in vitro* (38,61,62,64,65,68,69). Esta inmunosupresión que ha sido reportada tanto en humanos como en ratones, también es característica de otras infecciones parasitarias como las causadas por *P. chabaudi* (148), *P. berghei* (39,149), *T. congolense* (150), *H. polygyrus* (151), *B. malayi* (152), y *L. major* (39). El estudio de las células T_{regs} durante infecciones parasitarias ha generado importantes hallazgos en relación al papel de esta población como moduladora de la respuesta inmune (86). Se han descrito diferentes papeles para las células T_{regs} durante las enfermedades infecciosas, incluyendo el control de la patología, mantenimiento de la inmunidad contra la reinfección y establecimiento de patógeno favoreciendo la persistencia.

Varios grupos han propuesto que la reducción en la disponibilidad de IL-2 durante la infección con *T. gondii* conduce a una reducción en el número y porcentaje de células T_{regs} (60,69,79), sin embargo el remanente de células T_{regs} tienen aumentada su capacidad supresora (69).

Por medio del uso de ratones transgénicos Foxp3^{EGFP} se describió que las células T_{regs} tienen un papel importante en la supresión de la proliferación, ya que la eliminación selectiva de las células T_{regs} conduce a una recuperación total de la proliferación de linfocitos T en cultivos de células de bazo. También se describió que los mecanismos involucrados en la inmunosupresión mediados por las células T_{regs} dependen de la IL-2, pero no de la IL-10 (69).

Sin embargo, aunque se ha descrito el aumento en la actividad supresora del remanente de las células T_{regs} es importante conocer el o los mecanismo (s) de acción que conducen a la supresión la proliferación de células T de ratones infectados con *T. gondii*, con el objeto de contribuir al conocimiento y generar información que nos permita describir y entender los mecanismos de supresión que las células T_{regs} ejercen y que no han sido reportados hasta la fecha en esta infección.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

Durante la infección aguda con *T. gondii* las células T_{regs} ejercen sus mecanismos de supresión mediante el contacto célula-célula y a través de la secreción de citocinas.

Objetivo general:

Determinar los mecanismos de acción de las células T_{regs} que conducen a la disminución de la proliferación de linfocitos T durante la toxoplasmosis en el modelo murino.

Objetivos particulares:

El estudio de los mecanismos de acción utilizados por las células T_{regs} durante la infección aguda con *T. gondii* pretende:

- i) Determinar si las células T_{regs} actúan directamente sobre las células T o indirectamente mediante la modulación de las células accesorias.
- ii) Estudiar si los mecanismos de acción de las células T_{regs} requieren de la cercanía con las células T.
- iii) Identificar las moléculas de superficie involucradas en los mecanismos de supresión de células T.
- iv) Identificar las moléculas solubles involucradas en los mecanismos de supresión de células T.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de estudio

Se utilizaron ratones hembras de las cepas CD1 de 6 a 8 semanas de edad, con un peso de entre 18 y 20 g. También se utilizaron ratones hembras y en algunas ocasiones machos de la cepa C57BL/6J. Se usaron ratones transgénicos “*knock-in*” de fondo genético C57BL/6J (B6.Cg-Foxp3tm2Tch/J) adquiridos en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA), los cuales se caracterizan por coexpresar la proteína verde fluorescente (EGFP) junto al factor de transcripción Foxp3. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas con agua y alimentos *ad libitum*. Los protocolos fueron aprobados por la Comisión de Bioética para la Investigación en Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

2. Parásitos e Infección

- Mantenimiento de la cepa ME49 de *T. gondii*

La cepa ME49 de *T. gondii* se mantiene por pasaje de quistes de cerebro en ratones CD1. Para realizar el pasaje se obtienen los cerebros de ratones con dos meses de infección y se maceran en DPBS (1 cerebro/mL) utilizando un homogenizador de tejidos de vidrio con pistilo de teflón (Wheaton, Milville, NJ). El número de quistes se determina en una alícuota de 10 µl que se coloca en un portaobjetos y se observa en el microscopio de luz blanca. El inóculo se ajusta a 100 quistes/mL con DPBS y se infecta a los ratones CD1 inoculándolos por vía intraperitoneal con 100µl.

- Infección por vía oral

Para el caso de los ratones de experimentación (C57BL/6J), se obtiene el inóculo como se describe previamente. Los animales se anestesian por inhalación de Sevorano (ABBOTT, México) y se inoculan con 50 quistes en 100µl de DPBS por vía oral con una cánula de teflón (Cole Palmer, Veron Hills, IL). Para estudiar la supresión de la proliferación de células T se obtienen las células de bazo siete días post-infección (pi), tal como se describe en unas secciones más adelante.

3. Reactivos

- Medios de cultivo

a) RPMI-1640 Completo

Se utiliza medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 50 μ M de β -mercaptoetanol (Sigma, St Louis, MO), 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 1 mM piruvato de sodio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY).

b) Medio CD

El medio utilizado para el cultivo de hibridomas es el medio CD libre de suero (Gibco, Grand Island, NY) y suplementado con 8 mM de L-glutamina (Gibco, Grand Island, NY).

- Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para el desarrollo de este trabajo se describen en la Tabla 2. Cada uno de los anticuerpos se titulan antes de su uso, con el fin de determinar la cantidad óptima para detectar eficientemente las moléculas de interés y para ajustar los parámetros de compensación en los citómetros de flujo.

Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados durante el desarrollo del presente trabajo.

Anticuerpos*	Clona	Fluorocromo	Marca
Anti- Thy1.2	53-2.1	PE	BioLegend (San Diego CA)
Anti-CD4	RM4-5	PerCP, APC, PE	BioLegend (San Diego CA), Caltag (Burlingame, CA)
Anti- CD8	5H10	Alexa 647, FITC	Caltag (Burlingame, CA), BioLegend (San Diego CA)
Anti-CD28	37.51	-	BioLegend (San Diego CA)
Anti- CD3	500A2	FITC, Cy5	Caltag(Burlingame, CA)
Anti- CD25	PC61 5.3	PECy7	BioLegend (San Diego CA)
Anti-CD80	16-10A1	PE/Cy5	BioLegend (San Diego CA)
Anti- CD86	GL1	PerCP	BioLegend (San Diego CA)
Anti- LAG-3	C9B7W	PE	eBioscience (San Diego CA)
Anti- PDL-1	10F.962	PE	BioLegend (San Diego CA)
Anti-CTLA4	UC10-4B9	PE	eBioscience (San Diego CA)
Anti-FasL	Kay -10	PE	BioLegend (San Diego CA)
Anti- CD210	1B1.3A	PE	BioLegend (San Diego CA)
Anti-CD80	16-10A1	-	BioLegend (San Diego CA)

4. Cultivos celulares

- Hibridomas

Se usó el hibridoma 145-2C11, productor de anticuerpo de hamster anti-CD3 de ratón y el hibridoma UC10-4F10, productor de anticuerpo de hámster anti-CTLA-4 de ratón.

- Cultivo de células T y células de bazo

- a) La línea celular CTLL-2 dependiente de IL-2, se mantiene en cultivo con medio RPMI-1640 completo adicionado con interleucina-2 recombinante (rIL-2 [1U/mL]).
- b) Los linfocitos T purificados y las células de bazo se cultivan en medio RPMI-1640 completo.

Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂ y una humedad relativa del 95%.

5. Purificación de anticuerpos (mAb) a partir de sobrenadantes de cultivos de hibridomas

Los anticuerpos se obtienen por precipitación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 45% (masa/volumen). El sobrenadante se coloca en un vaso de precipitado con agitación constante y moderada, se agrega lentamente el (NH₄)₂SO₄, hasta llegar al 45% de saturación y se deja en agitación durante 2 h a 4°C. Posteriormente se centrifuga por una hora a 18,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se decanta y el precipitado se resuspende en un volumen mínimo necesario de PBS para disolverse. Después de disolver el anticuerpo, se coloca en una membrana de diálisis Spectra (Spectrum Laboratoires, CA) y se dializa en 100 volúmenes de PBS por 48 h a 4°C, haciendo cambios de PBS en intervalos de 6 h. El dializado se recupera y se centrifuga a 14,000 rpm a 4°C durante 30 min, se recupera el sobrenadante y se determina la concentración de anticuerpo por espectrofotometría a 280nm utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{ de Anticuerpo} = \frac{\text{DO a 280nm}}{1.25}$$

6. Inmunofluorescencia (IFA) y citometría de flujo

6.1. Detección de moléculas de superficie

Resuspender 1X10⁶ de células en 100µL de buffer de tinción (DPBS, + 1% FCS) que contengan diluidos los anticuerpos correspondientes a las concentraciones óptimas. Se incuba durante 30 minutos (4 ° C en la oscuridad); al finalizar la incubación lavar dos veces con buffer de lavado (DPBS, 1% FCS, 0,1% NaN₃) y resuspender en 400µL de DPBS.

6.2. Análisis de viabilidad celular

Un millón de células se resuspenden en 100 µL de DPBS con 20 µg/mL de 7-amino-actinomicina (7-AAD, Molecular Probes). Se incuba durante 20 min (4°C, oscuridad), al finalizar la incubación se lava dos veces con buffer de lavado (DPBS, + 1% FCS, + 0,1% NaN₃) y se resuspende en 400µL de DPBS. En algunos casos se realiza IFA para teñir moléculas de superficie antes de incubación con 7-AAD.

6.3. Análisis de ciclo celular

Quinientas mil células perfectamente resuspendidas en 500 μ l de PBS se mezclan con 5 ml de etanol a 4°C. Se mantienen por 3 días para recuperar las células a los diferentes tiempos, aunque se pueden mantener las muestras a 4°C por varias semanas. Las células fijadas se centrifugan durante 5 min a 1500 rpm, se decanta el etanol y se agrega 1mL de buffer de extracción de DNA de bajo peso molecular. Los tubos se tapan e incuban en un baño a 37°C en agitación por dos horas. Las células se centrifugan a 3200 rpm, se decanta el sobrenadante, se resuspende con 0.5 mL en solución de marcado que contiene el yoduro de propidio (20 μ g/mL) y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se analiza inmediatamente en el citómetro de flujo en el canal FL-2 capturando 10^4 eventos (FASCan).

6.4. Tinción con CFSE y Dye eFluor 670

La tinción con CFSE (Molecular Probes) se llevó a cabo de acuerdo lo reportado (153). Las células se resuspenden a una concentración de 2.5×10^7 células/ml de DPBS y se tiñen agregando un volumen idéntico de CFSE o Dye eFluor 670 (5 mM) diluido en DPBS e incubando 5 min, a temperatura ambiente y en oscuridad con agitación ocasional. La tinción se detiene mediante la adición de 5 volúmenes de DPBS + 10% FCS, las células se centrifugan (5 min, 1500 rpm), se resuspenden en medio RPMI completo, se cuentan y se ajustan a una concentración de 10^6 células/ml.

6.4.1 Evaluación de la proliferación mediante el análisis de la dilución de CFSE

a) Ensayos de proliferación

Un millón de células de bazo teñidas con CFSE se siembran en placas de 24 pozos (Costar, Cambridge, MA) en 2 ml de medio completo y se estimulan con 10 μ g/ml de anticuerpo anti-CD3 fijado a la placa. Para fijar el anticuerpo anti-CD3 a la placa se siembra 1mL del anticuerpo (10 μ g/ml) diluido en DPBS y se incuba durante una noche a 4°C, finalmente antes de sembrar las células se retira el sobrenadante y se

adiciona la suspensión celular. Los linfocitos T, purificados, también se siembran en placas de 24 pozos, pero se estimulan con 3 µg/ml del anticuerpo anti-CD3 (fijado a la placa) y 0.1 µg/ml del anticuerpo anti-CD28 (soluble) diluido en medio de cultivo suplementado.

Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 37 ° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Al final del período de incubación, las células fueron lavadas dos veces con DPBS + 1% FCS y teñidas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y/o el colorante 7-AAD, al finalizar la tinción se analizaron inmediatamente por citometría de flujo. En algunos experimentos se añadió rIL-2 10 U/ml al momento de iniciar la estimulación (Roche); en algunos casos se recuperó 250µL de sobrenadantes para realizar la cuantificación de IL-2, lo cual se mencionará en otro punto de la metodología.

b) Ensayos de supresión de la proliferación en sistemas transwells

Se cultivan 1X10⁶ células T_{efec} teñidas con CFSE en presencia de células T_{regs} en proporciones 10:1 ó 3:1 (T_{efec}:T_{regs}), en placas de 24 pozos tipo "Transwell". Las células fueron estimuladas con 3 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (fijado) y 0.1 µg/ml de anticuerpos anti-CD28 (soluble) (Biolegend) en un volumen final de 2mL de medio RPMI suplementado, durante 72 horas a 37 ° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Al final del período de incubación, las células fueron lavadas dos veces con DPBS + 1% FCS y teñidas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 y se analizaron inmediatamente por FACS (como se menciona previamente).

Después de 24 horas de incubación se recuperaron 250 µL de sobrenadante de cada pozo para realizar la cuantificación de IL-2, lo cual se mencionará en otro punto de la metodología.

6.5. Adquisición y análisis de muestras de citometría de flujo

Las células fueron adquiridas utilizando los citómetros FACScan, FACScalibur (Becton Dickinson) y/o Attune (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados con el software “FlowJo Software V.7.6” o “Attune Software”.

7. Purificación de células por “cell sorting”

7.1. Obtención de esplenocitos

Los esplenocitos se obtienen mediante perfusión con medio RPMI no suplementado. La suspensión celular se coloca en un tubo de 15 mL, se deja sedimentar durante 5 min y la suspensión se transfiere a un tubo nuevo. La muestra se centrifuga (5 min a 1200 rpm), se retira el sobrenadante y se lisan los eritrocitos resuspendiendo el botón celular en 1.5 ml de solución de lisis e incubando 5 min a temperatura ambiente (TA); para detener la lisis se agregan 10 mL de DPBS y la muestra se centrifuga 5 min a 1200 rpm. Los esplenocitos se lavan dos veces más con 10 mL de DBPS, y se resuspenden en 3 mL de RPMI suplementado. La suspensión celular se cuenta por tinción con azul de tripano en una cámara de Neubauer y se ajusta a la concentración celular adecuada.

- Condiciones de aislamiento de células por “cell sorting”

El aislamiento de las diferentes poblaciones celulares se realiza mediante el uso del FACSAria utilizando una cámara de flujo (*Nozzle*) de 70µm. Para separar la población de interés, las células deben ser resuspendidas en PBS (1×10^7 células/mL) suplementado con estreptomicina y penicilina (1%), después de haber sido teñidas. Las células se colectan en 1 mL medio RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, dejando que el medio de recolección solo se diluya máximo 1:3. Después de recolectar las células se centrifugan y se utilizan para los ensayos de proliferación. La pureza de cada población siempre fue $\geq 90\%$.

7.2. Purificación de células T

Para aislar células T se hace una inmunofluorescencia directa con los esplenocitos utilizando el anticuerpo anti-Thy1.2-PE. La selección de las células T se define primero por características de tamaño y granularidad, posteriormente se selecciona la región de linfocitos y a partir de esta región, se realiza un gráfico “dotplot” de $Foxp3^{EGFP}$ vs Thy-PE. En la Fig. 10 se muestra que para aislar células T se selecciona la población $Thy1.2 PE^+$, la cual incluye a las células $Thy1.2 PE^+Foxp3^{EGFP+}$ (T_{regs}) y $Thy1.2PE^+ Foxp3^{EGFP-}$ (T_{efec}).

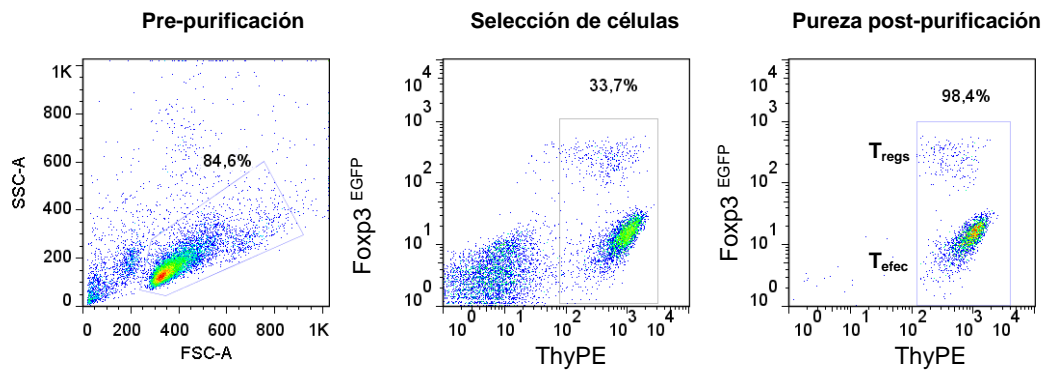


Figura 10. Esquema de la estrategia para purificación de células T. En el primer gráfico se muestra la selección de la región de los linfocitos que se definió por características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC), posteriormente a partir de dicha región se realizó un gráfico de Thy PE vs $Foxp3^{EGFP}$, en el cual se delimitó la población de células T y a partir de esta región se purificaron las células T que contienen tanto células T_{efec} como T_{regs} .

7.3. Purificación de células T efectoras (T_{efec}).

Para aislar células T_{efec} se hace una inmunofluorescencia directa con los esplenocitos usando el anticuerpo anti-Thy1.2-PE; de igual forma los linfocitos primero se separan por características de tamaño y granularidad, posteriormente de la región de linfocitos se realiza un gráfico “dotplot” de $Foxp3^{EGFP}$ vs Thy-PE. De ésta última gráfica se selecciona a las células T_{efec} mediante el fenotipo: $Thy1.2PE^+ Foxp3^{EGFP-}$.

7.4. Purificación de células T reguladoras (T_{regs})

Para aislar las células T_{regs} primero se realizó un enriquecimiento el anticuerpo de rata anti-CD4 acoplado a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) y posteriormente se realizó el “*cell sorting*” usando el marcaje con anti-ThyPE como se ha descrito previamente.

i. Enriquecimiento con perlas magnéticas (MACS)

Los esplenocitos se centrifugan (1500rpm, 10 min) y se resuspenden 2×10^7 células en 1800µL de solución de separación desgasificada (PBS, 2mM EDTA y 0.5% BSA), se agregan 200µL del anticuerpo anti-CD4 acoplado a perlas magnéticas (MiltenyiBiotec) y se incuban 15 min en agitación a 4°C. Las células se lavan con 10 volúmenes de solución de separación, se resuspenden en 500µL de la misma solución y se mantienen a 4°C mientras se prepara la columna de separación. Se monta la columna de separación magnética (MS Column, MiltenyiBiotec) en el imán del separador magnético y se equilibra con 500µL de buffer de separación. Posteriormente se agrega la suspensión celular marcada con el anticuerpo anti-CD4 y se hacen tres lavados con buffer de separación utilizando 500µL cada vez; el eluido en este paso corresponde a la fracción CD4⁻. La fracción CD4⁺ se colecta retirando la columna del imán, agregando 2 mL de buffer y aplicando presión con el émbolo que acompaña a la columna. Una vez separadas las células, se cuenta el número de células de las dos fracciones y se procede a la purificación de células T_{regs}.

ii. Purificación de células T_{regs} por “cell sorting”

Para aislar células T_{regs} de la fracción CD4⁺ enriquecida, se tiñen las células con anti- Thy PE. Primero, las células se separan por características de tamaño y granularidad, posteriormente de la región de linfocitos se realiza un gráfico “*dotplot*” de Foxp3^{EGFP} vs Thy-PE. De ésta última gráfica se selecciona a las células Thy1.2PE⁺ Foxp3^{EGFP+}, que corresponden a las T_{regs}.

7.5. Purificación de esplenocitos libres de T_{regs}

Los esplenocitos de ratones Foxp3^{EGFP} se separan definiendo por tamaño y granularidad una población que excluya únicamente los restos celulares. Posteriormente se hace un histograma para Foxp3^{EGFP} en donde se selecciona las células Foxp3^{EGFP} para su eliminación y el aislamiento de la población Foxp3⁻.

8. Cuantificación de IL-2 en sobrenadantes

La cuantificación de IL-2 en los sobrenadantes se llevó a cabo por un ensayo enzimático tipo sandwich (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Biolegend). En la Tabla 3 se describe las soluciones, anticuerpos y reactivos que se utilizaron para realizar el ELISA para cuantificar IL-2.

Tabla 3. Descripción de reactivos para el desarrollo del ELISA para cuantificar IL-2.

Reactivo	Composición
Buffer de Carbonatos PBS	0.1M NaHCO ₃ , 33.6 mM Na ₂ CO ₃ . pH= 9.5 36.9 mM NaCl, 8.2 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.47 mM KH ₂ PO ₄ , 2.7 mM KCl. pH =7.4
Solución de dilución	PBS + 10% SFB
Solución de Lavado	PBS + Tween 20 0.05%
Solución de Acetato de Sodio	Acetato de Sodio 0.1M pH= 6
Solución TMB (sustrato)	Diluir 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (Sigma) en DMSO a una concentración de 13mg/mL. Guardar a 4°C en la oscuridad. (Para preparar la disolución de revelado).
Solución H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ 130 mM (Para preparar la disolución de revelado).
Anticuerpos	IL-2 Purificado JES6-1A12 (Anticuerpo de captura) IL-2 Biotinilado JES6-5H4 (Anticuerpo de detección)
IL-2 recombinante	La curva de IL-2 (3.9 a 500 pg/mL)
Conjugado	Avidina-HRP
Solución de paro de reacción	H ₂ SO ₄ 1N

El anticuerpo de captura se diluye a una concentración de 2 µg/ml en buffer de carbonatos y se colocan 100 µL en cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos de poliestireno de alta afinidad (Costar), se cubre la placa para evitar la desecación y se deja incubando a 4°C toda la noche. Transcurrida la incubación se retira la placa del refrigerador y una vez que la placa ha llegado a temperatura ambiente (TA) se lava tres veces con solución de lavado, se agregan 200

µL de solución de dilución a cada pozo para bloquear y evitar pegado inespecífico y se incubaba a TA durante 4h.

La curva estándar se prepara con la citocina recombinante haciendo diluciones seriales 1:1 con RPMI completo, cubriendo un rango de concentraciones de 3.9 a 500 pg/mL. Transcurrida la incubación de bloqueo, se lava la placa 3 veces y se agregan 100 µL de cada una de las diluciones de la curva estándar o de las muestras en cada pozo por duplicado, cubrir la placa para evitar desecación e incubar toda la noche a 4°C. Transcurrida la incubación se retira la placa del refrigerador y una vez que la placa ha llegado a TA se lava la placa 5 veces y se agrega a cada pozo 100 µL del anticuerpo de detección diluido en solución de dilución a una concentración de 1 µg/ml, cubrir la placa e incubar 1 h TA. Lavar la placa 5 veces y agregar a cada pozo 100 µL del conjugado Avidina-HRP (Biolegend) diluido 1:1000 en solución de dilución e incubar 30 min a TA. Posteriormente se lava la placa 5 veces y agrega 100 µL del reactivo para revelar a cada pozo. Se incubaba a TA durante 10-30 min en la oscuridad y se detiene la reacción agregando a cada pozo 100 µL de H₂SO₄ 1N. Finalmente se lee la absorbancia a 450/570 nm.

9. Análisis de la expresión del mRNA de IL-2 por RT-PCR

El RNA total de células T estimuladas durante 24h con anti-CD3 y anti-CD28 fue aislado mediante Trizol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El cDNA fue sintetizado usando una transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen) y unos oligo-dT como iniciadores. La PCR se realizó con una mezcla de reacción de 25 µL, la cual se preparó con los siguientes componentes: 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 2,0 mM MgCl, 0,2 mM dNTPs, 1 U de Taq ADN polimerasa, 1 µM de cada uno de los iniciadores y cDNA obtenido 250 ng de ARN total. En la Tabla 4 se muestran las secuencias de los iniciadores (Sigma) utilizados en la PCR.

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación de IL-2 y β -actina.

IL-2	Sentido	5'AGCAGCACCTGGAGCAGCTG3'
	Antisentido	5'GTCCACCACAGTTGCTGACT3'
β-actina	Sentido	5'TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC3'
	Antisentido	5'TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG3'

Las condiciones de la reacción fueron: 35 ciclos a 94°C (30 seg), 58 ° c (45 seg) y 72 ° c (30 s) utilizando un termociclador GeneAmp PCR sistema 2400 (Perkin Elmer). Después de la amplificación, 10 μ L de los productos PCR fueron separadas en geles de agarosa 2.0% (w/v) y teñidos con bromuro de etidio.

