



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Obtención de un ratón doble transgénico  
(Foxp3EGFP/IFN-gamma KO) para el estudio de las  
células T reguladoras durante la toxoplasmosis.**

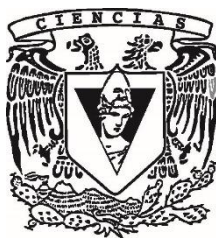
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**José Carlos Blanco Camarillo**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Rafael Simitrio Saavedra Durán**

**Ciudad Universitaria, CD. MX. (2016)**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Hoja de datos del jurado

## 1. Datos del alumno

**Nombre:** José Carlos Blanco Camarillo

**Teléfono:** 044-55-18-45-92-76

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de ciencias**

**Carrera:** Biología

**Número de cuenta:** 309049197

## 2. Datos del tutor (secretario)

**Grado y nombre:** Dr. Rafael Simitrio Saavedra Durán

## 3. Presidente del jurado

**Grado y nombre:** Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez

## 4. Vocal del jurado

**Grado y nombre:** Dra. Jacqueline Fernández Vargas

## 5. Suplente 1

**Grado y nombre:** M.V.Z. Georgina Díaz Herrera

## 6. Suplente 2

**Grado y nombre:** Bíol. Gonzalo Asariel Acero Galindo

## 7. Datos del trabajo escrito

**Título:** Obtención de un ratón doble transgénico (Foxp3EGFP/IFN-gamma KO) para el estudio de las células T reguladoras durante la toxoplasmosis.

**Número de páginas:** 86

**Año:** 2016

El presente trabajo fue financiado por las siguientes instituciones y proyectos:

CONACYT: 102984 y 251116

DGAPA, UNAM: IN-209111 e IN-210914

## **Agradecimientos**

La presente tesis la dedico a mis padres por su apoyo incondicional, su comprensión, su amor, sus enseñanzas, y sus regaños, los cuales me han guiado a ser lo que soy. Muchas gracias por todo, los amo. A mi hermano Juan por ser mi ejemplo a seguir, por su amistad y consejos, aunque aun te falta entrenar más en FIFA, te quiero mucho.

También quiero agradecer a Soni por todo su cariño, gracias por estar conmigo siempre siempre siempre. Gracias a sammy, a logan a goofy y a saori por siempre sacarme una sonrisa. A mis abuelitos, mis tios, mis primos y demás familia que siempre ha estado conmigo, gracias.

A todos mis amigos que conozco desde la infancia hasta la facultad, muchas gracias por todo su apoyo, amistad y vivencias. A mis a todos los profesores y personas que fueron parte de mi camino.

Al doctor Rafael Saavedra y a la Dra Jacqueline Fernández por todo su apoyo, consejos y enseñanzas que me brindaron para poder lograr esto, gracias por su confianza y amistad. Los admiro mucho.

A mis amigos del laboratorio por sus consejos, aprendí mucho de ustedes.

Agradezco a la Dra. Jacqueline Fernández Vargas, a la M.V.Z. Georgina Díaz Herrera, al M. en C. Carlos Castellanos Barba y al L.I. David Rico Malfavón por su orientación y apoyo técnico durante la realización de este proyecto.

# ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS.....	8
II.	INTRODUCCIÓN.....	9
II.1.	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
II.1.1.	Biología del parásito.....	9
II.1.1.1.	Taquizoítos.....	11
II.1.1.2.	Quistes (bradizoítos).....	12
II.1.1.3.	Ooquistes (esporozoítos).....	13
II.1.2.	Ciclo biológico.....	14
II.1.3.	Consecuencias.....	15
II.1.4.	Epidemiología.....	16
II.1.5.	Cepas.....	17
II.1.6.	Respuesta inmune.....	19
II.2.	<i>Células T reguladoras</i> .....	23
II.2.1.	Tipos de células T reguladoras.....	24
II.2.1.1.	Células T reguladoras naturales.....	24
II.2.1.2.	Células T reguladoras adaptativas o inducidas.....	25
II.2.2.	Mecanismos de supresión.....	26
II.3.	<i>El IFN-<math>\gamma</math></i> .....	29
II.3.1.	Los interferones.....	29
II.3.2.	Características del IFN- $\gamma$ .....	30
II.3.3.	Vía de señalización.....	31
II.3.4.	Importancia del IFN- $\gamma$ en la respuesta inmune contra patógenos.....	32
III.	JUSTIFICACIÓN.....	36
IV.	OBJETIVO.....	37
V.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	37