10. Bioensayo de IL-2

Para evaluar si las células T_{regs} podían competir por la IL-2 con células T se utilizó el bioensayo clásico de determinación de IL-2 usando las células CTLL-2 las cuales son dependientes de IL-2 (154). Para realizar este ensayo, se sembraron 10,000 células CTLL-2 en placas de 96 pozos (Costar, USA), por triplicado. Las células se incuban con rIL-2 (0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 U/mL) en un volumen final de 200 μ L, en algunos casos se agregaron diferentes proporciones de células T_{regs} de ratones infectados o no infectados (1:10, 1:3 ó 1:1 [T_{regs}:CTLL-2]) y se incuban 72 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Se agregan 0.5 μ Ci de [3H]-Timidina (Amersham PharmaciaBiotec, Uppsala, Suecia) diluida en 20 μ L de medio, 18 h previas antes de que culmine la incubación de las 72h. Las células se cosechan en filtros de fibra de vidrio utilizando un cosechador automático (Skatron Instruments, Sterling VA). La incorporación de radiactividad se determina por espectrometría de centelleo en un contador de centelleo β -plate (Wallac, Turku, Finland) o LS6500 (BeckmanCoulter, CA).

11. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Prisma 5.0 (GraphPad), dependiendo el tipo de variable y los grupos a comparar se seleccionaron las pruebas adecuadas para cada caso. Para determinar diferencias significativas entre dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student con un intervalo de confianza del 95%; cuando los grupos tenían varianzas diferentes se aplicó la corrección de Welch. Para comparar más de dos grupos se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías con un intervalo de confianza del 95%, seguida de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativos los valores $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis están divididos en cinco capítulos. El primer capítulo describe la estrategia que se siguió para evaluar la inmunosupresión de células T estimulando con el anticuerpo anti-CD3 en el modelo de infección con *T. gondii*. El segundo capítulo contiene el análisis de moléculas de superficie en células T_{regs} que correlacionan con su capacidad supresora. El tercer capítulo contiene las estrategias utilizadas para explorar los mecanismos de acción de las células T_{regs} involucrados en la inmunosupresión. El cuarto capítulo contiene el artículo titulado “T cell-suppression *in vitro* during *Toxoplasma gondii* infection is the result of IL-2 competition between Treg and T cells leading to death of proliferating T cells” (155), en donde demostramos que las células T_{regs} compiten con las células T por niveles limitantes de IL-2, lo cual resulta en la muerte de células T que proliferan un par de rondas después de haber sido estimuladas. El quinto capítulo contiene información suplementaria que no fue publicada en el artículo pero que fue importante para la exploración e interpretación del mecanismo de acción que involucra la competencia por la IL-2 entre las células T_{regs} y T_{efec}.

CAPÍTULO 1. Inmunosupresión de células T estimuladas con el anticuerpo anti-CD3

Se evaluó la proliferación de células T de bazo provenientes de ratones que cursan la fase aguda de la infección con *T. gondii*, con el objetivo de determinar si el fenómeno de la supresión de la proliferación era detectable al estimular con anticuerpo anti-CD3, tal como se ha reportado al estimular esplenocitos con otros mitógenos como ConA, PHA o antígenos solubles de *T. gondii* (sAgT) (38,61,63-65,68-70,74,75).

a. Montaje de las condiciones óptimas para evaluar la proliferación de linfocitos T

Como primer paso se determinó la concentración óptima de anticuerpos anti-CD3 fijados a la placa y el tiempo de estimulación adecuado para observar la proliferación de células de bazo teñidas con CFSE. Se probaron diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3, como control positivo de estimulación de la proliferación se utilizó Con A (1 µg/mL) y como control negativo se sembraron células solo con medio RPMI. Transcurridas las 72 h, las células se cosecharon y se analizaron en el citómetro de flujo. El análisis de flujo se llevó a cabo realizando un “*dot-plot*” de tamaño vs granularidad, se seleccionó la región de linfocitos (Fig. 11A) y a

partir de esta región se realizó un histograma para evaluar la dilución de CFSE (Fig.11B-C). Observamos un efecto dosis-dependiente del anticuerpos anti-CD3 sobre la proliferación (Fig. 11B), ya que conforme aumenta la concentración del anticuerpo anti-CD3 aumenta el número de divisiones y el tamaño de los picos para CFSE. Adicionalmente, observamos que la proliferación inducida con la concentración de 10 µg/mL del anticuerpo anti-CD3 es similar a la estimulación inducida por el control positivo (Fig. 11C). Como era de esperarse, las células que no fueron estimuladas no diluyen CFSE, lo cual se puede ver en los histogramas como un pico sombreado en las Fig. 11B-C. Con esta estandarización determinamos que la concentración óptima de anti-CD3 para estimular linfocitos T por 72h es la de 10 µg/mL.

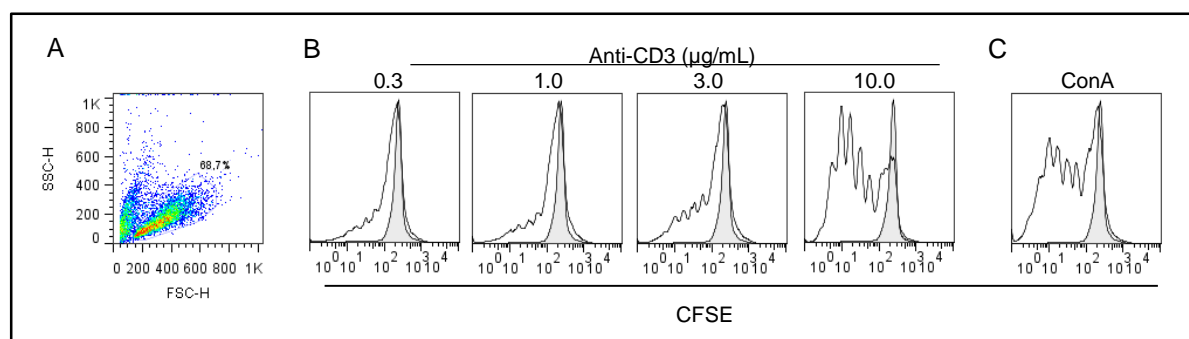


Figura 11. Estandarización de la inducción de la proliferación de linfocitos de bazo de ratones C57BL/6. Células de bazo de ratones no infectados fueron teñidas con CFSE y estimuladas con mAbs a-CD3 o con ConA por 72 h. Las células se cosecharon y analizaron por FACS. A) Estrategia de selección de la población de linfocitos de acuerdo a su tamaño y granularidad. B) Proliferación de células de bazo determinada por la dilución de la fluorescencia del CFSE, al estimular con el anticuerpo anti-CD3. C) Proliferación de células de bazo estimuladas con ConA (1µg/mL).

b. Supresión de la proliferación de células T estimuladas con el anticuerpo anti-CD3

Para cuantificar la supresión de la proliferación de las subpoblaciones de células T de bazo de ratones infectados al estimular con el anticuerpo anti-CD3 (10µg/mL), se analizó la proliferación de los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ de bazo de ratones siete días después de la infección. Las células se cosecharon 72 h después de la estimulación y se realizaron inmunofluorescencias con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8. La estrategia para analizar de forma cuantitativa la supresión de la proliferación consistió en seleccionar la región de los linfocitos de una gráfica tipo “dot-plot” que se definió por características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) (Fig 12). Posteriormente a partir de dicha región se realizó una gráfica de CFSE vs CD4 o CD8, en la cual se delimitó la población CD8⁺ o CD4⁺. A partir del “gate” para

células CD4⁺ o CD8⁺ se analizó la proliferación mediante la dilución de la fluorescencia de CFSE. Adicionalmente se determinaron los valores cuantificables que correlacionan con la proliferación celular: i) porcentaje de células divididas, ii) índice de proliferación y iii) índice de división usando el programa FlowJo (Fig. 12).

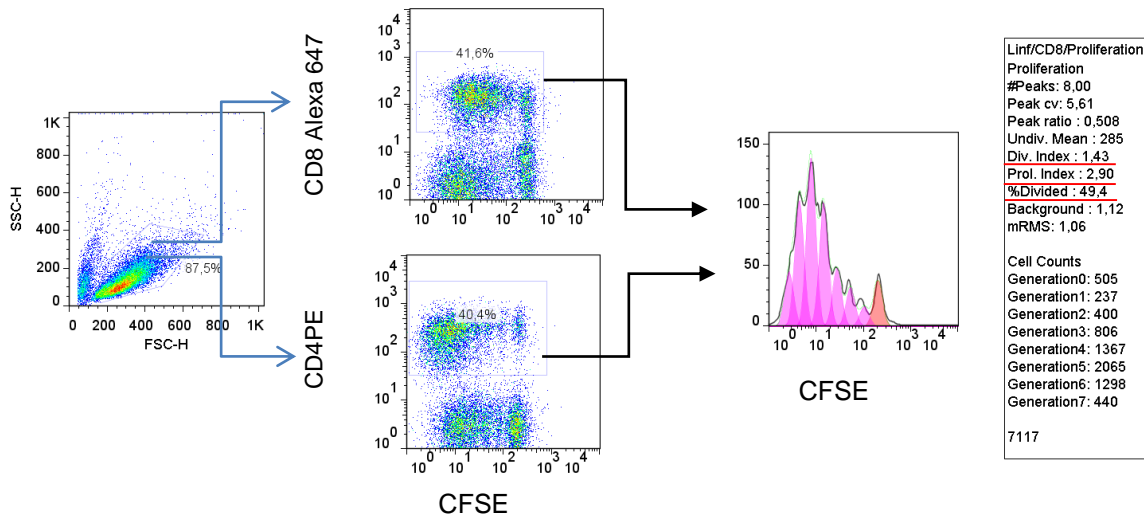


Figura 12. Estrategia para el análisis cuantitativo de la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T. La región de linfocitos fue definida por las características de tamaño y granularidad (FSC y SSC); posteriormente se realizó un “gate” de células CD4⁺ y CD8⁺. La proliferación fue analizada por dilución de CFSE para cada población.

Al comparar la proliferación de las células de ratones no infectados contra la proliferación de células de ratones infectados a los siete días post infección, observamos que existe una fuerte supresión de la proliferación en las dos poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Fig. 13A). Para el caso del “gate” de linfocitos y para linfocitos T CD8⁺, observamos que el número de divisiones (6 y 7 respectivamente) entre células de ratones no infectados e infectados, es el mismo (Fig. 13A). Sin embargo, podemos ver que el tamaño de los picos es menor en las células de ratones infectados, lo cual se debe a que es menor la cantidad de células de ratones infectados que pueden dividirse el mismo número de veces que las células de ratones no infectados. Para el caso de células T CD4⁺ de ratones infectados observamos que disminuye a 4 el número de divisiones, comparando con el número de divisiones en ratones no infectados, en donde el número de divisiones es 5 (Fig. 13A). Por otro lado, también observamos que la cantidad de células T CD4⁺ de ratones infectados que logran dividirse es menor comparando con las células de ratones no infectados

(Fig. 13A). En conjunto nuestros resultados demuestran que al estimular con el anticuerpo anti-CD3 podemos detectar el fenómeno de inmunosupresión tal como se ha demostrado al estimular con ConA (69).

Con los diferentes parámetros cuantitativos del análisis de la proliferación (Índice de proliferación, Porcentaje de células divididas e Índice de división), podemos observar que la proliferación disminuye de forma significativa para las diferentes poblaciones de linfocitos T (Fig. 13B-C). Para el caso del “gate” de linfocitos podemos observar que con los tres parámetros la disminución de la proliferación corresponde al $30 \pm 7.1\%$ (Fig. 13C-D). Para el caso de los linfocitos T CD4⁺, podemos observar que con el porcentaje de células divididas y con el índice de división la disminución de la proliferación es de un $50 \pm 7.5\%$ (Fig. 13C-D), mientras que con el índice de proliferación para células T CD4⁺ la disminución es de un $25 \pm 1.9\%$ (Fig. 13B). En linfocitos T CD8⁺ observamos que con los tres parámetros la reducción de la proliferación corresponde a un $30 \pm 9.6\%$. Por lo tanto, nuestros datos demuestran que estos parámetros permiten evaluar eficiente y cuantitativamente la inmunosupresión de la proliferación de linfocitos T, utilizando como mitógeno el anticuerpo anti-CD3.

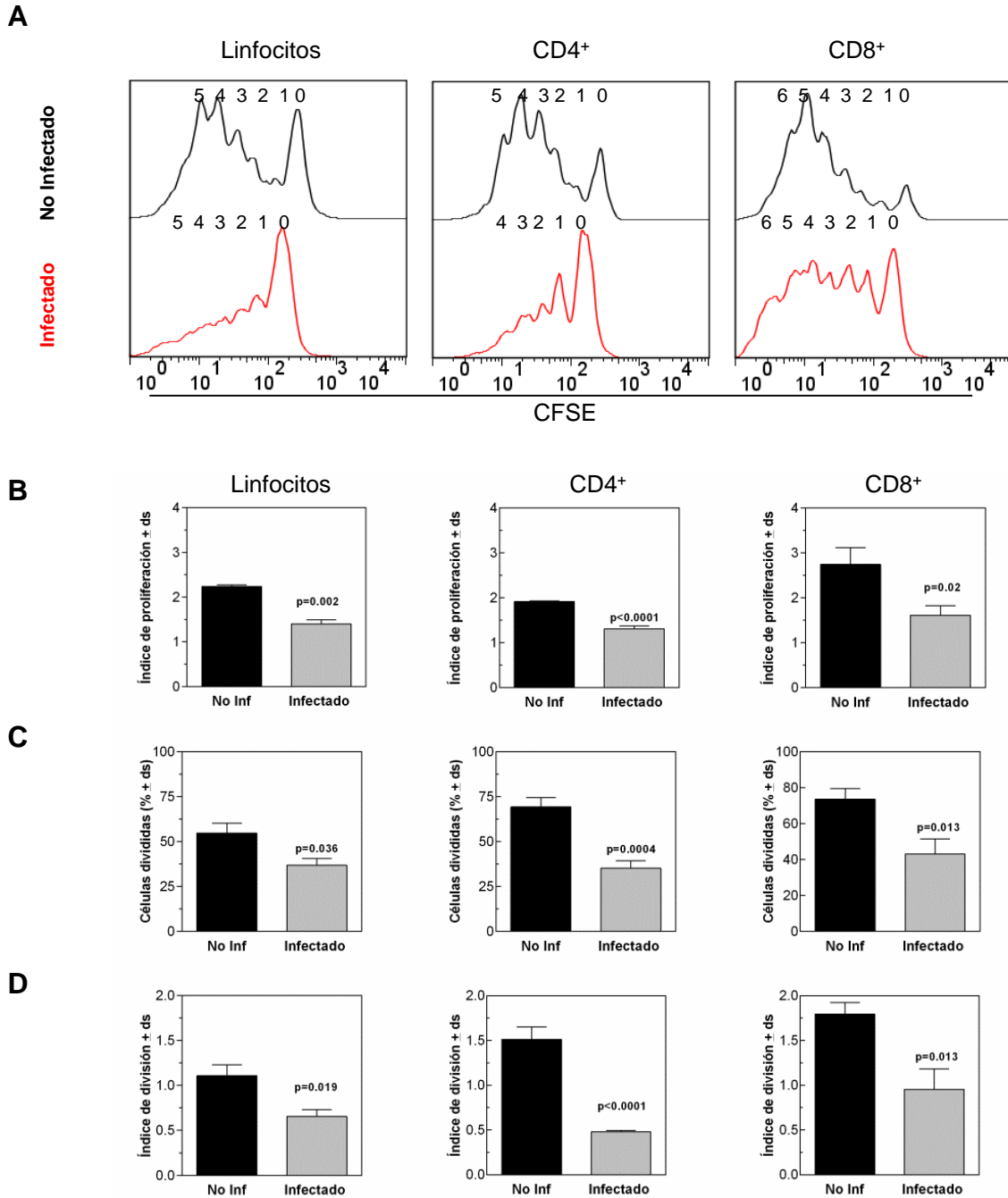


Figura 13. Inmunosupresión de linfocitos inducida por la infección con *T. gondii* en ratones C57BL/6. Esplenocitos obtenidos a los 7 post infección (50 quistes ME49) fueron teñidos con CFSE y estimulados con el mAb anti-CD3. Después de 72 horas las células fueron cosechadas y teñidas con los mAbs anti-CD4 y anti-CD8. Posteriormente, las células se analizaron por FACS como se describió previamente. Histogramas representativos de la supresión de la proliferación en las diferentes poblaciones de linfocitos **A**). Determinación del índice de proliferación **B**), Porcentaje de células divididas **C**) e índice de división **D**). Los datos corresponden a 3 experimentos independientes con 3-4 ratones cada uno. Las gráficas representa la desviación estándar (ds) y los datos se analizaron utilizando la prueba *t* de *student*.

CAPÍTULO 2. Análisis de moléculas de superficie en células T_{regs}

Como se mencionó anteriormente, no se han elucidado las moléculas ni los mecanismos de acción de las células T_{regs}, involucrados en la inmunosupresión observada durante la infección con *T. gondii*. Primero caracterizamos a las células T_{regs} de acuerdo a la expresión de moléculas de superficie que están involucradas en los mecanismos de supresión reportados en la literatura [Fig. 14] (121,156,157).

Previamente, nuestro grupo reportó que las células T_{regs} expresan diversas moléculas de activación como CD62L, GITR, CD69, CD25 y CTLA-4 (69), entre las cuales CD25 y CTLA-4 están involucradas con los mecanismos de supresión. Por lo tanto, adicionalmente a CD25 y CTLA-4 decidimos analizar moléculas como LAG-3, Fas-L y PDL-1 (Fig 14.).

Tanto LAG-3 como CTLA-4 y FasL son moléculas que pueden inhibir la proliferación de células T, a través de la regulación de la actividad de células presentadoras de antígeno (158). PDL-1, CTLA-4 y Fas-L, pueden inducir anergia y/o apoptosis en células T al unirse a sus respectivos correceptores, evitando que las células T activadas puedan proliferar (159,160). Mientras que el receptor para IL-2 (CD25) ha sido correlacionado con un mecanismo de privación de IL-2 (123).

Durante el análisis de la expresión de moléculas de superficie en células T_{regs}, también analizamos en linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁻ y TCD8⁺ los co-receptores de las moléculas expresadas en las células T_{regs}, de tal forma que la interacción ligando-receptor entre células T_{regs} y T_{efec} pudiera explicar la supresión de la proliferación (Fig. 15).

Nuestros resultados muestran que a los 7dpi aumenta tanto el porcentaje de células T_{regs} que expresan LAG-3, CD25, CTLA-4 y PDL-1, como la expresión de dichas moléculas en superficie de las células (Fig. 14). Sin embargo, no observamos cambios en la expresión ni en el porcentaje de células T_{regs} que expresan Fas-L. Estos resultados confirman que las células T_{regs} son activadas durante la infección con *T. gondii* y que expresan en su superficie moléculas que correlacionan con sus mecanismos de supresión.

El aumento en la expresión de cuatro de los cinco marcadores analizados nos proporcionó varias alternativas de estudio para esclarecer los mecanismos de acción de las células T_{regs} que conducen a la supresión de la proliferación en la infección con *T. gondii*.

En la literatura se ha descrito que las células T_{regs} pueden mediar la supresión de células T por interacción de CTLA-4 con CD80 o PD-1 con PDL-1 (121,156), por lo que exploramos la expresión de CD80 y PDL-1 en células T efectoras.

En células T CD4⁺ y TCD8⁺ observamos un aumento en el porcentaje de células CD80⁺ y PD-1⁺, adicionalmente también observamos que incrementa la expresión de estas moléculas en su superficie (Fig. 15). Estos datos nos sugirieron que tanto linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ podían ser susceptibles a la supresión vía CTLA-4/CD80 y/o vía PDL-1/PD-1, por lo tanto decidimos explorar estos mecanismos de supresión (Capítulo 3).

Por otro lado, como ya se ha mencionado, nuestro grupo reportó que las células T_{regs} suprimen la proliferación de células T mediante un mecanismo dependiente de IL-2 (69), lo cual se correlaciona con el aumento en la expresión de receptor para IL-2 (CD25), por lo que decidimos estudiar simultáneamente el mecanismo de “deprivación” de IL-2 junto con los mecanismos mediados por las vías de CTLA-4/CD80 y PDL-1/PD-1, para dilucidar si estos mecanismos son los utilizados por las células T_{regs} para inducir la supresión de la proliferación (Ver Capítulo 3).

LAG-3 es una molécula efectora presente en células T_{regs} activadas que inhibe la activación de las DC. Esta molécula ejerce su acción mediante la interacción con las moléculas clase II de las DC, conduciendo a una deficiente coestimulación de células T (135,136). Sin embargo, este mecanismo de acción de las células T_{regs} no se exploró en este trabajo.

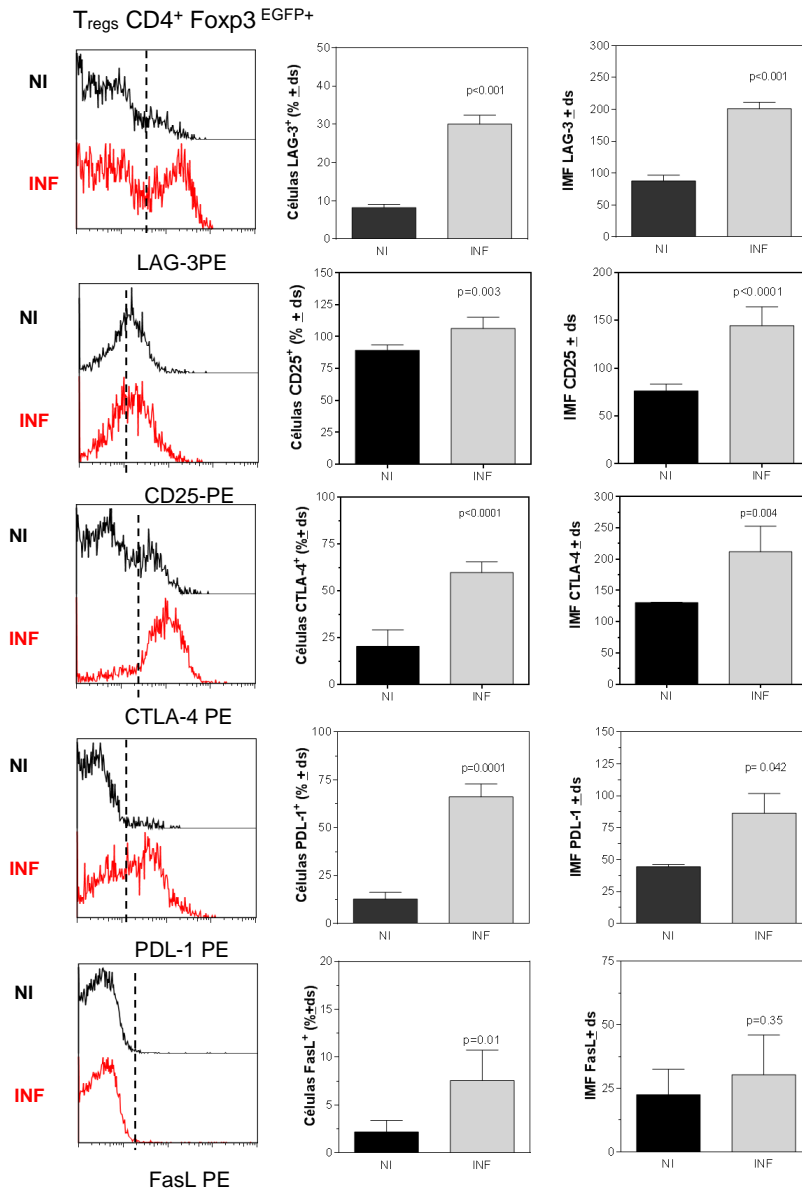


Figura 14. Análisis de la expresión de moléculas de activación en T_{regs} durante la infección con *T. gondii*. Esplenocitos de ratones infectados obtenidos a los 7 post infección fueron teñidos con anticuerpos anti-CD4, anti-LAG3, anti-CD25, anti-CTLA-4, anti-PDL-2 y anti-FASL y analizados por FACS. La región de linfocitos fue definida por las características de tamaño y granularidad (FSC y SSC) y posteriormente a partir del "gate" de células CD4⁺ Foxp3^{EGFP+}, se analizó la expresión de cada una de las moléculas de activación de las células T_{regs}, capturando 5000 eventos correspondientes a esta población celular. Se muestra un histograma representativo para cada una de las moléculas estudiadas y los gráficos corresponden al análisis la intensidad de fluorescencia normalizada (IMF) y al porcentaje de células que expresan cada molécula. Las gráficas muestran los datos de tres experimentos independientes, cada uno realizado con 3-4 animales por grupo. Las gráficas representan la desviación estándar (ds) y las diferencias al analizar los datos con una prueba *t* de *student*. NI= No infectado, INF= Infectado.

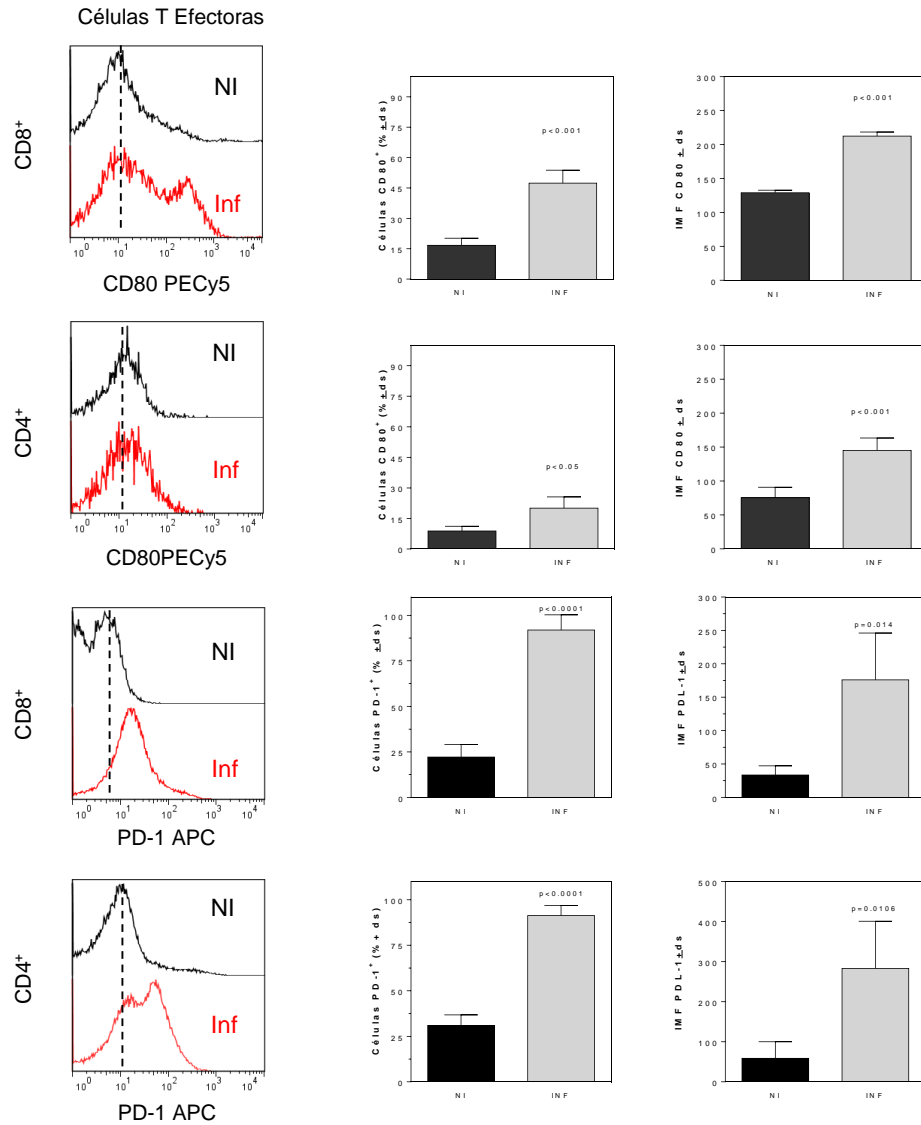


Figura 15. Análisis de la expresión de moléculas en células T involucradas en la regulación por T_{regs} durante la infección con *T. gondii*. Esplenocitos de ratones infectados obtenidos a los 7 post infección fueron teñidos con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD80 y PD-1 y analizados por FACS. La región de linfocitos fue definida por las características de tamaño y granularidad (FSC y SSC), posteriormente a partir del "gate" de células CD4⁺ o CD8⁺, se analizó la expresión de cada una de las moléculas de interés y se capturaron 10000 eventos. Se muestra un histograma representativo para cada una de las moléculas estudiadas y los gráficos corresponden al análisis la intensidad de fluorescencia normalizada (IMF) y al porcentaje de células que expresan cada molécula. Las gráficas muestran los datos de tres experimentos independientes, cada uno realizado con 3-4 animales por grupo. Las gráficas representan la desviación estándar (ds) y las diferencias al analizar los datos con una prueba *t* de *student*. NI= No Infectado, Inf= Infectado.

CAPÍTULO 3. Análisis de los mecanismos de supresión de las T_{regs} durante la infección

Se ha reportado que las células T_{regs} emplean múltiples mecanismos por medio de los cuales suprimen la respuesta de las células T, ya sea actuando directamente sobre las células T o bien modulando la actividad de células accesorias (156,157). Se sabe que los mecanismos mediados por CD25, CTLA-4 y PDL-1 dependen de la interacción entre las células T y las células T_{regs}, a excepción de los mecanismos mediados por CTLA-4 o PDL-1, ya que estas moléculas en T_{regs} puede interaccionar respectivamente con CD80 o PD-1 de células accesorias o de células T, modulando la maduración, la activación y proliferación (158,161,162).

Para evaluar la participación de las células accesorias en la supresión mediada por células T_{regs} y explorar los mecanismos de supresión dependientes de la interacción entre células T_{regs} y T_{efec}, se realizaron en ensayos de proliferación en cultivos libres de células accesorias. Para este fin, primero se purificaron de linfocitos T por “*cell sorting*” (Fig. 10) y se estandarizaron las condiciones óptimas para evaluar la proliferación estimulado con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Fig. 16).

La obtención de linfocitos T libres de células accesorias se realizó por “*cell sorting*” seleccionando a las células T de acuerdo a expresión del antígeno Thy (Fig. 10). En todas las purificaciones realizadas para este trabajo, la pureza de los linfocitos después de la separación fue mayor al 94%.

A) Estrategia para inducir la proliferación de linfocitos T purificados

Se sabe que los linfocitos T libres de células accesorias requieren de un conjunto de estímulos para activarse *in vitro* (163), por lo que utilizar sólo el anticuerpo anti-CD3 o Con A no es un estímulo suficiente. Reportes han descrito que la combinación de anticuerpos como anti-CD3 y anti-CD28, brindan las señales necesarias para inducir la proliferación de células T purificadas. Por lo tanto, para determinar las concentraciones óptimas de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 para estimular linfocitos purificados se probaron diferentes concentraciones de anticuerpos solubles. Observamos que con todas las combinaciones de anticuerpos anti-CD3 en combinación con el anticuerpo anti-CD28, las células presentan cinco divisiones celulares con gran intensidad sin diferencias entre sí (Fig. 16 A). Por lo tanto se decidió probar concentraciones menores de

anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Fig. 16 B). De acuerdo a nuestros resultados las concentraciones óptimas de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 para estimular linfocitos T puros son 3.0 µg/mL y 0.1 µg/mL respectivamente, ya que esta combinación estimula eficientemente la proliferación, por lo cual estas concentraciones fueron las utilizadas para todos los ensayos de proliferación de linfocitos T purificados.

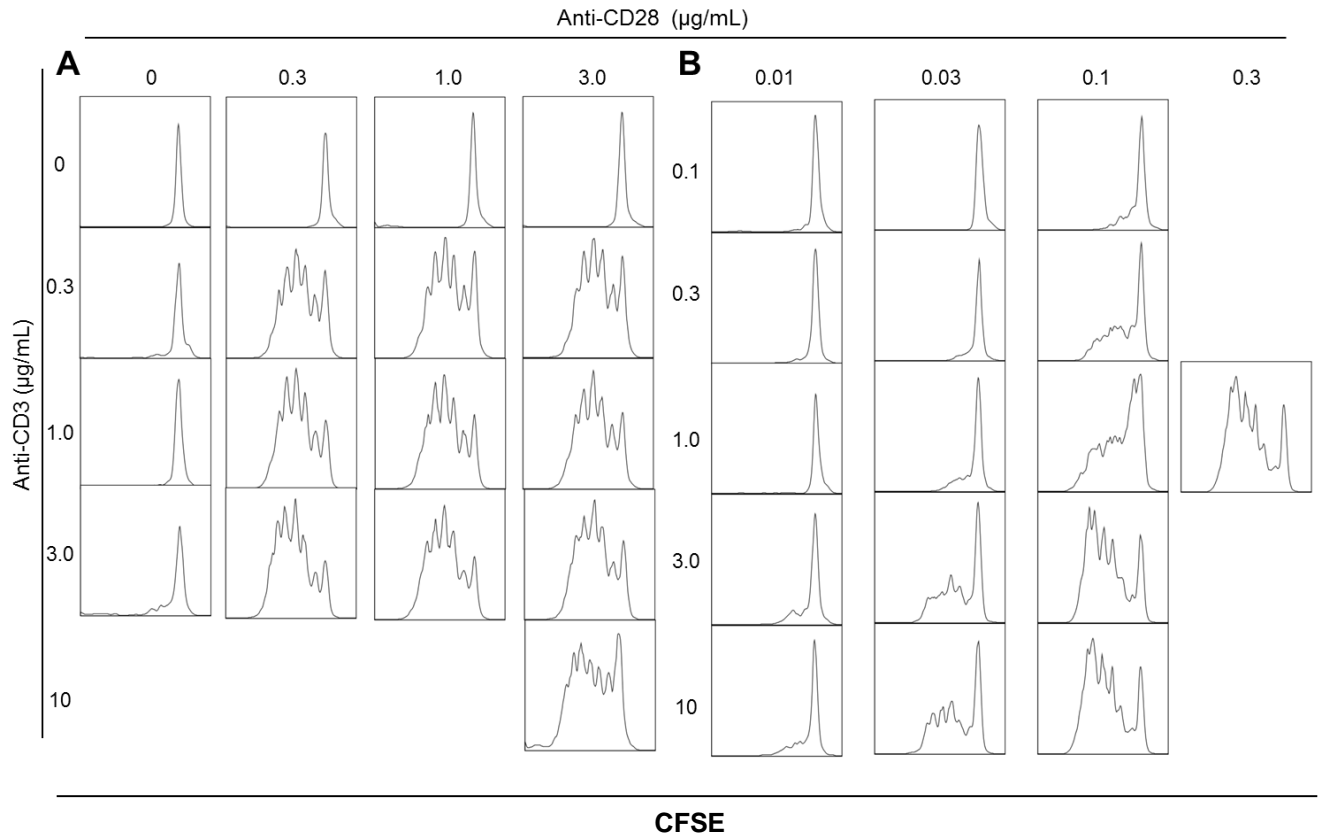


Figura 16. Estandarización de las concentraciones de anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 para estimular la proliferación de linfocitos T purificados. Linfocitos T purificados de esplenocitos de ratones no infectados fueron teñidos con CFSE, estimulados, cosechados a las 72 horas y analizados por FACS, tal como se ha descrito previamente. En el panel A se muestra que no hay diferencia entre la proliferación de linfocitos T purificados estimulados con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. En el panel B se muestran los histogramas de la proliferación de linfocitos T purificados y estimulados con concentraciones menores de anticuerpos a las que fueron probadas en el panel A.

B) Análisis de la participación de las células accesorias en la supresión de T durante la infección con *T. gondii*

Los linfocitos T libres de células accesorias de ratones infectados fueron estimulados *in vitro* con los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 y como control se estimularon células de bazo estimuladas con el anticuerpo anti-CD3 (Fig. 17 A-B). Como era de esperarse las células T de esplenocitos de ratones infectados tienen una marcada supresión de la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺, dicho resultado concuerda con nuestro estudio previo en donde se estimula con Con A (69). El análisis de la proliferación de células T libres de células accesorias muestra una disminución en la proliferación de las células T tanto de la población CD4⁺ como CD8⁺. El análisis de diferentes experimentos muestra que el porcentaje de proliferación de las células CD4⁺ se redujo de 72% a 47% en los ratones infectados, y del 70% a 58% en para el caso de las células CD8⁺ (Fig. 17B). Estos resultados sugieren que la supresión de la proliferación de células T por células T_{regs} en nuestro modelo es independiente de las células accesorias.

A partir de los ensayos de proliferación de células purificadas y células de bazo (Fig. 17), se calcularon y compararon los porcentajes de supresión, para estimar si la presencia de células accesorias contribuye a la supresión de la proliferación de las células T. Cuando se compararon estos porcentajes se observaron niveles similares de supresión para los cultivos de esplenocitos y células T libres de células accesorias (Fig. 18), reforzando la hipótesis de que las células accesorias pueden ser prescindibles en la supresión de la proliferación mediada por células T_{regs} en un modelo *in vitro*.

En conjunto estos resultados muestran que en ausencia de células accesorias la supresión de la proliferación persiste, apuntando a las células T_{regs} como responsables directas de la supresión de células T *in vitro*.

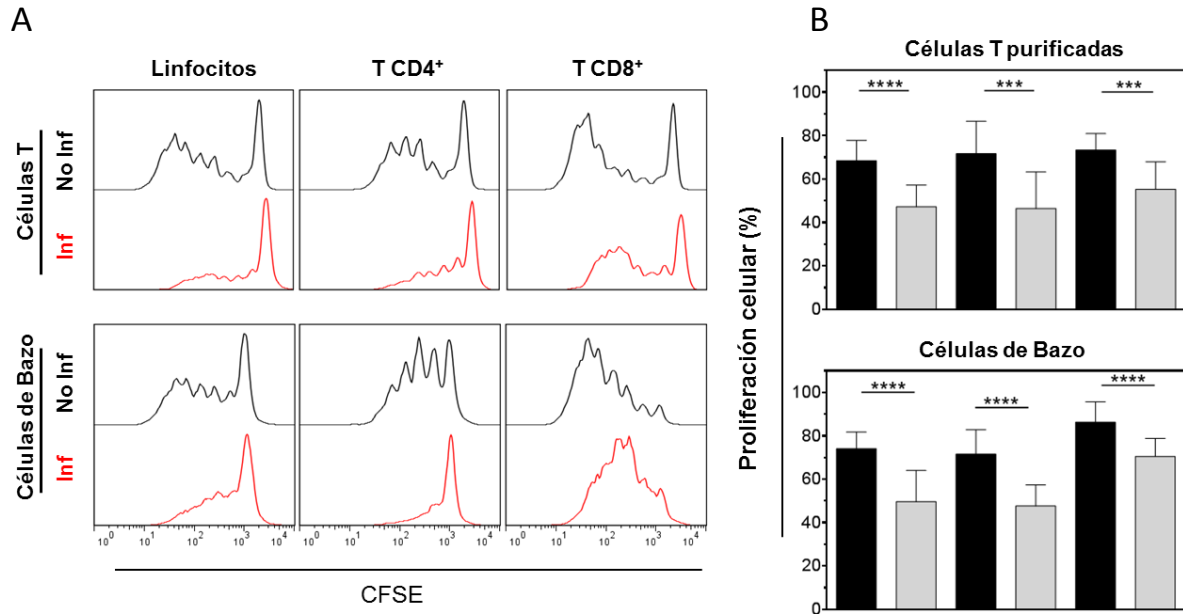


Figura 17. Las APC no participan en la supresión de células T *in vitro*. Linfocitos T purificados y esplenocitos de ratones infectados y no infectados fueron teñidos con CFSE, estimulados, cosechados a las 72 horas, teñidos con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 y analizados por FACS, tal como se ha descrito previamente. **A)** Histogramas representativos de ensayos de proliferación de linfocitos T purificados y de células de bazo. **B)** Análisis del porcentaje de proliferación de seis experimentos independientes. Los datos se analizaron utilizando una prueba de ANOVA de una vía y Bonferroni. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. (Barra negra) Células de ratones no infectados, (Barra gris) Células de ratones infectados.

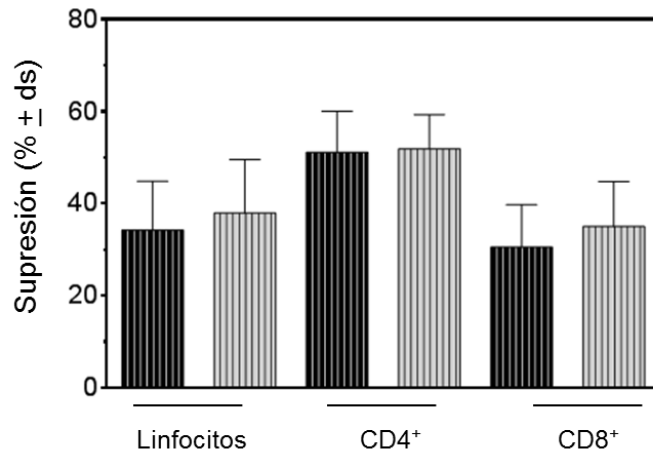


Figura 18. La supresión de células T de ratones infectados tiene una intensidad similar en presencia o ausencia de APC. Reanálisis de los datos de la Figura 17, muestran que al comparar los porcentajes de supresión del sistema de células T purificadas contra el sistema de células de bazo de ratones infectados no hay diferencias. Los datos se analizaron utilizando una prueba de ANOVA de una vía y Bonferroni. Células de bazo de ratones infectados (Barras con líneas negras); Células T purificadas de ratones infectados (Barras con líneas gris).

Para confirmar que las células T_{regs} son capaces de suprimir la proliferación de células T en presencia o en ausencia de células accesorias, se realizaron ensayos de proliferación con cultivos de células de donde se eliminó selectivamente por “cell sorting” a las células T_{regs}. Las células de bazo libres de T_{regs} se estimularon con el anticuerpo anti-CD3 y linfocitos T libres de células accesorias y de células T_{regs} se estimularon con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, tal como se ha descrito en la metodología. En cultivos de esplenocitos y de linfocitos T purificados de ratones infectados en donde están presentes las células T_{regs}, podemos observar que existe una fuerte supresión de la proliferación (Fig. 19); mientras que en los cultivos libres de células T_{regs} observamos una restauración de la proliferación a niveles cercanos a las células de ratones no infectados (Fig. 19). Estos datos muestran que las células T_{regs} son capaces de suprimir la proliferación de células T en presencia o ausencia de células accesorias con una magnitud similar, demostrando que las células T_{regs} ejercen su mecanismo de supresión directamente sobre las células T efectoras, prescindiendo de la presencia de las células accesorias.

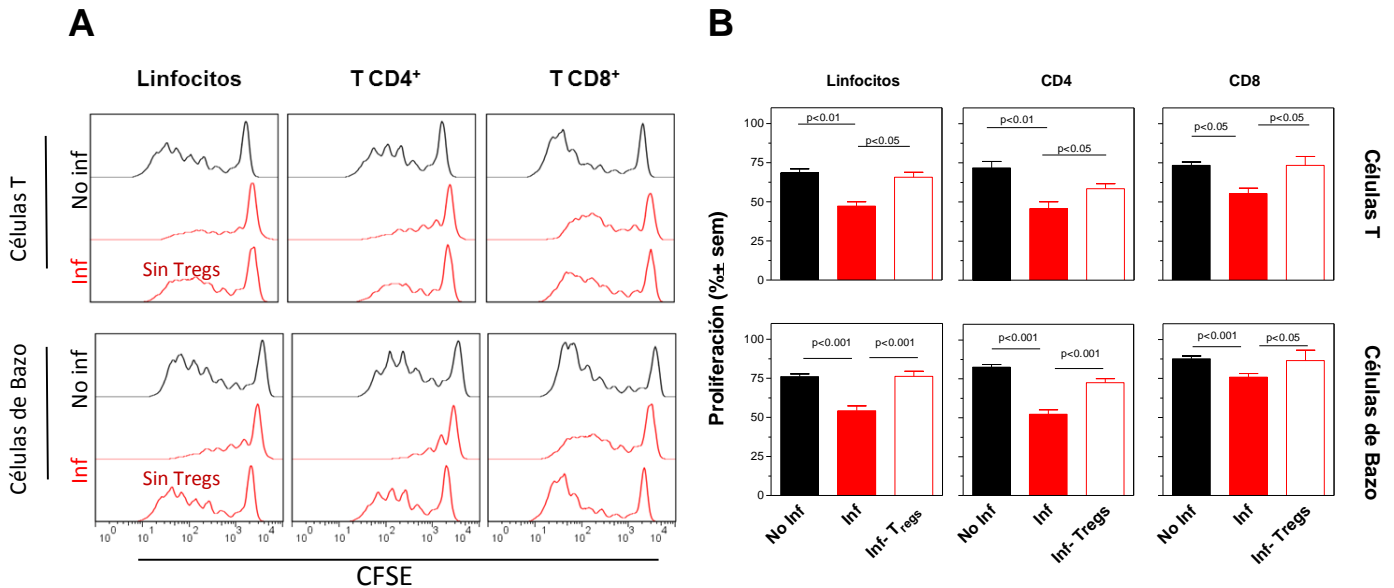


Figura 19. Las células T_{regs} inducen supresión de la proliferación en presencia o ausencia de APC's. Después de 7 dpi, se tiñeron con CFSE y estimularon células T purificadas y esplenocitos libres de T_{regs}. A las 72 horas se cosecharon las células, se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 y se analizaron por FACS, tal como se ha descrito previamente. **A)** Histogramas representativos de la proliferación de células de ratones no infectados (Líneas y barras negras) e infectados (Líneas y barras rojas), en donde se observa que al eliminar las células T_{regs} del cultivo de células de ratones infectados, se restaura la proliferación. **B)** Comparación de la proliferación de células T en presencia (■) y ausencia de células T_{regs} (□) en un sistema de células T purificadas y en bazo. Los datos se analizaron utilizando una prueba de ANOVA de una vía y Bonferroni.

C) Evaluación de la participación de CTLA-4/CD80 en la supresión de la proliferación

Al demostrar que las células T_{regs} podían suprimir la proliferación de células T en ausencia de células accesorias, exploramos simultáneamente los mecanismos de acción que involucran la expresión de CTLA-4, CD25 y PDL-1 en células T_{regs} ya que estos mecanismos de acción sólo dependen de la interacción célula T_{regs}-T_{efec}.

Se ha reportado que CTLA-4 pertenece a la familia de moléculas co-estimuladoras o inhibitoras de CD28, que se expresa constitutivamente en células T_{regs} y en células T_{efec} se induce su expresión después la activación. La unión de CTLA-4 a su ligando B7-1/B7-2 (CD80/CD86) en células dendríticas o en linfocitos T desencadena una serie de eventos que culminan en la supresión de la proliferación o en la inducción de anergia (158,164). En linfocitos T, CTLA-4 induce una señal inhibitoria que conduce a una menor producción de IL-2 y por lo tanto a una menor proliferación y anergia (143,164). Estudios para evaluar el papel de CTLA-4 sobre células accesorias y linfocitos T se han realizado bloqueando esta molécula con anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 o anti- CD80/CD86 o bien utilizando ratones “*knock-out*” (143,165). El aumento que observamos en la expresión de CTLA-4 y CD80 por células T_{regs} y T_{efec} respectivamente (Fig14-15), nos condujo a explorar el efecto que causa sobre la proliferación el uso de anticuerpos bloqueadores para CTLA-4 (Fig. 20) y CD80 (Fig. 21).

Se realizaron dos ensayos independientes con linfocitos T purificados, en donde se probaron diferentes concentraciones de anticuerpos solubles y se analizó la proliferación de células T. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con el anticuerpo anti-CTLA-4 no aumenta la proliferación de linfocitos T de ratones infectados (Fig. 20). En el caso de los cultivos de células de ratones no infectados observamos una proliferación similar en ausencia o presencia del anticuerpo anti-CTLA-4, sugiriéndonos que esta molécula no está implicada en la supresión de la proliferación. Sin embargo, como se ha reportado que CTLA-4 es una molécula que continuamente se internaliza (138,165), pensamos que el bloquear esta molécula no era la mejor opción para observar cambios que impactaran significativamente en el fenómeno de supresión, por lo que decidimos bloquear a su co-receptor CD80.

Para analizar el efecto del anticuerpo bloqueador CD80, realizamos dos ensayos independientes de proliferación en donde evaluamos diferentes concentraciones de anti-CD80. Sin embargo, en ninguno de nuestros ensayos observamos que se restaurara la proliferación de linfocitos T (Fig. 21).