<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>VI.1. <i>Ratones</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>VI.2. <i>Cruzas</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>VI.3. <i>Identificación de ratones transgénicos</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>VI.3.1. <i>Obtención de sangre</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>VI.3.2. <i>Inmunofluorescencia en sangre total</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>VI.3.3. <i>Extracción de ADN</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>VI.3.4. <i>Cuantificación de ADN</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>VI.3.5. <i>Reacciones de PCR</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>VI.3.6. <i>Electroforesis y revelado</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>VI.4. <i>Cuantificación de células T reguladoras en sangre de ratones infectados</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>VI.4.1. <i>Obtención de quistes e infección</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>VI.4.2. <i>Obtención de sangre</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>VI.4.3. <i>Inmunofluorescencia en sangre total</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>VII.1. <i>Detección de células T reguladoras por citometría de flujo</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>VII.2. <i>Montaje de PCR para identificar ausencia o presencia del gen de IFN-<math>\gamma</math></i>.....</b>	<b>48</b>
<b>VII.3. <i>Estrategia para obtener la cepa doble transgénica</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>VII.4. <i>Cruzas</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>VII.4.1. <i>Obtención de la F1</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>VII.4.2. <i>Obtención de la F2</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>VII.4.3. <i>Obtención de la F3</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>VII.4.4. <i>Obtención de la F4</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>VII.5. <i>El papel del IFN-<math>\gamma</math> sobre las células T reguladoras durante la fase aguda de la toxoplasmosis</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>IX. REFERENCIAS. ....</b>	<b>78</b>



## I. ABREVIATURAS.

Células presentadoras de antígenos.....	(APC).
Ciclofilina 18.....	(Cyp18).
Especies reactivas de oxígeno.....	(ROS).
Factor de crecimiento transformante $\beta$ .....	(TGF- $\beta$ ).
Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .....	(TNF- $\alpha$ ).
Idoleamina 2,3dioxigenasa.....	(IDO).
Interferón gamma.....	(IFN- $\gamma$ ).
Interleucina.....	(IL).
Knock-in.....	(KI).
Knock-out.....	(KO).
Neuropilin-1.....	(Nrp-1).
Óxido nítrico sintasa.....	(iNOS).
Óxido nítrico.....	(NO).
Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.....	(RFLP).
Proteínas GTPasas.....	(IRGs).
Receptores de tipo toll.....	(TLR).
Sistema nervioso central.....	(SNC).
T reguladoras adaptativas o inducidas.....	(iTregs).
T reguladoras naturales.....	(nTregs).
T reguladoras.....	(Tregs).
<i>Toxoplasma gondii</i> .....	( <i>T. gondii</i> ).
Transductores de señal y activador de transcripción.....	(STAT).

## II. INTRODUCCIÓN

### II.1. *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Mancaux en el norte de África (Halonen and Weiss, 2013). Es un protozooario intracelular obligado y tiene 3 diferentes estadios: ooquistes (esporozoítos), taquizoítos y quistes (bradizoítos) (Halonen and Weiss, 2013; Montoya, 2004). La clasificación taxonómica de este parásito es la siguiente:

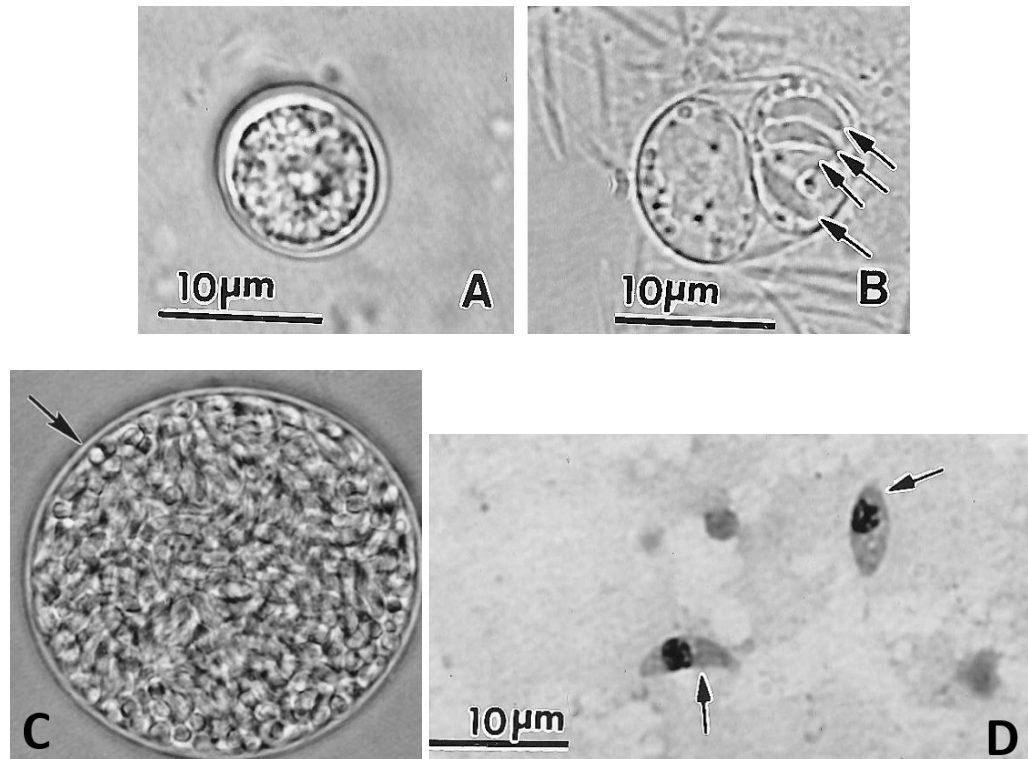
Categoría taxonómica	Taxón
Phylum	Apicomplexa
Clase	Sporozoasida
Subclase	Coccidiasina
Orden	Eimeriorina
Familia	Toxoplasmatidae
Género	<i>Toxoplasma</i>
Especie	<i>gondii</i>

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Toxoplasma gondii*.

Algunos de los factores que pueden afectar el curso de la infección en seres humanos y animales son: el tamaño del inóculo, virulencia de la cepa del parásito, genética del huésped, sexo y estatus inmunológico (Montoya, 2004).

#### II. 1.1. Biología del parásito.

Existen tres estadios infectivos de *T. gondii*: 1) los taquizoítos, que son invasivos y se dividen rápidamente, 2) los bradizoítos, que se dividen lentamente dentro de los quistes y 3) los esporozoítos, que están protegidos dentro de un ooquiste (Fig. 1) (Gangneux and Dardé, 2012).



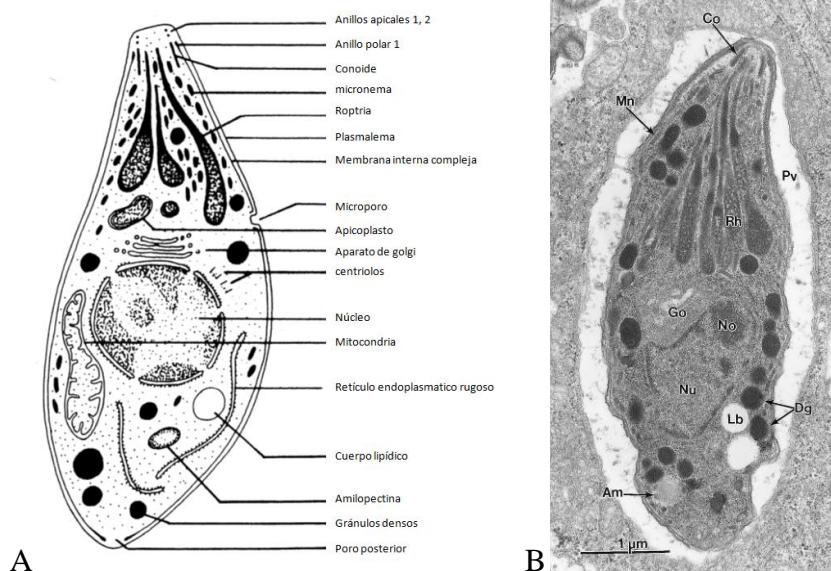
**Figura 1. Estados biológicos de *T. gondii*.** A) Ooquiste no esporulado. B) Ooquiste esporulado con dos esporoquistes y cada uno de ellos con cuatro esporozoítos (señalados con las flechas). C) Quiste de cerebro de ratón (la flecha nos indica la pared del quiste que encierra a los bradizoítos). D) Taquizoítos. Imágenes tomadas y modificadas de (Dubey et al., 1998).