En conjunto nuestros resultados con anticuerpos bloqueadores no explican la supresión vía CTLA-4/CD80, lo que sugiere que ninguna de estas dos moléculas se encuentran involucradas en la supresión de la proliferación de las células T_{efec}.

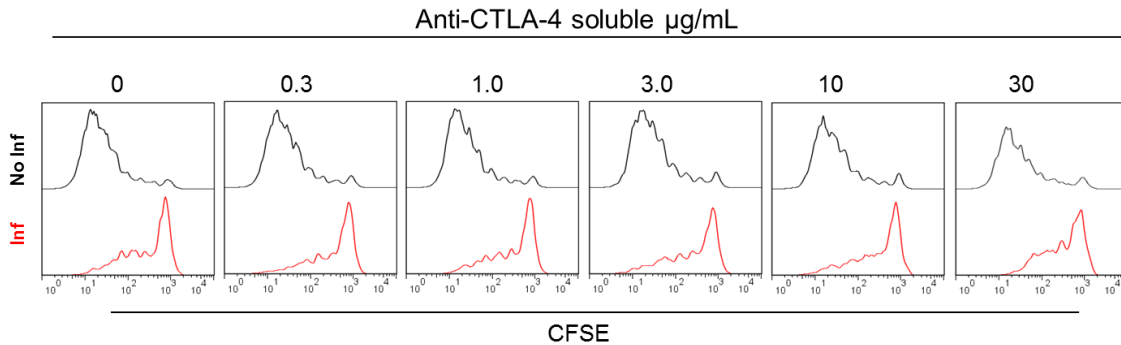


Figura 20. El bloqueo con el anticuerpo anti-CTLA-4 no revierte la supresión de la proliferación. Se purificaron células T 7dpi, se tiñeron con CFSE y estimularon en presencia o ausencia del anticuerpo anti-CTLA-4 soluble. A las 72 horas se cosecharon las células y se analizaron por FACS, tal como se ha descrito previamente. Los histogramas representativos de dos experimentos independientes muestran que no se revierte el efecto sobre la supresión de la proliferación de células de ratones infectados.

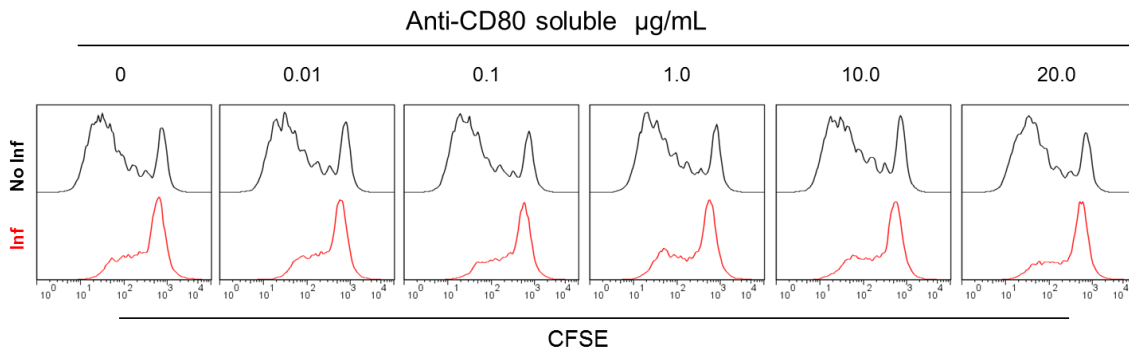


Figura 21. El bloqueo con el anticuerpo anti-CD80 no revierte la supresión. Se purificaron células T 7dpi, se tiñeron con CFSE y estimularon en presencia o ausencia del anticuerpo anti-CD80 soluble. A las 72 horas se cosecharon las células y se analizaron por FACS, tal como se ha descrito previamente. Los histogramas representativos de dos experimentos independientes muestran que no se revierte el efecto sobre la supresión de la proliferación de células de ratones infectados.

D) La anergia de linfocitos T conduce al fenómeno de inmunosupresión observado en la infección aguda con *T. gondii*

La anergia es un término que se utiliza para definir la falta de respuesta de células frente a un estímulo; ésta hipo-respuesta conduce a su vez a una disminución en la producción de IL-2 y una disminución de la proliferación (159,160,166,167). Diversos reportes describen que la anergia de células T puede ser inducida por diferentes moléculas (PDL-1, FasL, CTLA-4, superantígeno, etc.); sin embargo, independientemente de la señal que haya conducido al estado anérgico, la adición de IL-2 exógena revierte este proceso conduciendo a la reactivación y proliferación celular (159,168,169).

Como observamos previamente (Fig. 14), las células T_{regs} provenientes de ratones infectados expresan diversas moléculas que pudieron inducir el estado anérgico de las células T, causando una hipo-respuesta cuando nosotros estimulamos *in vitro*. Para analizar esta hipótesis decidimos adicionar rIL-2 a células T purificadas y analizar la proliferación. Como podemos observar la adición de rIL-2 a células T de ratones no infectados no es una señal suficiente para inducir la proliferación celular. Sin embargo, en cultivos de células T y células T efectoras de ratones infectados, la adición de rIL-2 en ausencia de la estimulación con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 induce la proliferación de linfocitos T de forma similar a los linfocitos estimulados de ratones no infectados. Estos resultados denotan que las células provenientes de ratones infectados vienen anérgicas y que sólo necesitan de rIL-2 para poder proliferar sin necesidad de ser estimuladas con anticuerpos (anti-CD3 y anti-CD28) [Fig. 22].

Como control de nuestro sistema estimulamos células T de ratones infectados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y observamos una fuerte supresión de la proliferación, la cual se revierte cuando se elimina selectivamente a las células T_{regs}. Nuestros resultados muestran que al adicionar rIL-2 a cultivos de linfocitos T de ratones infectados, en presencia o ausencia de células T_{regs}, se revierte la supresión de la proliferación de células T, lo que sugiere que en estas condiciones el IL-2 en los cultivos es suficiente para que las células anérgicas reviertan su estado y eviten la supresión mediada por las células T_{regs} a causa de la "deprivación"/competencia de IL-2 (Fig. 22).

En conjunto nuestros resultados sugieren que las células provenientes de ratones infectados vienen en un estado anérgico, ya que la rIL-2 promueve la proliferación sin necesidad de estimular con anticuerpos. Si bien es cierto que los anticuerpos promueven la activación de células T *naïve* que no han sido activadas durante la infección, éstas últimas serían capaces de producir IL-2 para promover la proliferación de células anérgicas y células activadas *in vitro* en ausencia de T_{regs}. Aun cuando queda pendiente saber que moléculas expresadas por las células T_{regs} podrían estar involucradas en la inducción de anergia de las células T durante la infección, estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis de que las células T_{regs} ejercen un mecanismo de acción dependiente de IL-2, que involucra la competencia o "deprivación" de la IL-2 con las células T efectoras. (Ver capítulo 4)

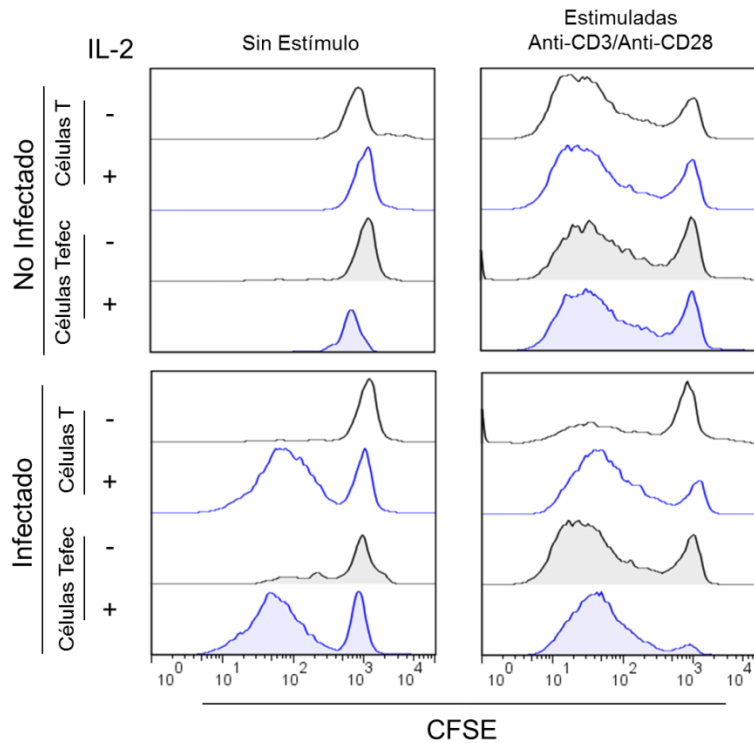


Figura 22. Las células T de ratones infectados cursan un estado de anergia durante la infección. Se purificaron células T y células T efectoras (Tefec) 7dpi, se tiñeron con CFSE y fueron expuestas a diferentes condiciones experimentales (rIL-2 y anticuerpos anti-CD3/anti-CD28). A las 72 horas se cosecharon las células y se analizaron por FACS, tal como se ha descrito previamente. Los histogramas representativos de tres experimentos independientes muestran que se revierte totalmente la supresión de la proliferación de células T de ratones infectados, cuando se elimina selectivamente a las células T_{regs} o cuando se adiciona rIL-2 al medio.

CAPÍTULO 4. Resumen de hallazgos publicados en el artículo: T cell-suppression in vitro during *Toxoplasma gondii* infection is the result of IL-2 competition between Tregs and T cells leading to death of proliferating T cells

Salinas N, Olgúin JE, Castellanos C, Saavedra R. Scand J Immunol. 2013 Oct 5. doi: 10.1111/sji.12120.

Como se mencionó anteriormente, no se ha demostrado en su totalidad los mecanismos de acción ejercidos por las células T_{regs} durante la supresión de la proliferación en la fase aguda de la infección con *T. gondii*. Con el objetivo de determinar si las células T_{regs} son capaces de suprimir directamente la proliferación de las células T, infectamos ratones transgénicos FoxP3^{EGFP}, purificamos células T y evaluamos la proliferación. Nuestros resultados muestran que en ausencia de células accesorias la supresión de la proliferación persiste, lo que sugiere que las células T_{regs} pueden prescindir de las células accesorias para inhibir la proliferación de

las células T. Corroboramos esta teoría, eliminando selectivamente a las células T_{regs}; observamos que la supresión de la proliferación de células se revierte en ausencia de células T_{regs}, demostrando que las células T_{regs} pueden suprimir directamente a las células T inhibiendo su proliferación (155).

Dado los antecedentes de anergia en células T (Capítulo 3), sobreexpresión de CD25 en células T_{regs} (Capítulo 2 (69)) y los bajos niveles de IL-2 (41,60,63,68,69,75), exploramos los mecanismos dependientes de IL-2 en cultivos libres de células accesorias. Encontramos y describimos el papel que juega la IL-2 entre las células T_{regs} y las células T, así como su impacto en la “inmunosupresión”. Cuando utilizamos ratones transgénicos Foxp3^{EGFP} y purificamos exclusivamente células T, eliminando selectivamente a las células T_{regs}, observamos que en los cultivos de células T puras de ratones infectados, la producción de IL-2 está totalmente inhibida; mientras que en los cultivos de células T, sin T_{regs} los niveles de IL-2 se recuperan, sugiriendo que las células T_{regs} suprimen directamente las células T por un mecanismo dependiente de IL-2 en donde solo participan las células T y las células T_{regs}. Posteriormente demostramos que las células T_{regs} requieren de cierta cercanía para ejercer supresión sobre las células T, ya que al co-cultivar células T y células T_{regs} observamos una fuerte supresión de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de ratones infectados, la cual se revierte cuando separamos las dos poblaciones celulares mediante el uso de placas “*Transwell*”. Por otro lado también demostramos los niveles de IL-2 producidos en los cocultivos, aumentan cuando las células T están separadas de las células T_{regs}. Mediante un bioensayo de IL-2, estudiamos la capacidad e las células T_{regs} para competir por la IL-2 con células T (CTLL-2), demostrando que las células T_{regs} de ratones infectados compiten eficientemente por esta citocina. Por otro lado observamos que la falta de IL-2 conduce a la apoptosis de células T CD4⁺ como CD8⁺ proliferantes, es decir, las células T que pudieron activarse y dividirse un par de veces, pero al haber cantidades limitantes de IL-2 que consumen tanto las células T como las células T_{regs}, terminan conduciendo a la muerte de las células T. Observamos que al adicionar rIL-2 en los cultivos, se restaura totalmente la proliferación de células T e inhibe la apoptosis de las células de ratones infectados. Como conclusión general de esta publicación, se demostró que *in vitro* las células T_{regs} de ratones infectados con *T gondii* ejercen un mecanismo de acción que conduce a la muerte de células proliferantes, en donde las células T_{regs}-T_{efec} compiten por las cantidades limitantes de IL-2.

T cell Suppression *In Vitro* During *Toxoplasma gondii* Infection is the Result of IL-2 Competition Between Tregs and T cells Leading to Death of Proliferating T cells

N. Salinas, J. E. Olguín, C. Castellanos Et R. Saavedra

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

Received 12 August 2013; Accepted in revised form 26 September 2013

Correspondence to: R. Saavedra, PhD, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70228, Ciudad Universitaria, CP 04510, México City, México. E-mail: saavedra@unam.mx

Abstract

A reduced proliferation to T cell mitogens is observed *in vitro* in murine cells isolated during the acute phase of *Toxoplasma gondii* infection. Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) mediate this suppression, which is interleukin (IL)-2 dependent. In this work, we analysed the mechanism of this Treg-mediated suppression. We found that removal of antigen-presenting cells (APC) from spleen cells from infected mice did not modify suppression but further elimination of Tregs led to a restored proliferation, demonstrating that Tregs mediate suppression in the absence of APC. Production of IL-2 by T cells from infected animals was abolished but partially restored when Tregs were removed. However, IL-2 levels and T cell proliferation were restored when Tregs and T cells were separated by transwells, indicating that Tregs require close proximity with T cells to induce suppression. Tregs from infected mice were able to reduce proliferation of CTLL-2 cells in the classical IL-2 bioassay, strongly suggesting that Tregs compete with T cells for IL-2. We found that T cells from infected mice died after a few rounds of division *in vitro*, but addition of recombinant IL-2 or removal of Tregs abolished this effect. Our results showed that suppression of T cell proliferation during acute *Toxoplasma gondii* infection is the result of death of proliferating T cells by Treg-mediated IL-2 competition. Thus, immunosuppression is due to death of proliferating T cells as a consequence of low IL-2 availability.

Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite widely distributed and the aetiological agent of toxoplasmosis. Although the infection is generally clinically asymptomatic in most immunocompetent individuals, toxoplasmosis can lead to severe complications in immunocompromised patients and in pregnant women [1]. In immunodeficient individuals, reactivation of *T. gondii* may occur during chronic infection, leading to encephalitis and death [2]. In pregnant women, primary infection may lead to abortion, neonatal malformations or defects that appear during child development [2–4].

Toxoplasma gondii induces a potent cellular immune response that is essential for control of infection [3, 5, 6]. Full protection against the parasite requires production of interleukin (IL)-12 by dendritic cells (DC), interferon- γ (IFN- γ) secreted by natural killer (NK) and T cells, and synergy between CD4⁺ and CD8⁺ T cells [4, 6–9]. Thus,

protection against *T. gondii* is achieved by a strong T_{H1} immune response [4, 6].

A transient reduction in T cell proliferation in response to mitogens and parasite antigens is detected *in vitro* in mice and humans during the acute infection [10–20]. It was reported that macrophages were partially involved in this immunosuppression [10, 11, 14], although T cells were also reported to be implicated [11]. Several studies reported that reactive nitrogen intermediates (RNIs) and IL-10 mediated the process [10, 12–15], but later reports showed that cells from infected interferon regulatory factor-1 (IRF-1) knockout and IL-10 knockout mice were also suppressed, thus failing to demonstrate a role of these molecules [21, 22]. The suppression has also been associated with low IL-2 production by T cells during the acute infection [11, 12, 14, 16, 19]. However, addition of recombinant IL-2 (rIL-2) partially restored proliferation in some cases [11, 19], but not in others [12, 20].

Tregs are a subset of CD4⁺ T lymphocytes that are essential for immune homeostasis by maintaining self-tolerance [23–25], but they are also involved in immunity against tumours, tissue transplants, suppression of allergy and asthma, and regulation of pathogen-induced immunopathology [23, 26, 27]. Tregs constitutively express the Treg-specific transcription factor Foxp3, which is required for their development and for the suppressive function [28, 29]. These cells also express high levels of the IL-2 receptor (CD25) [24], cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) [30] and glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor (GITR) [31]. Several mechanisms of Treg-mediated suppression have been described both *in vivo* and *in vitro* [32–35], including the direct suppression of T cell proliferation or suppression of the function of the antigen-presenting cells (APC), and thus indirectly blocking T cell activation [32, 36, 37].

Infection with *T. gondii* leads to a transitory reduction in Tregs number during the acute phase in mice [16, 38–40] that is a consequence of low IL-2 production by pathogen-specific effector T cells [38, 39]. We have recently reported that despite the reduction in Tregs number, the remaining Tregs display an activated phenotype and an increased suppressive capacity [16]. Moreover, we found that these Tregs mediate the suppression of T cell proliferation independently of IL-10 by an IL-2-related mechanism [16]. In this work, we further analysed the mechanisms of Tregs-mediated suppression of T cell proliferation during the acute *T. gondii* infection in C57BL/6J mice and the fate of T cells lacking IL-2. We found that reduction in proliferation of T cells from infected mice is not due to a failure of T cells to proliferate but rather to a competition of low IL-2 levels between Tregs and T cells, leading to death of proliferating T cells *in vitro*, by a lack of IL-2.

Materials and methods

Mice. Six eight-week-old female wild-type C57BL/6J (WT) and Swiss-Webster mice were bred in our animal house and maintained in microisolator cages according to institutional guidelines. Foxp3^{EGFP} knock-in mice (B6.C-g-Foxp3tm2Tch/J), co-expressing Foxp3 and the enhanced green fluorescent protein (EGFP) were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and maintained under the same conditions in our animal house. In some cases, male mice were used, but all experiments were carried out with age- and sex-matched mice. Animal experimentation protocols were approved by the local Bioethics Committee for Animal Research.

Parasites and infection. The ME49 strain of *T. gondii* was maintained in Swiss-Webster mice as described previously [41, 42]. Mice were orally infected with 50 cysts as described elsewhere [16, 42], and spleen cells were obtained 7 days post infection.

Monoclonal antibodies (mAbs). Anti-CD4-PerCP (GK1.5), anti-Thy1.2-PE (30-H12), anti-CD25-PE/Cy7 (PC61) and anti-CD3-PE (145-2C11) were from Biologend (San Diego, CA, USA); anti-CD8-Alexa 647 (5H10) was from Caltag (Burlingame, CA, USA); anti-CD28 mAb (37.51) was from eBioscience (San Diego, CA, USA). The anti-CD3 mAb (145-2C11) was obtained from ammonium sulphate precipitation from the hybridoma supernatant as described previously [42].

Immunofluorescence and flow cytometry. Splenocytes were obtained by perfusion and erythrocytes were eliminated with hypotonic NH₄Cl solution. Immunofluorescence was carried out by incubation of cells (10⁷ cells/ml) with the indicated mAbs in washing buffer (Dulbecco's phosphate-buffered saline [DPBS], 1% foetal calf serum [FCS], 0.1% sodium azide) for 30 min (4 °C, in the dark). Cells were washed twice, resuspended in DPBS and analysed by flow cytometry. For determination of cell viability in some experiments, cells were incubated after immunofluorescence with 20 µg/ml of 7-amino-actinomycin D (7-AAD, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), as previously described [43]. Cells were acquired using a FACScalibur or FACS Aria cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Lymphocytes were identified by forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) characteristics, gated and further analysed. Detailed analysis of each experiment is indicated in figure legends. Data were analysed using the FLOWJO software V.5.7.2 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Cell sorting. Splenocytes from WT or Foxp3^{EGFP} mice were used to purify T cells and/or Treg-free T cells. For T cell and Treg-free T cell purification, spleen cells were stained with anti-Thy1.2-PE mAb and sorted. T cells and Treg-free T cells were sorted using the Thy1.2⁺ and Thy1.2⁺Foxp3^{EGFP} gates, respectively. For Tregs purification, CD4⁺ cells were first enriched from splenocytes by positive selection using anti-CD4 microbeads, following the instructions provided by the manufacturer (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). The CD4⁺ fraction was further stained with anti-Thy1.2-PE mAb, and the Thy1.2⁺Foxp3^{EGFP} cells were sorted and used as Tregs. For some experiments, Tregs (Foxp3^{EGFP}) were eliminated from spleen cells by sorting. All sortings were carried out in a FACS Aria and cells were used immediately. Purity of cells was always > 95%.

5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) staining. CFSE (Molecular Probes) staining was carried out as described previously [16]. Briefly, purified T cells or splenocytes were stained with 2.5 µM CFSE in DPBS (5 × 10⁷ cells/ml, 5 min, room temperature, in the dark) with occasional stirring. Staining was stopped by addition of five volumes of DPBS containing 10% FCS; cells were centrifuged (5 min, 490 g), resuspended in complete RPMI medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 25 mM HEPES, 50 µM 2-mercaptoethanol and 50 IU/ml penicillin-streptomycin) and used immediately.

Proliferation assay. CFSE-stained T cells (5×10^5 cells/ml) in 2 ml of complete medium were stimulated with soluble anti-CD3 (3 μ g/ml) and anti-CD28 mAbs (0.1 μ g/ml) in each well of a 24-well plate (Costar, Corning, NY, USA) as described previously [44]. CFSE-stained spleen cells (5×10^5 cells/ml) in 2 ml of complete medium were stimulated with plate-bound anti-CD3 mAb (10 μ g/ml) in each well of a 24-well plate. In some experiments, murine rIL-2 (10 U/ml, Roche) was added at the beginning of the culture. Seventy-two hours later, cells were washed twice with buffer (1% FCS in DPBS), stained with anti-CD4 or anti-CD8 mAbs as described above and analysed immediately by flow cytometry.

Transwell experiments. Transwell experiments were carried out in 24-well plates using CFSE-stained Tregs-free T cells (5×10^5 cells/ml) and anti-CD3 (3 μ g/ml) and anti-CD28 mAbs (0.1 μ g/ml), in the presence or absence of a 1:3 ratio of Tregs cells in the Transwell (0.4 μ m pore, Costar), in 2 ml of complete medium. Cells were harvested 72 h later, stained with anti-CD4 or anti-CD8 mAbs as described above and analysed by flow cytometry. In some experiments, supernatants were collected 24 h post-stimulation for IL-2 determination.

Bioassay for analysis of IL-2 competition. The IL-2 bioassay described by Gillis *et al.* [45] using the CTLL-2 cells and rIL-2 was used with some modifications to determine competition for IL-2 between Tregs and T cells. Briefly, CTLL-2 cells (10^4 cells/well) were cultured with or without Tregs (1:0, 1:10, 1:3, 1:1 ratio) in a final volume of 200 μ l in triplicate wells of a 96-well flat-bottom plate (Costar), containing serial dilutions of rIL-2 (Roche, Indianapolis, IN, USA) and cultured for 48 h. Cells were pulsed with 0.5 μ Ci of [³H]-thymidine (45 Ci/mmol, Amersham, Uppsala, Sweden) for the last 18 h and were harvested onto glass-fibre filters using an automatic cell harvester (Skatron, Sterling, VA, USA). Radioactivity uptake was measured by scintillation spectroscopy as described [16].

IL-2 determination. IL-2 quantification was carried out by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), following the manufacturer's instructions (Biolegend). The detection limit of the assay was 3.9 pg/ml.

Statistical analysis. Statistical differences between groups were determined by the unpaired two-tailed Student's *t*-test, one-way or two-way ANOVA with Dunnett's or Bonferroni's multiple comparison tests using the PRISM 5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Results

Tregs from *T. gondii*-infected mice suppress T cell proliferation *in vitro* by an IL-2-dependent mechanism in the absence of APC

It has been shown that Tregs suppress T cell proliferation either indirectly by modulation of APC functions or directly on T cells [32]. We first analysed if APC were

essential in the Treg-mediated suppression of T cell proliferation during acute *T. gondii* infection. To this end, spleen T cells were purified by cell sorting from Foxp3^{EGFP} mice (Fig. 1A), and proliferation of the APC-free T cell population was analysed through CFSE dilution. As shown in Fig. 1B, we detected a reduction in proliferation of ungated T cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells from infected mice when compared with cells from uninfected animals. Results from five different experiments showed that this reduction was statistically significant

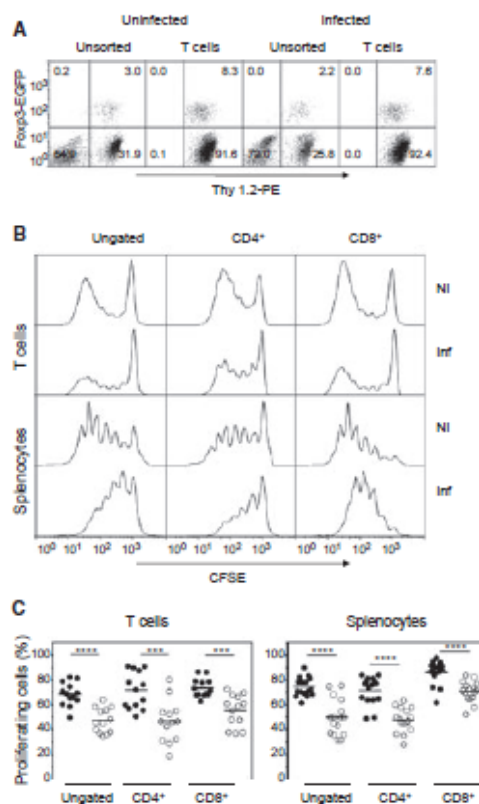


Figure 1 APC are not involved in the Tregs-mediated suppression of T cell proliferation during *T. gondii* infection. Splenocytes from uninfected (NI) or infected (Inf) Foxp3^{EGFP} mice were stained with anti-Thy1.2 mAb and T cells (Thy1.2⁺) were purified by cell sorting. Cells were stained with CFSE and stimulated with either anti-CD3/anti-CD28 (for T cells) or plate-bound anti-CD3 mAbs (for spleen cells) for 72 h. Afterwards, cells were stained with anti-CD4 and anti-CD8 mAbs and immediately analysed by flow cytometry. The lymphocyte gate was defined by FSC and SSC characteristics, further subgates of the CD4⁺ and CD8⁺ were carried out and 10,000 events of each subpopulation were captured. (A) Purity of the sorted populations according to Thy1.2 and Foxp3 expression. (B) Representative analysis of proliferation by CFSE dilution for each gate. (C) Results of five independent experiments with four mice per group expressed as percentage of proliferating cells from uninfected (●) and infected (○) mice are shown. Statistical significance as compared to controls were ****P* < 0.001 or *****P* < 0.0001 using one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test.

(Fig. 1C). As a positive control, we assessed the proliferation of unsorted splenocytes from the same mice, and we found a reduction in proliferation when T cells were stimulated, as expected (Fig. 1C). Thus, suppression of T cell proliferation is also detected in the absence of APC.

Next, we analysed if Tregs were responsible for the T cell suppression in the APC-free system. To this end, Tregs were eliminated during the purification of the T cells (Fig. 2A), and T cell proliferation was analysed. As can be observed in a representative flow cytometry analysis (Fig. 2B), proliferation of T cells from infected mice was reduced when compared to T cells from uninfected mice. Removal of Tregs from T cells of infected animals, however, led to a recovery of T cell proliferation to levels similar to those observed in T cells from uninfected mice; a similar pattern was observed when CD4⁺ and CD8⁺ cells were analysed (Fig. 2B). Analysis of several experiments showed that proliferation of Treg-free T cells from infected mice was restored to levels similar to those observed in T cells from uninfected animals (Fig. 2C); elimination of Tregs has no effect in proliferation of T cells from the latter. It should be noted that proliferation of CD4⁺ T cells from infected mice in the absence of Tregs was slightly lower than proliferation of CD4⁺ T cells from uninfected mice. Our results thus demonstrate that Tregs from

infected animals are able to directly suppress proliferation of T cells *in vitro*.

The suppression of T cell proliferation in *T. gondii*-infected mice has been associated with low IL-2 levels in splenocytes cultures [11, 12, 16]. Hence, IL-2 was determined in supernatants of the experiments depicted in Fig. 2C. As can be observed in Fig. 2D, we found undetectable IL-2 levels in supernatants of T cells from infected mice, as expected, that were significantly increased when Tregs were eliminated; IL-2 levels, however, were not restored to the levels observed in uninfected animals (Fig. 2D). Elimination of Tregs from T cells from uninfected mice slightly increased IL-2 levels, although it was statistically non-significant (Fig. 2D). All these results thus strongly suggested that Tregs consume the low IL-2 levels produced by T cells from infected mice and suggested that competition for the low IL-2 levels between both T cells and Tregs would be responsible for the suppression of T cell proliferation.

As it has been reported that IL-2 competition by Tregs depends strongly on the local cytokine concentration and the proximity between Tregs and T cells [46, 47], we analysed if Tregs-mediated suppression of T cell proliferation required close proximity. To this end, we carried out suppression assays using Tregs-free T cells and Tregs at a

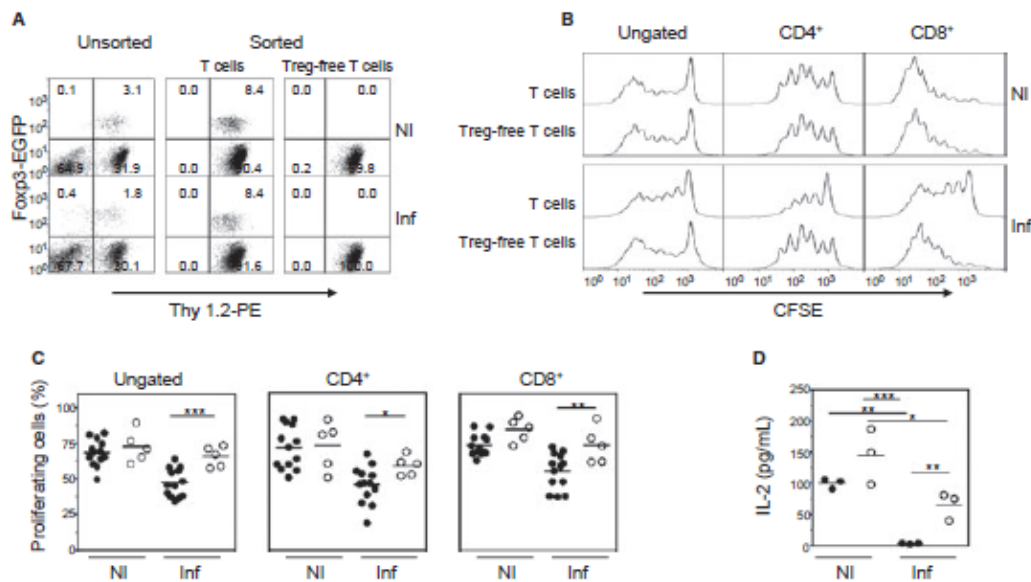


Figure 2 Tregs suppress T cell proliferation by an IL-2-dependent mechanism. Splenocytes from Foxp3^{EGFP} mice were stained with anti-Thy1.2 mAb, and T cells (Thy1.2⁺) or Treg-free T cells (Thy1.2⁺Foxp3⁻) were purified by cell sorting. T cells and Treg-free T cells were stained with CFSE and stimulated as described in Fig. 1. Cells were stained with anti-CD4 and anti-CD8 mAbs and analysed by flow cytometry. (A) Representative analysis of the purity of the sorted populations from uninfected (NI) or infected (Inf) mice according to Foxp3 and Thy1.2 expression. (B) Representative histograms of proliferation of T cells and Treg-free T cells from each gate. (C) Results from three independent experiments with four mice per group are expressed as percentage of proliferating cells from T cells (●) and Treg-free T cells (○). (D) Culture supernatants from some experiments from (C) were collected 24 h after stimulation and IL-2 levels were determined by ELISA. Data were analysed using one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

3:1 ratio using transwells (Fig. 3), and IL-2 levels were analysed on supernatants. As shown in Fig. 3B, IL-2 levels were abolished when Tregs were added to Treg-free T cells, either from infected or uninfected mice. However, when Tregs and Treg-free T cells were separated by transwells, IL-2 levels were completely restored in cells from infected animals, but only partially restored in cells from uninfected mice. Proliferation of T cells from uninfected mice was suppressed by Tregs from the same animals when they were incubated either unseparated or separated (Fig. 3C,D). In contrast, Tregs from infected mice also suppressed T cell proliferation from the same animals when they were cultured unseparated, but proliferation was restored when the two cell subsets were cultured in transwells (Fig. 3C, D), demonstrating that suppression of T cell proliferation by Tregs from infected mice required close proximity. The resulting analysis of four experiments (Fig. 3D) showed that percentage of proliferating cells was restored when Tregs and Treg-free T cells, either CD4⁺ or CD8⁺, were cultured in transwells. Furthermore, levels of proliferation were similar between Treg-free T cells from uninfected and infected animals. All these results strongly suggested that

suppression of T cell proliferation *in vitro* during *T. gondii* infection is carried out by Tregs by competition for IL-2, a mechanism requiring proximity between both cell subsets.

Tregs from *T. gondii*-infected mice compete with T cells for IL-2

We studied whether Tregs from infected mice could carry out competition for IL-2 with T cells. We indirectly studied this possibility using the standard bioassay for IL-2 quantification using CTLL-2 cells [45]. As Tregs do not proliferate under these conditions *in vitro* [48], any change in [³H]-thymidine incorporation would reflect the IL-2 concentration available to CTLL-2 cells. We carried out a standard curve using increasing concentrations of rIL-2, and proliferation of CTLL-2 cells was determined in the presence of different numbers of Tregs isolated either from infected or uninfected mice. Results obtained from two independent experiments (Fig. 4A,B) showed that the standard dose-response curve of CTLL-2 proliferation remained nearly unchanged when Tregs from uninfected mice were added at different ratios. In contrast, when Tregs

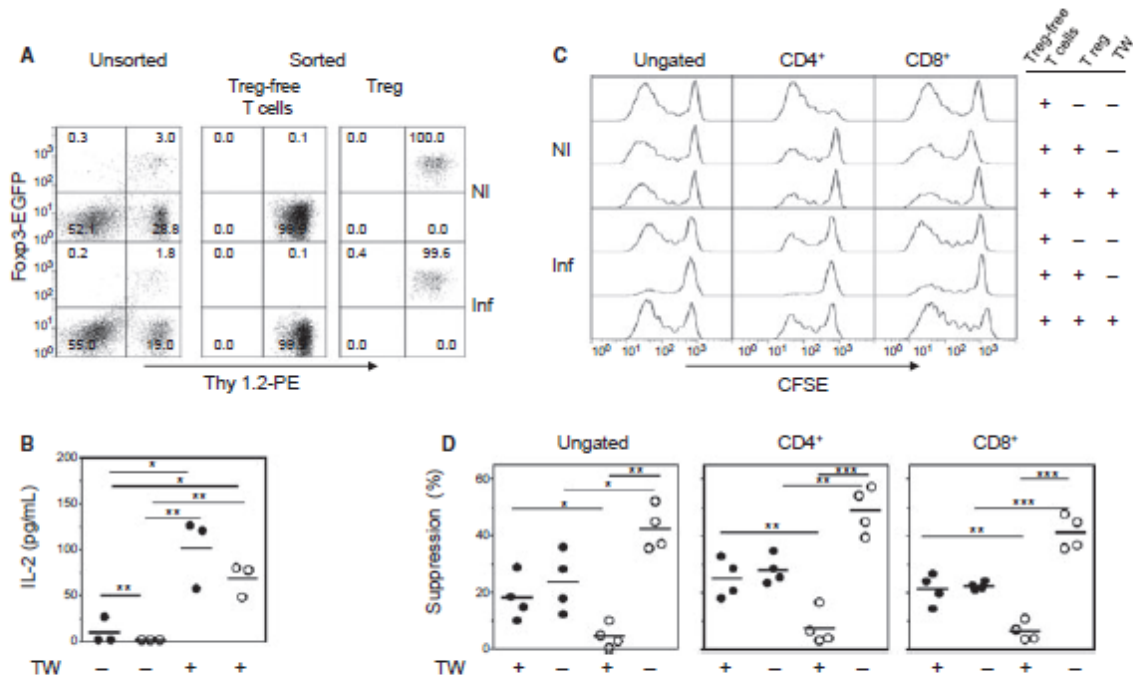


Figure 3 IL-2 mediated suppression by Tregs requires close proximity with T cells. Tregs and Treg-free T cells from uninfected (NI) or infected (Inf) Foxp3^{EGFP} mice were purified as described in Materials and Methods. (A) A representative analysis of the purity of the sorted cells according to Thy1.2 and Foxp3 expression is shown. (B) Cells were stained with CFSE, cultured at a 3:1 ratio (Treg-free T cells:Tregs) and stimulated with anti-CD3/anti-CD28 mAbs. Several combinations of the purified cells from uninfected (●) and infected mice (○) were cultured unseparated or in transwells (TW), supernatants were collected 24 h post-stimulation from three of four experiments and IL-2 was determined by ELISA. (C) The cells were collected 72 h post-stimulation and proliferation was analysed by CFSE dilution. A representative histogram of proliferation for CD4⁺, CD8⁺ and ungated populations is shown. (D) Results of the four independent experiments with six mice per group are expressed as percentage of suppression with or without transwells. Data were analysed using one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

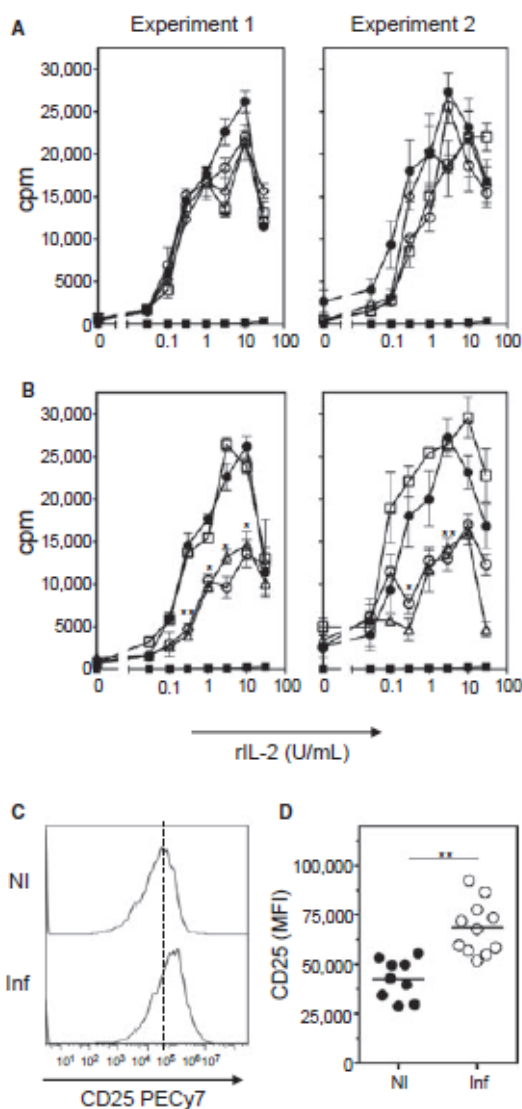


Figure 4 Tregs from *T. gondii*-infected mice compete with T cells for IL-2. Splenocytes from Foxp3^{EGFP} mice were enriched for CD4⁺ T cells by positive selection using anti-CD4 microbeads; CD4⁺ cells were further stained with anti-Thy1.2-PE mAb, and Tregs (Thy1.2⁺ Foxp3^{EGFP}) were purified by cell sorting. CTL2-2 cells were incubated with increasing concentrations of rIL-2 in the absence (●) or presence of Tregs isolated from uninfected (A) or infected (B) mice, at 10:1 (□), 3:1 (○) or 1:1 ratio (▲), and proliferation of CTL2-2 cells was determined by [³H]-thymidine incorporation; proliferation of Tregs alone (■) was also evaluated. Results of two independent experiments with four mice per group are expressed as cpm ± standard error mean. Results were analysed using two-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test, **P* < 0.05 or ***P* < 0.01. (C) Representative analysis of CD25 expression on Tregs purified from uninfected (NI) or infected mice (Inf). (D) Result of CD25 analysis expressed as mean fluorescence intensity (MFI) obtained from three experiments including at least three mice per group. Results were analysed using Student's *t*-test. ***P* < 0.01.

from infected mice were added to CTL2-2 cells, proliferation of the latter was inhibited at nearly all IL-2 concentrations tested, in the presence of 1:1 and 3:1 CTL2-2/Tregs ratios, but no significant inhibition was detected at 10:1 ratio in both experiments (Fig. 4 A,B). As expected, Tregs alone in the presence of IL-2 were unable to proliferate, as they require additional stimuli to proliferate *in vitro* [48]. This result thus demonstrated that Tregs from infected mice are able to carry out competitive uptake with T cells for IL-2.

It has been previously reported that Tregs from infected mice express higher CD25 levels than Tregs from uninfected animals [16]. Hence, we analysed CD25 expression on the purified Tregs from our experiments to test if a correlation existed between CD25 expression and IL-2 competition in the experiments described above. As expected (Fig. 4C,D), Tregs from infected mice express higher CD25 levels than Tregs from uninfected mice, thus supporting the hypothesis that Tregs from infected animals are able to compete with T cells for IL-2, which is the putative mechanism of Treg-mediated suppression of T cell proliferation.

Tregs from infected mice induces death of proliferating T cells by IL-2 competition

It has been reported that IL-2 consumption by Tregs leads to apoptosis of T cells [44]. Thus, to study the fate of T cells lacking IL-2 isolated from infected mice, we analysed the kinetics of T cell proliferation and cell death in the absence or presence of Tregs (Fig. 5). At 24 h post-stimulation, we observed a slight proliferation of T cells from infected animals, but no difference in the presence or absence of Tregs was detected. However, a very high proportion of proliferating T cells from infected animals was detected at 48 h (Fig. 5A), but most cells (60%) that diluted CFSE were also 7AAD⁺, indicating that these cells proliferated but died. No differences were observed in the presence or absence of Tregs at this time point. In contrast, T cells from uninfected mice showed a discrete proliferation rate and only a low proportion of CFSE⁺ 7AAD⁺ cells were detected; removal of Tregs increased proliferation of T cells and reduced percentage of dead cells. When T cells from uninfected animals were harvested at 72 h, we detected a very high proliferation rate and only a low proportion of these cells were dead; removal of Tregs induced a reduction in T cells that diluted CFSE and died, but the proliferating cells were also slightly reduced. In contrast, at this time point, most T cells from infected mice that proliferated were dead (CFSE⁺ 7AAD⁺), but removal of Tregs induced a 50% reduction in dead cells and increased the live proliferating T cells (Fig. 5A). Analysis of several experiments showed that T cells from infected mice were able to proliferate *in vitro*, but most of

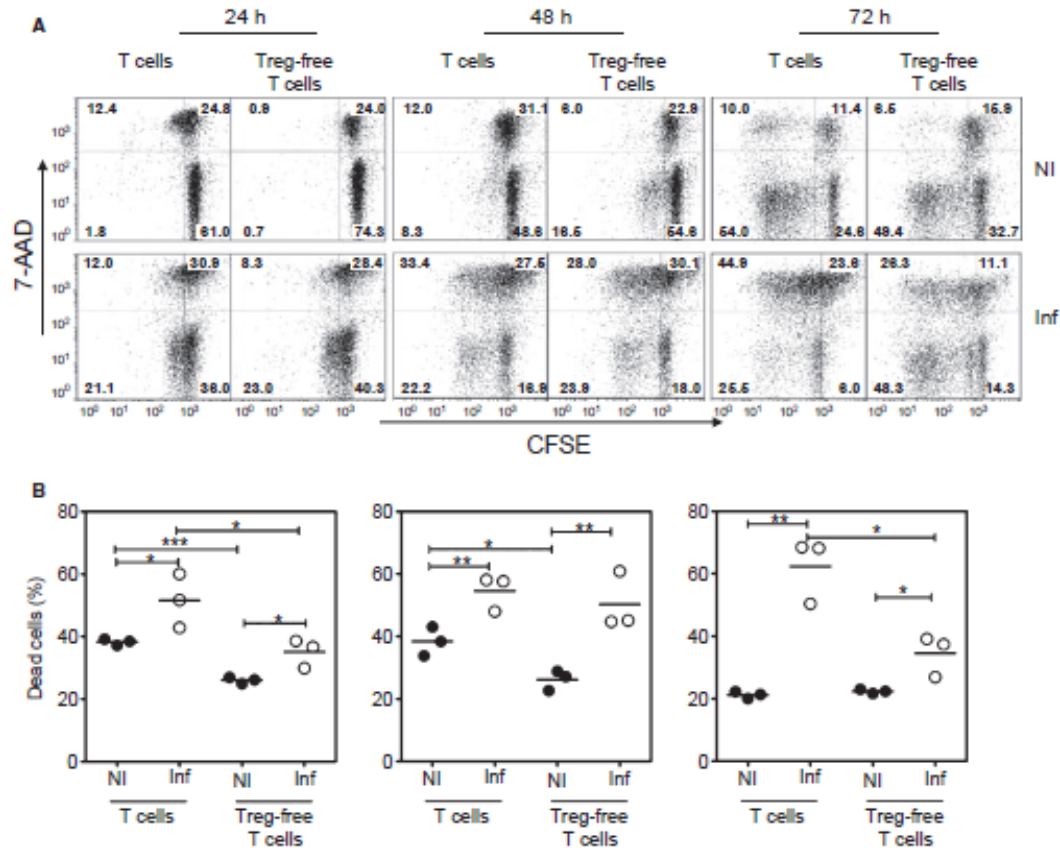


Figure 5 Tregs induce death of proliferating T cells from *T. gondii*-infected mice. Spleen cells from Foxp3^{EGFP} mice, either infected (Inf) or uninfected (NI), were stained with anti-Thy1.2 mAb, and T cells (Thy1.2⁺) or Treg-free T cells (Thy1.2⁺ Foxp3⁻) were purified by cell sorting. The sorted cells were stained with CFSE and stimulated with anti-CD3/anti-CD28 mAbs. Cells were collected at different time points, stained with 7-AAD and immediately analysed by flow cytometry. Thirty thousand events were captured. (A) A representative analysis of proliferation by CFSE dilution and detection of dead cells (7-AAD⁺) is shown. (B) Results from three independent experiments, including at least three mice per group, are expressed as percentage of dead cells (7-AAD⁺). Data were analysed using one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

them died after few rounds of cell division, and removal of Tregs partially prevented cell death (Fig. 5B).

As we had detected low IL-2 levels in supernatants of T cells from infected mice, we tested if addition of exogenous IL-2 to T cells prevented the proliferating T cells to die. As can be observed in a representative flow cytometric analysis (Fig. 6A) and in data from different experiments (Fig. 6B), addition of rIL-2 to T cells from infected mice, either CD4⁺ or CD8⁺, induced a threefold reduction of dead cells, while percentage of proliferating living cells increased. Addition of rIL-2 to T cells from uninfected animals led to a slight similar non-significant effect (Fig. 6). In conclusion, all our results show that suppression of T cell proliferation *in vitro* during acute *T. gondii* infection is not due to a failure of proliferation of T lymphocytes, as these cells are able to enter cell cycle and proliferate, but rather to IL-2 consumption by Tregs, leading to death of

proliferating CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by lack of IL-2.

Discussion

A suppression of T cell proliferation in response to mitogens or *T. gondii* antigen is observed *in vitro* in cells obtained from mice during the acute phase of *T. gondii* infection [10–20]. This suppression is detected in both CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets and is mediated by Tregs [16]. In this work, we further analysed the IL-2 related mechanisms of Tregs during the suppression of the T cell proliferation *in vitro*.