Las tres distintas formas del parásito están limitadas por una membrana compleja, llamada película, la cual está asociada con un citoesqueleto que participa en la integridad estructural y la motilidad de la célula (Black and Boothroyd, 2000). Poseen núcleo, mitocondria, aparato de Golgi, ribosomas, retículo endoplasmático, y un plástido unido a la membrana llamado apicoplasto que podría ser el resultado de una posible adquisición del parásito a través de una endosimbiosis (Dubey et al., 1998). En su parte apical tiene una estructura del citoesqueleto especializada conocida como conoide, que participa durante la invasión de células y que caracteriza al phylum Apicomplexa (Gangneux and Dardé, 2012)

### II.1.1.1. Taquizoíto.

Los taquizoítos están presentes durante la fase aguda y miden entre 2-4  $\mu\text{m}$  de ancho y 4-8  $\mu\text{m}$  de largo (Fig. 2). Tienen una forma de media luna y en este estado el parásito se multiplica rápidamente. Puede entrar a cualquier célula nucleada por una penetración activa y forma vacuolas citoplasmáticas. Los taquizoítos pueden diseminarse vía el torrente sanguíneo e infectar diferentes tejidos, incluyendo el sistema nervioso central, ojos, esqueleto, músculo del corazón y placenta (Montoya, 2004). Este estadio es característico de la fase aguda de la infección (Gangneux and Dardé, 2012).

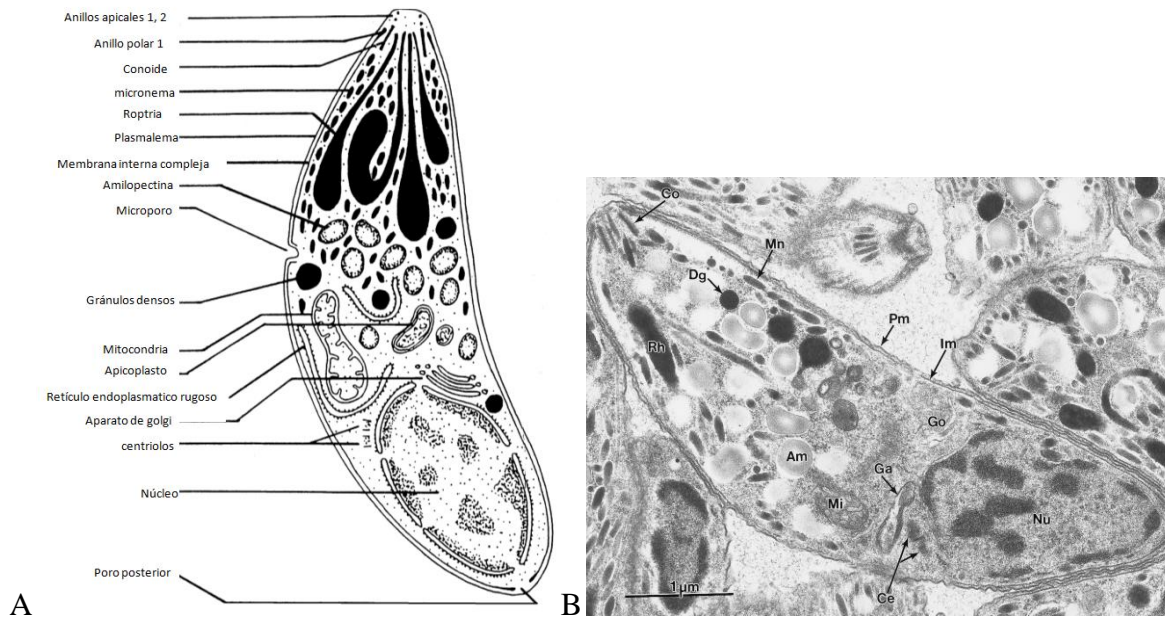
Esta fase infectiva se replica cada 6 a 8 horas por un proceso llamado endodiogenia. Se replican dentro de un compartimento intracelular denominado vacuola parasitófora, la cual evita la fusión con la vía endolisosomal de la célula huésped y es esencial para el crecimiento intracelular del parásito (Halonen and Weiss, 2013).