Tregs mediate suppression of T cells either indirectly by modulation of APC function or directly on T cells [32, 34]. We analysed if APC were involved during Treg-mediated suppression, and found that proliferation of CD4⁺ and

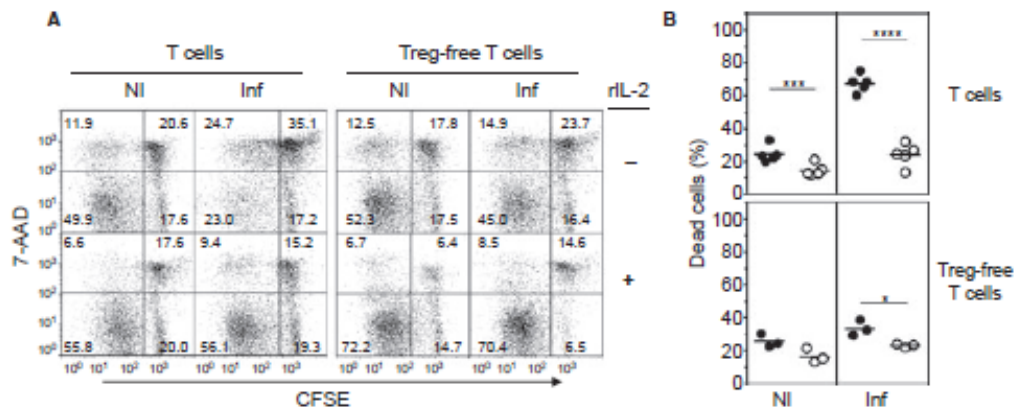


Figure 6 Exogenous IL-2 prevents Treg-mediated death of proliferating T cells from *T. gondii*-infected mice. Sorting of cells was carried out as described in Fig. 2. T cells (Thy1.2⁺) and Treg-free T cells (Thy1.2⁺ Foxp3⁻) from Foxp3^{fl/fl} mice were stained with CFSE and stimulated with anti-CD3/anti-CD28 mAbs in the absence or presence of rIL-2 (10 U/ml) for 72 h. Cells were collected, stained with 7-AAD and analysed immediately by flow cytometry. Thirty thousand events were captured. (A) A representative analysis of dead and living cells, from uninfected (NI) and infected (Inf) mice is shown. (B) Results from five independent experiments, including at least three mice per group, showing the percentage of dead (7AAD⁺) and living cells (7-AAD⁻) from infected or uninfected mice in the absence (●) or presence (○) of rIL-2. Data were analysed using Student's *t*-test, **P* < 0.05; ***P* < 0.001; ****P* < 0.0001.

CD8⁺ T cells from *T. gondii*-infected mice was also suppressed in the absence of APC. This effect *in vitro* is mediated by Tregs, as elimination of the latter from purified T cells led to a restored proliferation of T cells from infected mice to levels similar to those observed in cells from uninfected animals. Therefore, Tregs are able to suppress CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation directly in the absence of APC in our model. As it has been previously described that macrophages are involved in the suppression of proliferation of T cells from *T. gondii*-infected mice by RNIs production [10, 12–14, 21], our results thus reveal an additional and new mechanism of suppression during *T. gondii* infection.

Treg suppression mechanisms targeting responder T cells include secretion of inhibitory cytokines, cytolysis, metabolic disruption and modulation of cell surface molecules [32, 34]. We previously described that Treg-mediated suppression of T cell proliferation in spleen cells from *T. gondii*-infected mice is IL-2 dependent [16]. In this work, we also detected abolished IL-2 levels *in vitro* in purified T cells from infected animals, which were partially restored when Tregs were eliminated. In addition, we found in transwell experiments that suppression of T cell proliferation required close proximity between both subsets and that Treg-free T cells from infected mice produced low IL-2 levels, but the presence of Tregs abolished these levels when they were cultured unseparated. It has previously been shown that IL-2 consumption by Tregs depends strongly on the local cytokine concentration and the proximity between T cells and Tregs [46, 47]. Hence, our results strongly suggest that the low IL-2 levels, produced by T cells from infected

mice, are consumed by Tregs but only when they are in close proximity.

Given the results obtained, an obvious mechanism to explain the T cell suppression observed was competition for IL-2 by Tregs, a mechanism that has been reported by several authors [44, 47, 49, 50]. We found that Tregs from infected mice are able to carry out competitive uptake of IL-2, as detected using the classical assay for IL-2 quantification using CTLL-2 cells. This result correlated with a higher expression of CD25 on Tregs from infected animals. It has to be noted that Tregs from infected mice did not modify expression of *il-2* mRNA in T cells when analysed by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) (data not shown), thus ruling out the possibility that *il-2* gene was suppressed by Tregs in our system.

The fact that Tregs from uninfected mice did not induced lower CTLL-2 proliferation strongly suggests that Tregs isolated from *T. gondii*-infected mice switch their mode of action. A diversity of Treg suppression mechanisms have been reported [32, 34], but it is not clear when and how each mechanism operates. It was recently proposed that two modes of immune suppression may operate on Tregs, depending on the inflammatory or non-inflammatory conditions [51]. Our results seem to fit with this model, postulating that Tregs could switch their suppressive mechanisms, depending on the microenvironment. Due to the highly inflammatory immune response in susceptible mice to *T. gondii* infection, characterized by high levels of IFN- γ [4, 8, 52] and low IL-2 production [38, 39], Tregs are activated and express higher levels of CD25 and thus become higher IL-2 consumers.

We also analysed the fate of proliferating T cells by a kinetic proliferation analysis. We surprisingly found that T cells from infected mice are in fact able to enter cell cycle, although very early after stimulation *in vitro*, but most T cells that proliferated die later, mainly in the last rounds of cell division detected in the assay. At 72 h, that is the standard read-out time of most proliferation assays, we detected that most cells that proliferated were already dead. As very low IL-2 levels were detected in supernatants from T cells from infected mice, death of T cells is by lack of IL-2. It has been demonstrated that regulation of cellular proliferation and apoptosis induction are linked processes controlled in T cells by IL-2 [53–55]. Once T cells activate, the genes of IL-2 and its receptor, CD25, are induced, and binding of IL-2 with CD25 is essential for T cells to enter cell cycle [56, 57]. Activated T lymphocytes become susceptible to apoptosis [53], as withdrawal of IL-2 during this step leads to death by apoptosis [55]. In fact, Pandiyan *et al.* demonstrated that T cells that were deprived of IL-2 by Tregs *in vitro* die by apoptosis [44].

Our results showed that T cells from acutely infected mice are fully able to activate and proliferate. The low IL-2 levels produced at early time points after activation *in vitro*, thus allow the T cells to enter the cell cycle; it has to be noted that some proliferating T cells died even in the absence of Tregs, suggesting that the limited IL-2 levels produced also affects proliferation of T cells. Both activated T cells and Tregs expressing higher CD25 levels, thus lead to competition between both subsets for the low IL-2 levels; both T cells and Tregs consume the low IL-2 concentrations and as a consequence, the cytokine is exhausted at later time points in culture. T cells enter the cell cycle and are able to carry out several rounds of cell division, but when IL-2 is no longer available but still necessary, T cells die, possibly by passive apoptosis, a mechanism that has been previously reported when IL-2 is lacking [55]. Tregs are a key element in this event, as removal of these cells increases percentage of viable proliferating T cells and reverted suppression, indicating that Tregs cells indeed consumed IL-2. Addition of exogenous rIL-2 reversed the suppression and the competitive effect when Tregs are present. de la Rosa *et al.* [47] also showed that addition of high doses of IL-2 abrogates Treg suppression.

Immunosuppression during acute *T. gondii* infection has been defined as an unresponsiveness *in vitro* to T cell mitogens or parasite antigen [10–16, 20]. However, in this work, we showed that T cells in fact activate and proliferate; therefore, immunosuppression can no longer be seen as a real reduction in T cell proliferation as previously described [10–15, 17, 18, 20, 21]. Thus, in this scenario, *T. gondii* infection leads to a reduction in IL-2 producing cells [38, 39] and hence low IL-2 production [12, 13, 16, 20, 38, 39]. The low IL-2 levels lead in turn to a reduction in Tregs

number [39], but the remaining Tregs activate and express high levels of CD25 and able to efficiently compete for IL-2 with T cells *in vitro*. The decreased production of IL-2, which leads to an enhanced level of T cell apoptosis during acute *T. gondii* infection [52, 58] also contributes to the suppression observed, independently of Tregs. Thus, the suppression of T cell proliferation observed *in vitro* during the acute *T. gondii* infection seems to be at the same time an inherent part and consequence of the network of immunological events that are characteristic during the generation of a protective immune response against the parasite, where Tregs play a key role.

Acknowledgment

This work was supported by grants IN-200608 and IN-209111 from PAPIIT (DGAPA, UNAM, Mexico) and by grants 102399 and 102984 from CONACYT (Mexico). We thank Dra. Jacquelina Fernández for technical support and Dr. Edmundo Lamoyi for critical review of the manuscript. We are grateful to MVZ Georgina Díaz and MVZ Jorge Omar García for their expert advice and help in the care of the animals. N.S. and J.E.O. are recipients of a PhD fellowship from CONACYT (Registro 199991). This work was performed in partial fulfilment of the requirements for the PhD Program of Doctorado en Ciencias Biológicas of N.S. at the Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflict of interest

The authors have no conflicting financial or commercial interests.

References

- 1 Robert-Gangneux F, Durde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:264–96.
- 2 McCabe R, Remington JS. Toxoplasmosis: the time has come. *New Engl J Med* 1988;318:313–5.
- 3 Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363:1965–76.
- 4 Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:569–88.
- 5 Frenkel JK. Adoptive immunity to intracellular infection. *J Immunol* 1967;98:1309–19.
- 6 Aliberti J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol* 2005;5:162–70.
- 7 Gazzinelli R, Xu Y, Hiem S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1992;149:175–80.
- 8 Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S *et al.* Parasite-induced IL-12 stimulates early IPN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994;153:2533–43.
- 9 Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988;240:516–8.

- 10 Suzuki Y, Kobayashi A. Macrophage-mediated suppression of immune responses in *Toxoplasma*-infected mice. I. Inhibition of proliferation of lymphocytes in primary antibody responses. *Cell Immunol* 1984;85:417-27.
- 11 Chan J, Siegel JP, Luft BJ. Demonstration of T-cell dysfunction during acute toxoplasma infection. *Cell Immunol* 1986;98:422-33.
- 12 Haque S, Khan I, Haque A, Kasper L. Impairment of the cellular immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin 2 production and macrophage-mediated inhibitory effects. *Infect Immun* 1994;62:2908-16.
- 13 Candolfi E, Hunter CA, Remington JS. Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun* 1994;62:1995-2001.
- 14 Candolfi E, Hunter CA, Remington JS. Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis. *Infect Immun* 1995;63:751-6.
- 15 Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol* 1995;17:185-95.
- 16 Tenorio EP, Fernández J, Castellanos C, Olguín JE, Saavedra R. CD4 (+) Foxp3(+) Regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. *Eur J Immunol* 2011;41:3529-41.
- 17 Luft BJ, Kansas G, Engleman EG, Remington JS. Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1984;150:761-7.
- 18 Channon JY, Kasper LH. *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma interferon. *Infect Immun* 1996;64:1181-9.
- 19 Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. Activation-mediated CD4⁺ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol* 1996;8:887-96.
- 20 McLeod R, Eisenhaber P, Mack D et al. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1989;142:3247-55.
- 21 Khan IA, Matsuura T, Fonseka S, Kasper LH. Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRP-17^{-/-} mice. *J Immunol* 1996;156:636-43.
- 22 Neyer LE, Grunig G, Fort M et al. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1997;65:1675-82.
- 23 Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-52.
- 24 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
- 25 Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62.
- 26 Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu Rev Immunol* 2009;27:551-89.
- 27 Ding Y, Xu J, Bromberg JS. Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends Immunol* 2012;33:174-80.
- 28 Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337-42.
- 29 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-6.
- 30 Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med* 2000;192:303-10.
- 31 Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135-42.
- 32 Schmidt A, Oberle N, Krummer PH. Molecular mechanisms of Tregs-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 2012;3:1-20.
- 33 Gorthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 2009;70:326-36.
- 34 Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30:636-45.
- 35 Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009;21:1105-11.
- 36 Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells *in vitro* and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10113-8.
- 37 Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-96.
- 38 Benson A, Murray S, Divakar P et al. Microbial infection-induced expansion of effector T cells overcomes the suppressive effects of regulatory T cells via an IL-2 deprivation mechanism. *J Immunol* 2012;188:800-10.
- 39 Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA et al. Decrease of Foxp3⁺ Tregs cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 2009;31:772-86.
- 40 Ge YY, Zhang L, Zhang G et al. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4⁺CD25⁻ regulatory T cells. *Parasite Immunol* 2008;30:471-81.
- 41 Piña-Vazquez C, Saavedra R, Herion P. A quantitative competitive PCR method to determine the parasite load in the brain of *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Parasitol Int* 2008;57:347-53.
- 42 Tenorio EP, Olguín JE, Fernández J, Vieyra P, Saavedra R. Reduction of Foxp3⁺ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Biomed Biotechnol* 2010. doi: 10.1155/2010/786078.
- 43 Tenorio EP, Saavedra R. Differential effect of sodium arsenite during the activation of human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1853-69.
- 44 Pandiyan P, Zheng LX, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation - mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1353-62.
- 45 Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* 1978;120:2027-32.
- 46 Busse D, de la Rosa M, Hobeiger K et al. Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:3058-63.
- 47 de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004;34:2480-8.
- 48 Ring S, Thome M, Pretsche L, Enk AH, Mahnke K. Expanded murine regulatory T cells: analysis of phenotype and function in contact hypersensitivity reactions. *J Immunol Methods* 2007;326:10-21.
- 49 Brandenburg S, Takahashi T, de la Rosa M et al. IL-2 induces *in vivo* suppression by CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2008;38:1643-53.
- 50 Barthlott T, Moncrieffe H, Veldhoen M et al. CD25⁺ CD4⁺ T cells compete with naive CD4⁺ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol* 2005;17:279-88.

-
- 51 Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol* 2011;23:424–30.
- 52 Gavrilescu LC, Denkers EY. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 2001;167:902–9.
- 53 Lenardo M, Chan KM, Hornung F *et al.* Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 1999;17:221–53.
- 54 Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008;26:453–79.
- 55 Snow AL, Pandiyan P, Zheng L, Krummey SM, Lenardo MJ. The power and the promise of restimulation-induced cell death in human immune diseases. *Immunol Rev* 2010;236:68–82.
- 56 Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988;240:1169–76.
- 57 Cantrell DA, Smith KA. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 1984;224:1312–6.
- 58 Begun-Haque S, Haque A, Kasper LH. Apoptosis in *Toxoplasma gondii* activated T cells: the role of IFN-gamma in enhanced alteration of Bcl-2 expression and mitochondrial membrane potential. *Micob Pathogenesis* 2009;47:281–8.

CAPITULO 5. Información suplementaria

i) Evaluación del efecto de las células T_{regs} sobre el mRNA de IL-2

Dado que algunos estudios han mostrado que las células T_{regs} inhiben la expresión de mRNA de IL-2 (60,124), analizamos esta posibilidad en nuestro estudio, evaluando la expresión del mRNA por RT-PCR en células T de ratones infectados, en presencia y ausencia de células T_{regs}. Nuestros resultados muestran que las células T_{regs} de ratones infectados no suprimen la expresión del mRNA de IL-2 en las células T, ya que encontramos que la expresión del mRNA de IL-2 en las células T después de la activación *in vitro* es similar en presencia o ausencia de células T_{regs} de ratones infectados (Fig. 23).

En conclusión, las células T efectoras de ratones infectados son capaces de expresar el mRNA IL-2; este hallazgo concuerda con el hecho de que por ELISA nosotros podemos determinar que las células activadas *in vitro* producen IL-2, es decir, no existe una inhibición a nivel transcripcional ni a nivel de traducción. A su vez estos resultados apoyan la hipótesis de que las T_{regs} compiten por los niveles limitantes de IL-2 producidos por la células “T *naïve*” activadas *in vitro*. Dicho fenómeno de competencia entre las células T_{regs} y las células T no existe cuando se elimina selectivamente a las células T_{regs} y por eso es que podemos ver una recuperación significativa de la proliferación.

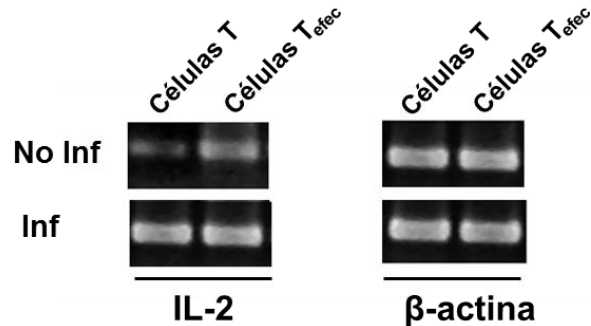


Figura 23. Las células T_{regs} no inhiben la expresión del mRNA de IL-2 en células T de ratones infectados con *T. gondii*. Se purificaron células T y células T_{efec} 7dpi, se estimularon durante 24 h y se analizó la expresión del mRNA de IL-2 por RT-PCR, como control se analizó la expresión constitutiva de β-actina. Las fotografías muestran que en ratones infectados las células T_{regs} no inhiben la expresión del mRNA de IL-2.

ii) Las células T_{regs} de ratones infectados son capaces de inducir la muerte e inhibir la proliferación de células T de ratones no infectados

Durante el desarrollo de este trabajo hemos descrito que las células T_{regs} activadas, provenientes de ratones infectados son capaces de inhibir la proliferación e inducir la muerte de células T activadas, mediante un mecanismo que depende de la competencia de cantidades limitantes de IL-2 en el medio.

Para evaluar el potencial supresor de las células T_{regs} de ratones infectados realizamos ensayos cruzados en donde co-cultivamos células T_{efec} de ratones no infectados con T_{regs} de ratones infectados y células T_{efec} de ratones infectados con T_{regs} de ratones no infectados (Fig. 24). Tal como hemos descrito en cultivos de células T (Fig. 24 a y b), observamos que en cultivos de células de ratones infectados disminuye el número de células vivas que diluyen CFSE (37.58%) y aumenta el número de células muertas (50.31%), comparando con las células de ratones no infectados, en donde el número de células vivas que diluyen CFSE es del 58.9% y el porcentaje de células muertas es del 20.04%.

Adicionalmente confirmamos que cuando se elimina selectivamente a las células T_{regs} , la supresión de la proliferación de las células T (T_{efec}) se revierte (Fig. 24 c y d), dando lugar a un aumento en el porcentaje de células vivas que diluyen CFSE (65.61%), siendo este porcentaje muy similar al porcentaje observado en los cultivos de células T (T_{efec}) de ratones no infectados (61.35%). Cuando se realizan co-cultivos de células T (T_{efec}) de ratones no infectados con células T_{regs} de ratones infectados (Fig 24 e), observamos que aumenta el porcentaje de células muertas (42.13%) que cuando co-cultivamos con células T_{regs} de ratones no infectados (17.21%) [Fig. 24 g]. Estos datos demuestran que las células T_{regs} de ratones infectados son capaces y más eficientes que las células T_{regs} de ratones no infectados para inducir la muerte de células T de ratones no infectados. Adicionalmente observamos que las células T_{regs} de ratones infectados también son más eficientes que las T_{regs} de ratones no infectados para inhibir la proliferación de células T, ya que el porcentaje de células vivas que diluyen CFSE disminuye del 75.03% al 40.20% (Fig 24 e y g).

Por otro lado, cuando se co-cultivan células T (T_{efec}) de ratones infectados con células T_{regs} de ratones infectados y no infectados (Fig. 24 f y h), también observamos que la actividad supresora de las células T_{regs} de ratones infectados es mayor que la de las células T_{regs} de ratones no infectados, ya que aumenta el porcentaje de células muertas de un 49.87% a un 62.68%. Asimismo observamos que disminuye el porcentaje de células vivas que diluyen CFSE de un 40.67% a un 25.25%. En conjunto nuestros datos demuestran que las células T_{regs} de ratones infectados son más eficientes para inhibir la proliferación e inducir la muerte de células T.

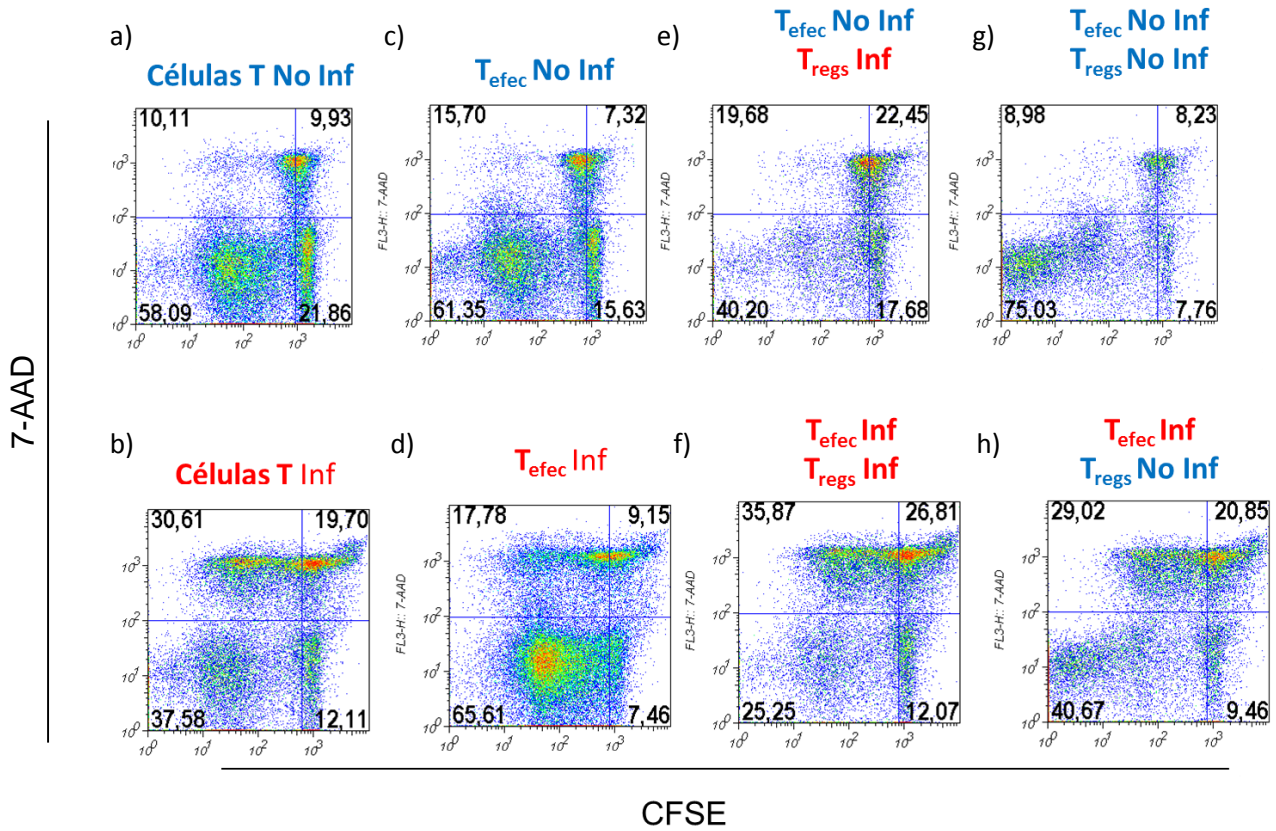


Figura 24. Las células T_{regs} de ratones infectados son capaces de inducir la muerte de células de ratones no infectados. Se realizaron ensayos cruzados (10:1; $T_{efec}:T_{reg}$) de proliferación con células T_{efec} con y sin T_{regs} de ratones infectados y no infectados. Las células T se estimularon con anticuerpos solubles anti-CD3 (3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-CD28 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células se cosecharon a las 72 h después del estímulo. Las muestras se tiñeron con 7AAD y se analizaron por citometría de flujo. Los "dot-plots" CFSE vs 7-AAD son representativos de dos experimentos independientes.

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

En este estudio hemos explorado los mecanismos de acción de las células T_{regs} involucrados en la supresión de la proliferación de células T durante la infección con *T. gondii*. Muchos reportes han descrito la supresión de la proliferación de células T *in vitro* en respuesta a mitógenos o a antígenos solubles de *T. gondii* durante la fase aguda de la infección (61,63,66-69,80). En esta fase de la infección se ha observado la supresión de la proliferación de células T CD4⁺ (65,69) y células T CD8⁺ (69). Recientemente hemos descrito que la supresión de la proliferación de células T de bazo de ratones infectados con *T. gondii* es mediada por células T_{regs} (69). Se sabe que las células T_{regs} pueden suprimir la proliferación de células T mediante la modulación de APC (114,115,135) o bien por contacto directo con las células T (113-115,124).

En el presente estudio mostramos que las células APC no son esenciales para modular la supresión de células T de bazo de ratones infectados, ya que observamos que la proliferación de células T de bazo y de células T purificadas por “*cell-sorting*” se reduce en una proporción similar (Fig. 17-18). Nuestros resultados son consistentes con lo reportado por Chan J y colaboradores, quienes reportaron que la proliferación de células T enriquecidas con “*nylon wool*” se encuentra aún suprimida (68). También son consistentes con lo reportado por Khan IA y colaboradores, quienes reportaron que la proliferación de células T CD4⁺ enriquecidas con perlas magnéticas todavía se encuentra suprimida (65). Sin embargo, debe señalarse que en estos estudios se observó una recuperación parcial de la proliferación de células T, lo cual pudo deberse a que sus sistemas de estimulación implican el uso de células accesorias y tal vez a que la metodología de purificación no elimina eficientemente a células que pudieran estar implicadas en la inmunosupresión.

Otros estudios habían descrito que los macrófagos estaban implicados en la supresión de la proliferación de linfocitos T mediante NO (38,63,75) e IL-10 (61,64); sin embargo, esta posibilidad se descartó después de que el uso de ratones IRF-1 KO (76) e IL-10 KO (49) demostró que la proliferación de células T aún se encontraba suprimida.

Nuestros resultados describen por primera vez que la supresión de la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ en un sistema libre de células accesorias (en presencia de células T_{regs}) tienen la misma magnitud de supresión de la proliferación que las células T de bazo de ratones infectados (Fig. 18). Por lo tanto este hallazgo nos sugirió que las células T_{regs} presentes en este sistema podían prescindir de las células accesorias para modular la supresión de la proliferación de células T. Esta hipótesis es consistente con lo reportado por Chan J y colaboradores, quienes para explicar sus resultados proponían que la supresión de la proliferación de células T en su sistema de células T enriquecidas podía deberse a diversos factores supresores incluyendo a las células T supresoras, actualmente conocidas como células T_{regs} (68). Nuestros resultados demuestran que las células T_{regs} suprimen directamente la proliferación de célula T, ya que la eliminación de células T_{regs} restaura la proliferación de células T a niveles similares de la proliferación de células T de ratones no infectados. Por lo tanto, demostramos las células T_{regs} de ratones infectados tienen un papel fundamental en la supresión de la proliferación de células T en la infección con *T. gondii*. En otros

modelos infecciosos también se ha estudiado el papel de las células T_{regs} en la supresión de la proliferación de células T, por ejemplo en la infección con el virus de la hepatitis murina (MHV) usando ratones DREG, se observó que la supresión de la proliferación de células T CD4⁺ es mediada por células T_{regs} (170). Contrariamente a lo observado en un modelo con *L. sigmodontis* en ratones DREG, en donde observaron que la supresión de la proliferación de células T, no depende de las células T_{regs} (171). Estas evidencias nos muestran que en diferentes modelos infecciosos las células T_{regs} pueden tener diversas funciones para regular la respuesta inmune, incluyendo la supresión de la proliferación de células T. Esta diversidad en la función y el papel de las células T_{regs} durante la respuesta inmune frente a un patógeno puede deberse a que los patógenos modulan la función de las células T_{regs} para favorecer su permanencia en el huésped (86).

Diversos estudios han descrito que los mecanismos de supresión de las células T_{regs} dependen tanto del contacto célula-célula (115,124,172) como de factores solubles (113,115,119,140,173). Entre los mecanismos dependientes del contacto celular se encuentran aquellos en los que se requiere de la interacción entre moléculas de membrana de T_{regs} (CTLA-4, PDL-1, FasL, LAG-3, entre otras) y moléculas de membrana de las células blanco. Por otro lado, también se ha descrito que el consumo de IL-2 por las células T_{regs} requiere de la proximidad entre las células T_{regs} y las células T_{efec} (122,127). Nuestros resultados de los ensayos “*transwell*” revelaron que las células T_{regs} requieren del contacto célula-célula para suprimir la proliferación de células T y disminuir los niveles de IL-2 en sobrenadantes (155).

Estudios han demostrado que la interacción entre CTLA-4/B7 inhibe la proliferación de células T y la acumulación de IL-2 induciendo un estado de anergia (160,164). Dado que previamente habíamos reportado que en las células T_{regs} aumenta la expresión de CTLA-4 (69), en este estudio evaluamos si la interacción CTLA-4/B7 estaba implicada en la supresión de la proliferación de células T. Las propiedades supresoras de CTLA-4 se han descrito en la inmunidad protectora en contra de parásitos (151,174,175) y enfermedades autoinmunes (118,176). Algunos estudios han demostrado que la actividad supresora de T_{regs} puede ser inhibida mediante el tratamiento con anti-CTLA-4 (34,35, 33) o con el tratamiento con anti-CD80 (143,176). Sin embargo, nuestros resultados muestran que aunque en las células T aumenta la expresión de B7.1 (CD80) la supresión de la proliferación de células T no es afectada por el tratamiento con anti-CD80 o anti-CTLA-4. Una posible explicación para no haber observado la restauración de la proliferación de las células T es que CTLA-4 es una molécula expresada tanto por las células T_{regs} como por las células T_{efec} de ratones infectados; en consecuencia, el bloqueo de CTLA-4 en ambas poblaciones probablemente es lo que no nos permitió observar la inhibición de la actividad supresora de las células T_{regs}. Otra explicación para nuestros resultados es que CTLA-4 es una molécula que presenta un continuo recambio en membrana (138), esta característica ha generado discrepancia en los ensayos de bloqueo con el anticuerpo anti-CTLA-4 en diferentes modelos (151,176,177). Aunque no está claro cómo la unión entre CTLA-4 expresada por las células T_{regs} y CD80 expresada por las células T_{efec} transmiten las señales a estas últimas, han demostrado que el bloqueo de la interacción de CD80 con su ligando es capaz de modular función de las células T de forma positiva o negativa (158,165,174,178). Datos *in vitro* muestran que el bloqueo con el anticuerpo anti-

CD80 en presencia de citocinas Th1, aumenta el nivel de activación de células T, la función efectora y la supervivencia (37). Mientras que en un modelo de encefalomiелitis alérgica experimental se ha observado que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD80 disminuye la activación de células T y como resultado disminuye la gravedad de la enfermedad (36). Nuestros resultados descartaron la participación de CTLA-4 CD80 en la supresión de la proliferación de células T; sin embargo, no podemos descartar que estas moléculas tengan una función no relacionada con la supresión de la proliferación de células T *in vitro* o que tengan un papel sobre la proliferación de células T *in vivo* durante la infección.

La IL-2 es un citocina producida por linfocitos T activados que actúa como un factor de crecimiento para regular y promover la proliferación, así como la apoptosis (179-181). Las células T_{regs} se caracterizan por no producir IL-2; sin embargo, requieren consumir IL-2 para regular su expansión, supervivencia y función supresora (98,124,182), privando de esta citocina a las células efectoras (123). Diversos estudios han descrito que la disminución de los niveles de IL-2 en sobrenadantes correlacionan con una reducción de la proliferación de células T de bazo de ratones que cursan la fase aguda de la infección con *T. gondii* (60,61,63,65,68,69,79). Esta disminución en los niveles de IL-2 se ha atribuido a la reducción de células CD4⁺ productoras de IL-2 (60,79). Pero además, recientemente hemos propuesto que la “deprivación” de IL-2 por células T_{regs} podría contribuir con la reducción de esta citocina en los sobrenadantes. En el presente estudio nosotros mostramos que los niveles de IL-2 disminuyen en los sobrenadantes de cultivos de células T, lo que se refleja en una reducción en la proliferación de células T de ratones infectados, tal como se ha reportado en la infección con *T. gondii* (60,61,63,65,68,69,79). En otras patologías también se ha atribuido la disminución de IL-2 en sobrenadantes con la reducción de células CD4⁺ productoras de IL-2 (183,184).

Nuestros resultados que demuestran que los niveles de IL-2 disminuyen totalmente cuando las células T_{regs} y T_{efec} están en contacto, concuerdan con otros reportes que describen que el consumo de IL-2 por las células T_{regs} depende fuertemente de la concentración local de citocinas y de la proximidad entre células T_{regs} y células T_{efec} (122,127,185). Sin embargo, otros estudios sugieren que la disminución de IL-2 en sobrenadantes se debe a que las células T_{regs} suprimen la expresión del mRNA de IL-2 en células T (124,172). En este estudio demostramos que las células T_{regs} de ratones infectados no suprimen la expresión del mRNA de IL-2 en las células T, ya que encontramos que la expresión del mRNA de IL-2 en las células T después de la activación *in vitro* es similar en presencia o ausencia de células T_{regs} de ratones infectados. Nuestros resultados son consistentes con otros reportes en donde demuestran que las células T_{regs} no modifican la expresión del mRNA de IL-2 en células T después de la activación *in vitro* (123,172,186). Contrariamente a lo observado por Benson A y colaboradores, quienes reportaron que en células T purificadas de ratones infectados con *T. gondii* la expresión del mRNA de IL-2 está disminuida (79). La evidencia de que las células T_{regs} no suprimen la expresión del mRNA de IL-2 nos sugirió que la disminución de esta citocina en los sobrenadantes se debe a que las células T_{regs} de ratones infectados privan de IL-2 a las células T, tal como ha demostrado Pandiyan y colaboradores (123). La discrepancia entre nuestros resultados y los de Benson y colaboradores sobre la expresión del mRNA de IL-2, puede deberse a diferencias metodológicas y experimentales, ya que nosotros evaluamos la expresión del mRNA de IL-2

después de 24 h de estimulación, mientras que el reporte de Benson indica que se evaluó la expresión del mensajero de células de ratones infectados sin estimular *in vitro*.

Nuestros resultados de los ensayos “*transwell*” demuestran que las células T_{regs} de ratones infectados requieren de cierta proximidad con las células T para suprimir la proliferación de células T y para disminuir los niveles de IL-2 en sobrenadantes, ya que tanto la proliferación de células T como los niveles de IL-2 en los sobrenadantes se restauran al separar las dos poblaciones celulares. Este resultado apoya la hipótesis de que las células T_{regs} activadas por la infección con *T. gondii* privan de IL-2 a las células T_{efec}, tras consumir esta citocina y es consistente con la evidencia que muestra que el consumo de IL-2 depende de la cercanía entre las células T_{efec} y las células T_{regs} (122,128,185).

Mediante un bioensayo de IL-2 con células CTLL-2, demostramos que las células T_{regs} de ratones infectados compiten eficientemente y privan de la IL-2 a células, dicha limitación de la IL-2 se manifiesta en una reducción de la proliferación. Esta evidencia nos sugiere fuertemente que las células T_{regs} son capaces de privar de IL-2 a las células T_{efec} provenientes de ratones infectados con *T. gondii*. Nuestros resultados muestran que en la disminución de IL-2, probablemente por la “*deprivación*” de IL-2, conduce a la apoptosis de células T_{efec} de ratones infectados. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Pandiyan y col., quienes demostraron que las células T_{regs} consumen más IL-2 que las células T_{efec}, particularmente después de la activación y demostraron que la “*deprivación*” de IL-2 conduce a la apoptosis de las células T_{efec} (123). La gran eficiencia de las células T_{regs} de ratones infectados para consumir IL-2 puede explicarse por el aumento en la expresión de CD25 en células T_{regs} durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* (69), lo que las hacen excelentes candidatas para ser consumidoras de IL-2 (185). La “*deprivación*” de IL-2 es un mecanismo de acción de las células T_{regs} que se ha propuesto en otras patologías para que llegue a la homeostasis y el balance entre la población de células T_{regs} y células T_{efec}. (116,183,184,187).

La muerte celular es un proceso esencial que limita la duración de la respuesta inmune (188). Diversos reportes describen un aumento en la muerte de células CD4+ y/o CD8+ en infecciones con *T. cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium chabaudi*, *Citomegalovirus*, *Mycobacterium avium* y *T. gondii* (65,77,148,189-194) Esta evidencia sugiere que la apoptosis es un proceso que se induce en una gran variedad de infecciones, como una respuesta para regular o terminar la respuesta inmunológica inducida por el patógeno. Sin embargo, aunque era de esperarse observar ciertos niveles de apoptosis, nos asombró encontrar que el 50% las células T de ratones infectados mueren después de dividirse. Este resultado nos demostró que la proliferación es un proceso que antecede a la muerte celular, dando lugar a un nuevo concepto sobre la inmunosupresión, ya que este concepto estaba definido por la incapacidad de responder de manera robusta a un mitógeno (hipo-respuesta); con nuestros resultados demostramos que las células de ratones infectados son capaces de responder eficientemente a un mitógeno desde tiempos tempranos (24h), sin embargo la presencia de células T_{regs} conduce a la muerte de células que se dividieron un par de rondas. Adicionalmente, nuestros datos muestran que la apoptosis de células T disminuye cuando eliminamos por

“cell sorting” a las células T_{regs} [25%] (Fig. 24), confirmando que las células T_{regs} son responsables de la “inmunosupresión”.

La IL-2 es una citocina que regula tanto la proliferación celular como la apoptosis, ya que puede iniciar la progresión del ciclo celular y promover la producción de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, myc y bim (179,181,195). En este trabajo, hemos presentado evidencia que demuestra que la adición de rIL-2 a los cultivos restaura en su totalidad la proliferación de células T y protege de la inducción de apoptosis aún en presencia de células T_{regs}. Es decir, se inhibe la muerte de células T de ratones infectados que se dividen desde tiempos tempranos. Esta evidencia es correlaciona con lo reportado por Pandiyan y colaboradores, quienes demuestran que la adición de rIL-2 protege de la apoptosis a las células T, ya que compensa la “deprivación” de esta citocina a las células T (123). Nuestros resultados también son consistentes con estudios previos en donde reportaron que la proliferación de células T de bazo de ratones infectados con *T. gondii* se restaura al adicionar rIL-2 (63,65,68,69).

Durante mucho tiempo se ha descrito que las células T no responden a mitógenos o antígenos durante la fase aguda de la infección con *T. gondii* (60,61,63,65,68,69,79). Nuestros resultados muestran que las células T son capaces de responder a un mitógeno, aunque después se induzca su apoptosis. Con este trabajo proporcionamos evidencia sólida que correlaciona directamente a la supresión de la proliferación de células T con apoptosis, sugiriendo que la falta de proliferación de células T a la que se ha descrito por años es el resultado de la muerte de células T y no de la reducción en la capacidad de proliferar de las células T. Esta hipótesis es consistente con estudios que describen la inducción de apoptosis de las células bazo durante la infección con *T. gondii* (65,77,194). Begun-Haque y colaboradores, reportaron que células T CD4⁺ de ratones infectados con *T. gondii* son sensibles a la inducción de apoptosis por FasL (77). Nosotros no encontramos expresión de FasL en células T_{regs}, como se ha descrito (142); por lo que descartamos la participación de FasL en la muerte de células T; sin embargo, cabe señalar que demostramos que la competencia entre las células T_{regs} y las células T por las cantidades limitantes de IL-2 es un mecanismo que explica la inducción de la muerte de las células T de ratones infectados.

En conjunto nuestras observaciones sugieren fuertemente que las células T_{regs} forman parte de un círculo vicioso en el que la IL-2 es la “manzana de la discordia”, ya que es requerida para que las células T_{regs} ejerzan su función reguladora y también es indispensable para que las células T proliferen y sobrevivan. Por lo tanto los bajos niveles de IL-2 se pueden explicar principalmente por dos procesos: 1) la muerte de las células productoras de IL-2 que rompen el bucle de retroalimentación positiva de esta citocina que mantenga la viabilidad de las células y 2) el consumo del remanente de IL-2 por las células T_{regs}.

Aunque nuestro trabajo demuestra que las células T_{regs} median la inmunosupresión por un mecanismo dependiente de IL-2 que conduce a la apoptosis de linfocitos T (196), se requieren experimentos adicionales para demostrar que la IL-2 es una molécula esencial para la supervivencia y actividad de las células T_{regs} en ratones que cursan la fase aguda de la infección por *T. gondii*. Nuestros resultados sugieren fuertemente que

las cantidades limitantes de IL-2 favorecen la competencia entre T_{regs} y T_{efec} y que el agotamiento de IL-2 por la activación de T_{regs} conduce a la inmunosupresión de CD4⁺ y CD8⁺. Estos eventos, por lo tanto, podrían contribuir a la respuesta inmune altamente inflamatoria que es característica durante la infección por *T. gondii*.

Adicionalmente a la competencia que pudiera existir entre las células T_{regs} y T_{efec} por la IL-2, es importante explorar la posibilidad de la que las células T_{regs} también pudieran inducir el estado anérgico de las células T de ratones infectados. Ya que nuestros resultados sugieren que los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 estimulan a las células T *náïve* para que produzcan IL-2 y proliferen. Sin embargo cuando en estos cultivos de linfocitos T de ratones infectados, las células T_{regs} no son eliminadas selectivamente por “*cell sorting*”, éstas últimas células podrían consumir la IL-2 presente en el medio restringiendo la posibilidad de que las células anérgicas puedan capturar la IL-2 para revertir su estado. Mientras que en el caso de tener cultivos libres de células T_{regs}, la IL-2 producida por la células *náïve*-activadas *in vitro* puede ser compartida con las células anérgicas para que puedan proliferar”. Probablemente esto explicaría porque en los cultivos de células T de ratones infectados, la eliminación de las células T_{regs} conduce a la reversión de la supresión.

En general, mediante este estudio describimos un mecanismo de acción de las células T_{regs} que contribuye a la regulación de la respuesta inmune, dando lugar a una nueva visión sobre la inmunorregulación descrita previamente para la infección por *T. gondii*. Es decir, nuestros resultados demuestran que las células T_{regs} en su intento de modular la respuesta inmune activada por la infección con *T. gondii* actúan directamente sobre las células T_{efec}, privando de IL-2 a esta población e induciendo la muerte *in vitro*. Finalmente podemos decir que nuestro estudio proporcionan evidencias que ayudan a tener una mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos que podrían utilizar las células T_{regs} *in vivo* para regular la respuesta inmunitaria a la infección por *T. gondii*.

VI. REFERENCIAS.

1. Robert-Gangneux, F., and M. L. Darde. 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 264-296.
2. Dubey, J. P. 2008. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot. Microbiol.* 55: 467-475.
3. Innes, E. A. 2010. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses. Public Health* 57: 1-7.
4. Sullivan, W. J., Jr., and V. Jeffers. 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 717-733.
5. Hill, D. E., S. Chirukandoth, and J. P. Dubey. 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res. Rev.* 6: 41-61.
6. Lindsay, D. S., J. P. Dubey, J. M. Butler, and B. L. Blagburn. 1996. Experimental tissue cyst induced *Toxoplasma gondii* infections in dogs. *J Eukaryot. Microbiol.* 43: 113S.
7. Dubey, J. P., D. S. Lindsay, and C. A. Speer. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 267-299.
8. Dalimi, A., and A. Abdoli. 2012. Latent toxoplasmosis and human. *Iran J. Parasitol.* 7: 1-17.
9. Elmore, S. A., J. L. Jones, P. A. Conrad, S. Patton, D. S. Lindsay, and J. P. Dubey. 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* 26: 190-196.
10. Jackson, M. H., and W. M. Hutchison. 1989. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* 28: 55-105.
11. Blader, I. J., and J. P. Saeij. 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* 117: 458-476.
12. Chemoh, W., N. Sawangjaroen, V. Nissapatorn, C. Suwanrath, V. Chandeying, T. Hortiwakul, H. Andiappan, N. Sermwittayawong, B. Charoenmak, P. Siripaitoon, A. Lekkla, and Y. Sukthana. 2013. *Toxoplasma gondii* infection: What is the real situation? *Exp Parasitol.* 135: 685-689.
13. Montoya, J. G., and J. S. Remington. 2008. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 47: 554-566.
14. Saadatian, G., and M. Golkar. 2012. A review on human toxoplasmosis. *Scand. J Infect. Dis.* 44: 805-814.
15. Montoya, J. G., and O. Liesenfeld. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-1976.
16. Jones, J., A. Lopez, and M. Wilson. 2003. Congenital toxoplasmosis. *Am. Fam. Physician* 67: 2131-2138.
17. Barratt, J. L., J. Harkness, D. Marriott, J. T. Ellis, and D. Stark. 2010. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 795-836.
18. Weiss, L. M., and J. P. Dubey. 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J Parasitol.* 39: 895-901.
19. Hill, D., and J. P. Dubey. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 634-640.
20. Luft, B. J., G. Kansas, E. G. Engleman, and J. S. Remington. 1984. Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 150: 761-767.
21. Luft, B. J., and J. S. Remington. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15: 211-222.
22. Jones, J. L., A. Lopez, M. Wilson, J. Schulkin, and R. Gibbs. 2001. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 56: 296-305.
23. Pappas, G., N. Roussos, and M. E. Falagas. 2009. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J Parasitol.* 39: 1385-1394.
24. Vado-Solis, I. A., V. Suarez-Solis, B. Jimenez-Delgadillo, J. E. Zavala-Velazquez, and J. C. Segura-Correa. 2013. *Toxoplasma gondii* presence in women with spontaneous abortion in Yucatan, Mexico. *J Parasitol.* 99: 383-385.

25. Galvan-Ramirez, M. L., R. Troyo, S. Roman, C. Calvillo-Sanchez, and R. Bernal-Redondo. 2012. A systematic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* infection among the Mexican population. *Parasit. Vectors*. 5: 271.
26. Alvarado-Esquivel, C., F. Campillo-Ruiz, and O. Liesenfeld. 2013. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in migrant agricultural workers living in poverty in Durango, Mexico. *Parasit. Vectors*. 6: 113.
27. Alvarado-Esquivel, C., O. Liesenfeld, J. A. Marquez-Conde, S. Estrada-Martinez, and J. P. Dubey. 2010. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in workers occupationally exposed to water, sewage, and soil in Durango, Mexico. *J Parasitol*. 96: 847-850.
28. Castrejón-Velasco O, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C, Tapia-Coyner R, Gutiérrez G, and Sepúlveda J. Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México., 34 ed. 222-229.
29. Hunter, C. A., and L. D. Sibley. 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol*. 10: 766-778.
30. Denkers, E. Y. 1999. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes. Infect* 1: 699-708.
31. Denkers, E. Y., R. L. Del, and S. Bennouna. 2003. Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem. Immunol. Allergy* 83: 95-114.
32. Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hayashi, E. Y. Denkers, S. Hieny, P. Caspar, G. Trinchieri, and A. Sher. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 153: 2533-2543.
33. Liu, C. H., Y. T. Fan, A. Dias, L. Esper, R. A. Corn, A. Bafica, F. S. Machado, and J. Aliberti. 2006. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol*. 177: 31-35.
34. Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308: 1626-1629.
35. Aliberti, J. 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat. Rev. Immunol*. 5: 162-170.
36. Aliberti, J., Reis e Sousa, M. Schito, S. Hieny, T. Wells, G. B. Huffnagle, and A. Sher. 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat. Immunol*. 1: 83-87.
37. Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber, and J. S. Remington. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516-518.
38. Suzuki, Y., and A. Kobayashi. 1984. Macrophage-mediated suppression of immune responses in *Toxoplasma*-infected mice. I. Inhibition of proliferation of lymphocytes in primary antibody responses. *Cell. Immunol*. 85: 417-427.
39. Liesenfeld, O., I. Parvanova, J. Zerrahn, S. J. Han, F. Heinrich, M. Munoz, F. Kaiser, T. Aebischer, T. Buch, A. Waisman, G. Reichmann, O. Utermohlen, S. E. von, F. D. von Loewenich, C. Bogdan, S. Specht, M. Saftel, A. Hoerauf, M. M. Mota, S. Konen-Waisman, S. H. Kaufmann, and J. C. Howard. 2011. The IFN-gamma-inducible GTPase, Irga6, protects mice against *Toxoplasma gondii* but not against *Plasmodium berghei* and some other intracellular pathogens. *PLoS. One*. 6: e20568.
40. Andrade, R. M., J. A. Portillo, M. Wessendarp, and C. S. Subauste. 2005. CD40 signaling in macrophages induces activity against an intracellular pathogen independently of gamma interferon and reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun*. 73: 3115-3123.
41. Denkers, E. Y., and R. T. Gazzinelli. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev*. 11: 569-588.
42. Gazzinelli, R., Y. Xu, S. Hieny, A. Cheever, and A. Sher. 1992. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 149: 175-180.
43. Munoz, M., O. Liesenfeld, and M. M. Heimesaat. 2011. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol. Rev*. 240: 269-285.
44. Kang, H., J. S. Remington, and Y. Suzuki. 2000. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol*. 164: 2629-2634.