**Figura 2. Taquizoíto de *T. gondii*.** A: Esquema de la estructura de un taquizoíto. B: Micrografía electrónica de transmisión de un taquizoíto. Gránulos de amilopectina (Am), conoide (Co), gránulos densos (Dg), aparato de golgi (Go), micronema (Mn), nucléolo (No), Núcleo (Nu), vacuola parasitófora (Pv); roptria (Rh). Imágenes tomadas y modificadas de (Dubey et al., 1998).

### II.1.1.2. Quiste (Bradizoíto).

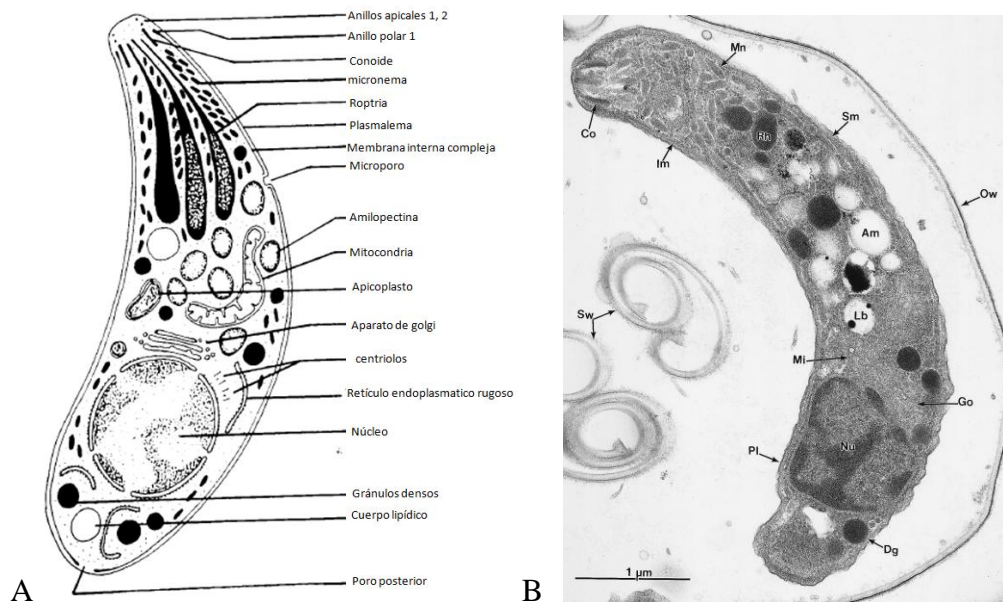
Los bradizoítos son el resultado de la conversión de los taquizoítos y tienen un metabolismo latente, bien adaptado para sobrevivir largo tiempo (Gangneux and Dardé, 2012). Por este motivo, tienden a multiplicarse lentamente y a diferencia de los taquizoítos, los bradizoítos se pueden encontrar únicamente durante la fase crónica de la infección. Durante esta fase, los bradizoítos se encuentran dentro de quistes con una pared gruesa que contiene glicoproteínas del parásito llamadas CST1, la cual es importante en la estabilidad y protección de los quistes contra la respuesta inmune del huésped. Estos quistes persisten por años o incluso toda la vida del hospedero. Los quistes pueden contener miles de bradizoítos y generalmente se encuentran en músculo y cerebro (Fig. 3) (Halonen and Weiss, 2013).



**Figura 3. Bradizoíto de *T. gondii*.** A: Esquema de la estructura de un bradizoíto. B: Micrografía electrónica de transmisión de un bradizoíto. Gránulos de amilopectina (Am), centriolos (Ce), conoide (Co), gránulos densos (Dg), apicoplasto (Ga), aparato de golgi (Go), micronema (Mn), membrana interna (Im), mitocondria (Mi), Núcleo (Nu), plasmalema (Pm); roptria (Rh). Imágenes tomadas y modificadas de (Dubey et al., 1998).