45. Wille, U., M. Nishi, L. Lieberman, E. H. Wilson, D. S. Roos, and C. A. Hunter. 2004. IL-10 is not required to prevent immune hyperactivity during memory responses to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 26: 229-236.
46. Neyer, L. E., G. Grunug, M. Fort, J. S. Remington, D. Rennick, and C. A. Hunter. 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 65: 1675-1682.
47. Suzuki, Y., A. Sher, G. Yap, D. Park, L. E. Neyer, O. Liesenfeld, M. Fort, H. Kang, and E. Gufwoli. 2000. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 164: 5375-5382.
48. Jankovic, D., M. C. Kullberg, C. G. Feng, R. S. Goldszmid, C. M. Collazo, M. Wilson, T. A. Wynn, M. Kamanaka, R. A. Flavell, and A. Sher. 2007. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp. Med.* 204: 273-283.
49. Neyer, L. E., G. Grunug, M. Fort, J. S. Remington, D. Rennick, and C. A. Hunter. 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 65: 1675-1682.
50. Roers, A., L. Siewe, E. Strittmatter, M. Deckert, D. Schluter, W. Stenzel, A. D. Gruber, T. Krieg, K. Rajewsky, and W. Muller. 2004. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp. Med.* 200: 1289-1297.
51. Tait, E. D., K. A. Jordan, C. D. Dupont, T. H. Harris, B. Gregg, E. H. Wilson, M. Pepper, F. Dzierszynski, D. S. Roos, and C. A. Hunter. 2010. Virulence of *Toxoplasma gondii* is associated with distinct dendritic cell responses and reduced numbers of activated CD8+ T cells. *J Immunol.* 185: 1502-1512.
52. Tait, E. D., and C. A. Hunter. 2009. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 201-210.
53. Deckert-Schluter, M., C. Buck, D. Weiner, N. Kaefer, A. Rang, H. Hof, O. D. Wiestler, and D. Schluter. 1997. Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic *Toxoplasma* encephalitis. *J Neuroimmunol.* 76: 167-176.
54. D'Angelillo, A., L. E. De, S. Romano, R. Bisogni, W. Buffolano, N. Gargano, P. P. Del, V. L. Del, E. Petersen, and M. F. Romano. 2011. *Toxoplasma gondii* Dense Granule Antigen 1 stimulates apoptosis of monocytes through autocrine TGF-beta signaling. *Apoptosis.* 16: 551-562.
55. Seabra, S. H., S. W. de, and R. A. Damatta. 2004. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324: 744-752.
56. Villarino, A., L. Hibbert, L. Lieberman, E. Wilson, T. Mak, H. Yoshida, R. A. Kastelein, C. Saris, and C. A. Hunter. 2003. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity.* 19: 645-655.
57. Villarino, A. V., J. S. Stumhofer, C. J. Saris, R. A. Kastelein, F. J. de Sauvage, and C. A. Hunter. 2006. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J Immunol.* 176: 237-247.
58. Villarino, A. V., J. Larkin, III, C. J. Saris, A. J. Caton, S. Lucas, T. Wong, F. J. de Sauvage, and C. A. Hunter. 2005. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J. Immunol.* 174: 7684-7691.
59. Hunter, C. A., A. Villarino, D. Artis, and P. Scott. 2004. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol. Rev.* 202: 106-114.
60. Oldenhove, G., N. Bouladoux, E. A. Wohlfert, J. A. Hall, D. Chou, L. Dos Santos, S. O'Brien, R. Blank, E. Lamb, S. Natarajan, R. Kastenmayer, C. Hunter, M. E. Grigg, and Y. Belkaid. 2009. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity.* 31: 772-786.
61. Candolfi, E., C. A. Hunter, and J. S. Remington. 1995. Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 63: 751-756.
62. Channon, J. Y., and L. H. Kasper. 1996. *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma interferon. *Infect. Immun.* 64: 1181-1189.

63. Haque, S., I. Khan, A. Haque, and L. Kasper. 1994. Impairment of the cellular immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin 2 production and macrophage-mediated inhibitory effects. *Infect. Immun.* 62: 2908-2916.
64. Khan, I. A., T. Matsuura, and L. H. Kasper. 1995. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol.* 17: 185-195.
65. Khan, I. A., T. Matsuura, and L. H. Kasper. 1996. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int. Immunol.* 8: 887-896.
66. McLeod, R., Eisenhauer P., D. Mack, C. Brown, G. Filice, and G. Spitalny. 1989. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 142: 3247-3255.
67. Neyer, L. E., H. Kang, J. S. Remington, and Y. Suzuki. 1998. Mesenteric lymph node T cells but not splenic T cells maintain their proliferative response to concanavalin-A following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 20: 573-581.
68. Chan, J., J. P. Siegel, and B. J. Luft. 1986. Demonstration of T-cell dysfunction during acute toxoplasma infection. *Cell. Immunol.* 98: 422-433.
69. Tenorio, E. P., J. Fernández, C. Castellanos, J. E. Olguín, and R. Saavedra. 2011. CD4(+) Foxp3(+) Regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. *Eur. J Immunol.*
70. McLeod, R., P. Eisenhauer, D. Mack, C. Brown, G. Filice, and G. Spitalny. 1989. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 142: 3247-3255.
71. Luft, B. J., and J. S. Remington. 1984. Acute *Toxoplasma* infection among family members of patients with acute lymphadenopathic toxoplasmosis. *Arch. Intern. Med.* 144: 53-56.
72. McLeod, R., R. G. Estes, D. G. Mack, and H. Cohen. 1984. Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion. *J Infect. Dis.* 149: 234-244.
73. Yano, A., K. Norose, K. Yamashita, F. Aosai, K. Sugane, K. Segawa, and S. Hayashi. 1987. Immune response to *Toxoplasma gondii*-analysis of suppressor T cells in a patient with symptomatic acute toxoplasmosis. *J Parasitol.* 73: 954-961.
74. Neyer, L. E., H. Kang, J. S. Remington, and Y. Suzuki. 1998. Mesenteric lymph node T cells but not splenic T cells maintain their proliferative response to concanavalin-A following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 20: 573-581.
75. Candolfi, E., C. A. Hunter, and J. S. Remington. 1994. Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* 62: 1995-2001.
76. Khan, I. A., T. Matsuura, S. Fonseka, and L. H. Kasper. 1996. Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1^{-/-} mice. *J Immunol.* 156: 636-643.
77. Begum-Haque, S., A. Haque, and L. H. Kasper. 2009. Apoptosis in *Toxoplasma gondii* activated T cells: the role of IFN γ in enhanced alteration of Bcl-2 expression and mitochondrial membrane potential. *Microb. Pathogenesis* 47: 281-288.
78. Tenorio, E. P., J. E. Olguin, J. Fernandez, P. Vieyra, and R. Saavedra. 2010. Reduction of Foxp3+ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Biomed. Biotechnol.*
79. Benson, A., S. Murray, P. Divakar, N. Burnaevskiy, R. Pifer, J. Forman, and F. Yarovinsky. 2012. Microbial infection-induced expansion of effector T cells overcomes the suppressive effects of regulatory T cells via an IL-2 deprivation mechanism. *J. Immunol.* 188: 800-810.
80. Khan, I. A., T. Matsuura, and L. H. Kasper. 1996. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int. Immunol* 8: 887-896.
81. Denkers, E. Y., T. Scharton-Kersten, S. Barbieri, P. Caspar, and A. Sher. 1996. A role for CD4+ NK1.1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J Exp. Med.* 184: 131-139.
82. Luder, C. G., T. Lang, B. Beuerle, and U. Gross. 1998. Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin. Exp. Immunol.* 112: 308-316.
83. Luder, C. G., and F. Seeber. 2001. *Toxoplasma gondii* and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation. *Int. J Parasitol.* 31: 1355-1369.

84. Beissert, S., A. Schwarz, and T. Schwarz. 2006. Regulatory T cells. *J Invest. Dermatology*. 126: 15-24.
85. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6: 345-352.
86. Belkaid, Y., and K. Tarbell. 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 551-589.
87. Ding, Y., J. Xu, and J. S. Bromberg. 2012. Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends Immunol.* 33: 174-180.
88. Gershon, R. K., and K. Kondo. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21: 903-914.
89. Gershon, R. K., and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunol.* 18: 723-737.
90. Cantor, H., F. W. Shen, and E. A. Boyse. 1976. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: after immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. *J Exp. Med.* 143: 1391-40.
91. Jandinski, J., H. Cantor, T. Tadakuma, D. L. Peavy, and C. W. Pierce. 1976. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: suppressor and helper activities are inherent properties of distinct T-cell subclasses. *J Exp. Med.* 143: 1382-1390.
92. Chai, J. G., S. A. Xue, D. Coe, C. Addey, I. Bartok, D. Scott, E. Simpson, H. J. Stauss, S. Hori, S. Sakaguchi, and J. Dyson. 2005. Regulatory T cells, derived from naive CD4+. *Transplantation* 79: 1310-1316.
93. Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi, and T. Masuda. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp. Med.* 161: 72-87.
94. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 531-562.
95. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155: 1151-1164.
96. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen. *J. Exp. Med.* 192: 303-310.
97. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 3: 135-142.
98. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4: 330-336.
99. Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4: 337-342.
100. Chatila, T. A. 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin. Immunol.* 116: 949-959.
101. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.
102. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp. Med.* 198: 1875-1886.
103. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* 182: 68-79.
104. Weiner, H. L. 1997. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Today* 18: 335-343.
105. Hagness, M., K. Henjum, J. Landskron, K. W. Brudvik, B. A. Bjornbeth, A. Foss, K. Tasken, and E. M. Aandahl. 2012. Kinetics and activation requirements of contact-dependent immune suppression by human regulatory T cells. *J Immunol* 188: 5459-5466.
106. Huehn, J., J. K. Polansky, and A. Hamann. 2009. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat. Rev. Immunol.* 9: 83-89.

107. Polansky, J. K., L. Schreiber, C. Thelemann, L. Ludwig, M. Kruger, R. Baumgrass, S. Cording, S. Floess, A. Hamann, and J. Huehn. 2010. Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *J Mol. Med. (Berl)* 88: 1029-1040.
108. Polansky, J. K., and J. Huehn. 2007. [To be or not to be a Treg: epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells]. *Z. Rheumatol.* 66: 417-420.
109. Toker, A., D. Engelbert, G. Garg, J. K. Polansky, S. Floess, T. Miyao, U. Baron, S. Duber, R. Geffers, P. Giehr, S. Schallenberg, K. Kretschmer, S. Olek, J. Walter, S. Weiss, S. Hori, A. Hamann, and J. Huehn. 2013. Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *J. Immunol.* 190: 3180-3188.
110. Liston, A., and C. A. Piccirillo. 2013. Developmental plasticity of murine and human Foxp3(+) regulatory T cells. *Adv. Immunol.* 119: 85-106.
111. Sakaguchi, S., D. A. Vignali, A. Y. Rudensky, R. E. Niec, and H. Waldmann. 2013. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 461-467.
112. Barnes, M. J., and F. Powrie. 2009. Hybrid Treg cells: steel frames and plastic exteriors. *Nat. Immunol.* 10: 563-564.
113. Collison, L. W., M. R. Pillai, V. Chaturvedi, and D. A. Vignali. 2009. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 182: 6121-6128.
114. Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi. 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int. Immunol.* 21: 1105-1111.
115. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol* 8: 523-532.
116. Wang, G., M. Khattar, Z. Guo, Y. Miyahara, S. P. Linkes, Z. Sun, X. He, S. M. Stepkowski, and W. Chen. 2010. IL-2-deprivation and TGF-beta are two non-redundant suppressor mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cell which jointly restrain CD4+. *Immunol Lett.* 132: 61-68.
117. Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp. Med.* 190: 995-1004.
118. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp. Med.* 192: 295-302.
119. Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, R. S. Blumberg, and D. A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450: 566-569.
120. Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp. Med.* 204: 1257-1265.
121. Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 30: 636-645.
122. Busse, D., M. de la Rosa, K. Hobeiger, K. Thurley, A. Sheffold, and T. Hofer. 2010. Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 3058-3063.
123. Pandiyan, P., L. X. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation -mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells. *Nat. Immunol.* 8: 1353-1362.
124. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188: 287-296.
125. Barthlott, T., H. Moncrieffe, M. Veldhoen, C. J. Atkins, J. Christensen, A. O'Garra, and B. Stockinger. 2005. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int. Immunol.* 17: 279-288.
126. Czystowska, M., L. Strauss, C. Bergmann, M. Szajnik, H. Rabinowich, and T. L. Whiteside. 2010. Reciprocal granzyme/perforin-mediated death of human regulatory and responder T cells is regulated by interleukin-2 (IL-2). *J Mol. Med. (Berl)* 88: 577-588.

127. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J Immunol.* 34: 2480-2488.
128. Scheffold, A., J. Hühn, and T. Höfer. 2005. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur. J. Immunol* 35: 1336-1341.
129. Malek, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli, and L. Kong. 2002. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity.* 17: 167-178.
130. Hofer, T., O. Krichevsky, and G. Altan-Bonnet. 2012. Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Front Immunol.* 3: 268.
131. Garcia-Martinez, K., and K. Leon. 2010. Modeling the role of IL-2 in the interplay between CD4+ helper and regulatory T cells: assessing general dynamical properties. *J. Theor. Biol.* 262: 720-732.
132. Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi. 2008. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105: 10113-10118.
133. Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille, and M. L. Dustin. 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp. Med.* 203: 505-511.
134. Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri. 2004. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 172: 4676-4680.
135. Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake, and D. A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 4: 503-513.
136. Sumitomo, S., and K. Yamamoto. 2010. CD4+CD25-LAG-3+ T cells in mouse and human. *Japanese. J Clinic. Immunol.* 2: 92-98.
137. Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 1206-1212.
138. Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Fütter, G. Anderson, L. S. Walker, and D. M. Sansom. 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332: 600-603.
139. Banz, A., C. Pontoux, and M. Papiernik. 2002. Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. *J Immunol.* 169: 750-757.
140. Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, and T. J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 27: 635-646.
141. Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, and R. J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 174: 1783-1786.
142. Strauss, L., C. Bergmann, and T. L. Whiteside. 2009. Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 182: 1469-1480.
143. Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *PNAS* 101: 10398-10403.
144. Yamaguchi, T., J. B. Wing, and S. Sakaguchi. 2011. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin. Immunol.* 23: 424-430.
145. Couper, K. N., P. A. Lanthier, G. Perona-Wright, L. W. Kummer, W. Chen, S. T. Smiley, M. Mohrs, and L. L. Johnson. 2009. Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 182: 3985-3994.
146. Morampudi, V., C. S. De, M. A. Le, S. Detienne, M. Y. Braun, and S. D'Souza. 2011. Partial depletion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. *Microbes. Infect.* 13: 394-404.

147. Ge, Y. Y., L. Zhang, G. Zhang, J. P. Wu, M. J. Tan, E. Hu, Y. J. Liang, and Y. Wang. 2008. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4⁺CD25⁺ -regulatory T cells. *Parasite Immunol.* 30: 471-481.
148. Sanchez-Torres, L., A. Rodriguez-Ropon, M. Aguilar-Medina, and L. Favila-Castillo. 2001. Mouse splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol* 23: 617-626.
149. Vigario, A. M., O. Gorgette, H. C. Dujardin, T. Cruz, P. A. Cazenave, A. Six, A. Bandeira, and S. Pied. 2007. Regulatory CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. *Int. J Parasitol* 37: 963-973.
150. Guilliams, M., G. Oldenhove, W. Noel, M. Herin, L. Brys, P. Loi, V. Flamand, M. Moser, B. P. De, and A. Beschin. 2007. African trypanosomiasis: naturally occurring regulatory T cells favor trypanotolerance by limiting pathology associated with sustained type 1 inflammation. *J Immunol.* 179: 2748-2757.
151. Finney, C. A., M. D. Taylor, M. S. Wilson, and R. M. Maizels. 2007. Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur. J. Immunol.* 37: 1874-1886.
152. McSorley, H. J., Y. M. Harcus, J. Murray, M. D. Taylor, and R. M. Maizels. 2008. Expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*. *J. Immunol.* 181: 6456-6466.
153. Tenorio, E. P., and R. Saavedra. 2005. Differential effect of sodium arsenite during the activation of human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* 5: 1853-1869.
154. Gillis, S., M. M. Ferm, W. Ou, and K. A. Smith. 1978. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol.* 120: 2027-2032.
155. Salinas, N., J. E. Olguin, C. Castellanos, and R. Saavedra. 2014. T cell Suppression In Vitro During *Toxoplasma gondii* Infection is the Result of IL-2 Competition Between Tregs and T cells Leading to Death of Proliferating T cells. *Scand. J Immunol.* 79: 1-11.
156. Miyara, M., and S. Sakaguchi. 2007. Natural regulatory T cell: mechanisms of suppression. *TRENDS in Molecular Medicine* 13: 108-116.
157. Schmidt, A., N. Oberle, and P. H. Krammer. 2012. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front. Immun.* 3: 1-20.
158. Rudd, C. E., M. Martin, and H. Schneider. 2002. CTLA-4 negative signaling via lipid rafts: A new perspective. *Sci. STKE.* 2002: e18.
159. Falb, D., T. J. Briner, G. H. Sunshine, C. R. Bourque, M. Luqman, M. L. Geftter, and T. Kamradt. 1996. Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur. J Immunol.* 26: 130-135.
160. Kuklina, E. M. 2013. Molecular mechanisms of T-cell anergy. *Biochemistry (Mosc.)* 78: 144-156.
161. Martin, M., H. Schneider, A. Azouz, and C. E. Rudd. 2001. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J. Exp. Med.* 194: 1675-1681.
162. Ohkura, N., Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi. 2013. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity.* 38: 414-423.
163. Jung, Y. J., and J. Y. Seoh. 2009. Feedback loop of immune regulation by CD4⁺CD25⁺ Treg. *Immunobiology* 214: 291-302.
164. Krummel, M. F., and J. P. Allison. 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp. Med.* 183: 2533-2540.
165. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 322: 271-275.
166. Chappert, P., and R. H. Schwartz. 2010. Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 552-559.
167. Wells, A. D. 2009. New Insights into the Molecular Basis of T Cell Anergy: Anergy Factors, Avoidance Sensors, and Epigenetic Imprinting. *J Immunol* 12: 7331-7341.
168. Gorbachev, A. V., and R. L. Fairchild. 2004. CD4⁺ T cells regulate CD8⁺ T cell-mediated cutaneous immune responses by restricting effector T cell development through a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol.* 172: 2286-2295.
169. Gorbachev, A. V., and R. L. Fairchild. 2010. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells utilize FasL as a mechanism to restrict DC priming functions in cutaneous immune responses. *Eur. J Immunol.* 40: 2006-2015.

170. Cervantes-Barragan, L., S. Firner, I. Bechmann, A. Waisman, K. Lahl, T. Sparwasser, V. Thiel, and B. Ludewig. 2012. Regulatory T cells selectively preserve immune privilege of self-antigens during viral central nervous system infection. *J Immunol* 188: 3678-3685.
171. Hartmann, W., I. Haben, B. Fleischer, and M. Breloer. 2011. Pathogenic nematodes suppress humoral responses to third-party antigens in vivo by IL-10-mediated interference with Th cell function. *J Immunol*. 187: 4088-4099.
172. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10: 1969-1980.
173. Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, G. Zhu, P. Mottram, H. Xu, L. Chen, and W. Zou. 2006. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol*. 177: 40-44.
174. Blankenhaus, B., U. Klemm, M. L. Eschbach, T. Sparwasser, J. Huehn, A. A. Kuhl, C. Loddenkemper, T. Jacobs, and M. Breloer. 2011. *Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3+ regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice. *J Immunol* 186: 4295-4305.
175. Walsh, C. M., P. Smith, and P. G. Fallon. 2007. Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. *J Immunol*. 179: 4626-4634.
176. Krummel, M. F., and J. P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The journal of experimental medicine*. *J Immunol*. 182: 459-465.
177. Perrin, P. J., D. Scott, T. A. Davis, G. S. Gray, M. J. Doggett, R. Abe, C. H. June, and M. K. Racke. 1996. Opposing effects of CTLA4-Ig and anti-CD80 (B7-1) plus anti-CD86 (B7-2) on experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 65: 31-39.
178. Valk, E., C. E. Rudd, and H. Schneider. 2008. CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends Immunol*. 29: 272-279.
179. Malek, T. R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 453-479.
180. Ahmed, N. N., H. L. Grimes, A. Bellacosa, T. O. Chan, and P. N. Tsichlis. 1997. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 3627-3632.
181. Cantrell, D. A., and K. A. Smith. 1984. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 224: 1312-1316.
182. Yu, A., L. Zhu, N. H. Altman, and T. R. Malek. 2009. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity*. 30: 204-217.
183. Humrich, J. Y., H. Morbach, R. Undeutsch, P. Enghard, S. Rosenberger, O. Weigert, L. Kloke, J. Heimann, T. Gaber, S. Brandenburg, A. Scheffold, J. Huehn, A. Radbruch, G. R. Burmester, and G. Riemekasten. 2010. Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107: 204-209.
184. Berretta, F., J. St-Pierre, C. A. Piccirillo, and M. M. Stevenson. 2011. IL-2 contributes to maintaining a balance between CD4+Foxp3+ regulatory T cells and effector CD4+ T cells required for immune control of blood-stage malaria infection. *J Immunol*. 186: 4862-4871.
185. Scheffold, A., K. M. Murphy, and T. Höfer. 2007. Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat. Immunol*. 8: 1285-1287.
186. Sojka, D. K., A. Hughson, T. L. Sukiennicki, and D. J. Fowell. 2005. Early kinetic window of target T cell susceptibility to CD25+ regulatory T cell activity. *J Immunol*. 175: 7274-7280.
187. Kaminitz, A., E. M. Askenasy, I. Yaniv, J. Stein, and N. Askenasy. 2010. Apoptosis of purified CD4+ T cell subsets is dominated by cytokine deprivation and absence of other cells in new onset diabetic NOD mice. *PLoS. One*. 5: e15684.
188. Snow, A. L., P. Pandiyan, L. Zheng, S. M. Krummey, and M. J. Lenardo. 2010. The power and the promise of restimulation-induced cell death in human immune diseases. *Immunol. Rev.* 236: 68-82.
189. Lopes, M. F., and G. A. DosReis. 1995. Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas' disease. *Braz. J Med. Biol. Res.* 28: 913-918.
190. Fallon, P. G., P. Smith, and D. W. Dunne. 1998. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *Eur. J Immunol* 28: 1408-1416.
191. Lewis, D. E., D. S. Tang, A. Adu-Oppong, W. Schober, and J. R. Rodgers. 1994. Anergy and apoptosis in CD8+ T cells from HIV-infected persons. *J Immunol* 153: 412-420.

192. Gilbertson, B., J. Zhong, and C. Cheers. 1999. Anergy, IFN-gamma production, and apoptosis in terminal infection of mice with *Mycobacterium avium*. *J Immunol* 163: 2073-2080.
193. Gavrilescu, L. C., and E. Y. Denkers. 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol*. 167: 902-909.
194. Gavrilescu, L. C., and E. Y. Denkers. 2003. Apoptosis and the balance of homeostatic and pathologic responses to protozoan infection. *Infect Immun* 71: 6109-6115.
195. Smith, K. A. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240: 1169-1176.
196. Sharma, S. D., J. M. Hofflin, and J. S. Remington. 1985. In vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 135: 4160-4163.

Apéndice.

1. DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

Se mezclan las siguientes sales en la cantidad necesaria para obtener las concentraciones que se describen: NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM.

2. PBS (Phosphate Buffered Saline) para purificación de anticuerpos

Se mezclan las siguientes sales en la cantidad necesaria para obtener las concentraciones que se describen: NaH₂PO₄ 0.02 M, NaCl 0.15 M, pH 7.8.

3. Disolución de Lisis de Eritrocitos.

Se mezclaron las siguientes sales en la cantidad necesaria para obtener las concentraciones que se describen: NH₄Cl 0.15M, KHCO₃ 10mM, EDTA 0.1mM.

4. Disolución para separación por "cell sorting".

Se prepara una disolución al 1X antibióticos (penicilina y estreptomina) en DPBS.

5. Disolución de lavado para Inmunofluorescencias

Se prepara una disolución al 1% SFB + 0.1% NaN₃ con DPBS (Los ensayos en donde se determina viabilidad se usa la solución sin NaN₃).

6. Disolución de separación para perlas magnéticas.

Se prepara una disolución con PBS (NaCl 154 mM, KH₂PO₄ 1.0 mM, Na₂HPO₄ 2.95 mM) + 2 mM EDTA + 0.5% BSA y se desgasifica por 3 h.

NOTA: Todas las disoluciones se esterilizan en el autoclave antes de ser usadas o bien antes de agregar el SFB o la BSA.