### II.1.1.3. Ooquiste (esporozoíto).

Los ooquistes son el resultado de la multiplicación sexual de *T. gondii* en el epitelio del intestino de los felinos. Algunos días después de la infección, los ooquistes son excretados en las heces de los felinos y se convierten rápidamente en infectivos al esporular. Los ooquistes son ovoides con una medida de 11 x 13  $\mu\text{m}$  de tamaño y tiene dos esporoquistes (6 x 8  $\mu\text{m}$ ), cada uno con cuatro esporozoítos (2 x 6-8  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 4). Los ooquistes de *T. gondii* son altamente resistentes al entorno; esta resistencia engloba factores químicos o físicos de estrés, incluyendo desinfectantes como rayos UV, ozono y productos a base de cloro. Sin embargo, los ooquistes son rápidamente inactivados al ser expuestos a temperaturas  $\geq 60^\circ\text{C}$  (Dumetre et al., 2013). Los ooquistes pueden permanecer infectivos hasta por un año en el medio ambiente (Montoya, 2004).



**Figura 4. Esporozoíto de *T. gondii*.** A: Esquema de la estructura de un esporozoíto. B: Micrografía electrónica de transmisión de un esporozoíto. Gránulos de amiloplectina (Am), conoide (Co), gránulos densos (Dg), aparato de golgi (Go), micronema (Mn), membrana interna (Im), mitocondria (Mi), pared del ooquiste (Ow), plasmalema (Pl), microtúbulo subpelicular (Sm), pared del esporoquiste (Sw); roptria (Rh). Imágenes tomadas y modificadas de (Dubey et al., 1998).

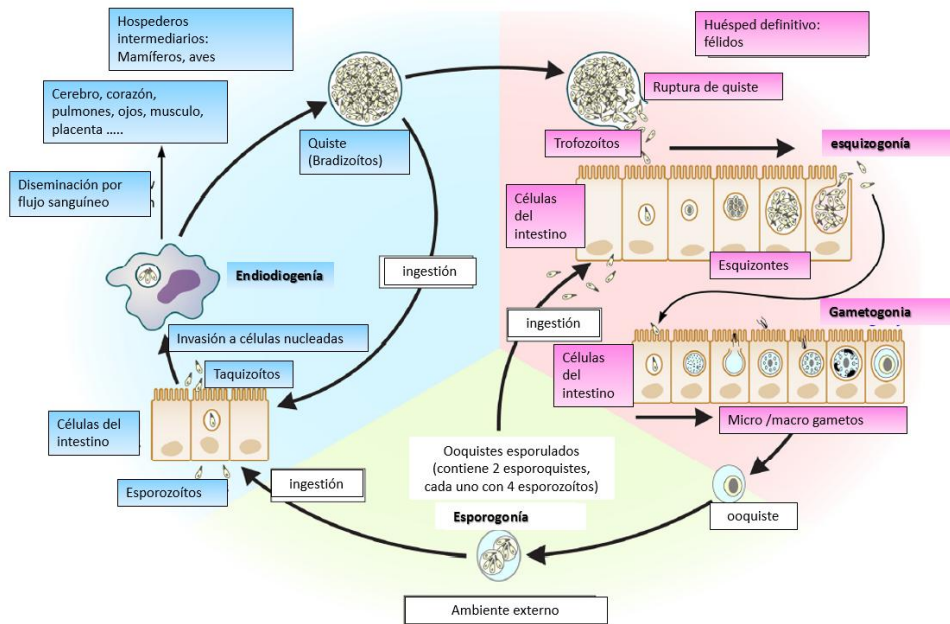
### **II.1.2. Ciclo biológico.**

El ciclo de *T. gondii* comprende una fase de reproducción sexual y una fase de reproducción asexual (Black and Boothroyd, 2000). La reproducción sexual se produce sólo en la familia de félidos, la cual comprende los gatos domésticos, leones, linceos, etc. Después de la ingestión de los quistes presentes en los tejidos de un hospedero intermediario, la pared de los quistes es destruida por enzimas gástricas. El primer paso es por formación de gametos femeninos y masculinos (gametogonia). Después de la fecundación, los ooquistes formados dentro de los enterocitos son liberados y excretados en las heces de los gatos como ooquistes no esporulados. El proceso de esporogonia se produce después de unos días en el ambiente externo. Esto implica una reducción meiótica y cambios morfológicos que llevan a la formación de ooquistes esporulados con dos esporoquistes, y cada uno de estos con cuatro esporozoítos haploides (Gangneux and Dardé, 2012).

Cuando los ooquistes son excretados en las heces de los gatos, esporulan en el ambiente y se vuelven infectivos. Cuando el huésped intermediario ingiere los ooquistes esporulados, se transforman en taquizoítos. Los taquizoítos penetran a las células nucleadas y rápidamente se replican, las células huésped se rompen cuando sobrepasa su tamaño y los taquizoítos que salen invaden células vecinas, que pueden causar destrucción de los tejidos (Fig. 5) (Gangneux and Dardé, 2012; Schlüter et al., 2014).

Como consecuencia a la infección ocurre una respuesta inmune contra el parásito que es acompañada de la transformación de taquizoítos a bradizoítos que a su vez forman quistes que persisten toda la vida en el huésped, principalmente en tejido muscular y cerebro. (Schlüter et al., 2014).





**Figura 5. Ciclo biológico de *T. gondii*.** La fase sexual inicia en los felinos al ingerir oocistos o quistes de *T. gondii*, posteriormente en el epitelio intestinal ocurre la formación de gametos que dan origen a los oocistos, que son excretados en las heces de los gatos. Cuando el medio ambiente es adecuado los oocistos se vuelven infectivos para los hospederos intermediarios. Una vez que los hospederos intermediarios se infectan inicia la fase asexual y ocurre una transformación del parásito a taquizoítos para infectar células nucleadas. Como consecuencia de este fenómeno el huésped desarrolla una respuesta inmune contra el parásito provocando que los taquizoítos se conviertan en bradizoítos, los cuales forman quistes que pueden persistir en músculo y cerebro durante toda la vida del huésped. Imagen tomada y modificada de (Gangneux and Dardé, 2012).

### II.1.3. Consecuencias.

La infección con *T. gondii* es asintomática en la mayoría de las personas inmunocompetentes. Sin embargo, el 10% de la población muestra sintomatología. La manifestación clínica más típica es adenopatía cervical u occipital. Esta enfermedad caracterizada por linfadenopatía crónica provoca que los ganglios linfáticos aumenten de tamaño y puedan fluctuar durante meses. Con muy poca frecuencia puede ocurrir miocarditis, polimiositis, neumonitis, hepatitis, encefalitis (Montoya, 2004).

En los pacientes en condiciones de inmunosupresión, como pacientes con SIDA o que estén



sometidos a tratamientos de trasplante de órganos (Geita, 2012), hay reactivación de los quistes; el sistema nervioso central (SNC) es el sitio más afectado por la infección y pueden desarrollar encefalitis toxoplásmica, cambios en el estado mental y convulsiones, entre otros (Geita, 2012; Montoya, 2004).

La toxoplasmosis aguda durante el embarazo es asintomática en la mayoría de las mujeres (Montoya, 2004) (Geita, 2012). Sin embargo, el parásito puede cruzar la placenta, infectar al feto, y causarle retinocoroiditis, hidrocefalia, retraso mental, convulsiones, o incluso muerte del feto. El riesgo de infección congénita y la gravedad de los síntomas dependen de la edad gestacional en el que la mujer embarazada adquiera la infección; si la infección se produce a etapas tempranas del embarazo, el riesgo de infección congénita es menor pero la gravedad de los síntomas será mayor (Geita, 2012; Montoya, 2004).

#### **II.1.4. Epidemiología.**

La infección por *T. gondii* es muy común, pues se ha reportado que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada (Gangneux and Dardé, 2012; Halonen and Weiss, 2013; Montoya, 2004). Las tres principales rutas de transmisión son: ingestión de alimentos o agua contaminados, infección congénita y por trasplante de órganos (Cenci-Goga et al., 2011).

La transmisión en humanos inicia con la ingestión o manejo de alimentos contaminados con los ooquistes excretados por gatos infectados (Montoya, 2004). Las variaciones en la seroprevalencia de *T.gondii* muestran una correlación con los hábitos de comida e higiene, así como número y presencia de gatos, clima y cultura (Halonen and Weiss, 2013; Montoya, 2004).

Un claro ejemplo de los hábitos de las persona es en Francia, ya que la prevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* es bastante elevada: alrededor del 84% de las mujeres embarazadas en París presentan anticuerpos anti *T. gondii*. Por otro lado, en Estados Unidos la prevalencia es de 32%, y en Londres un 22%. Estos datos parecen estar relacionados con el hábito de comer productos crudos o insuficientemente cocidos (Hill et al., 2005).

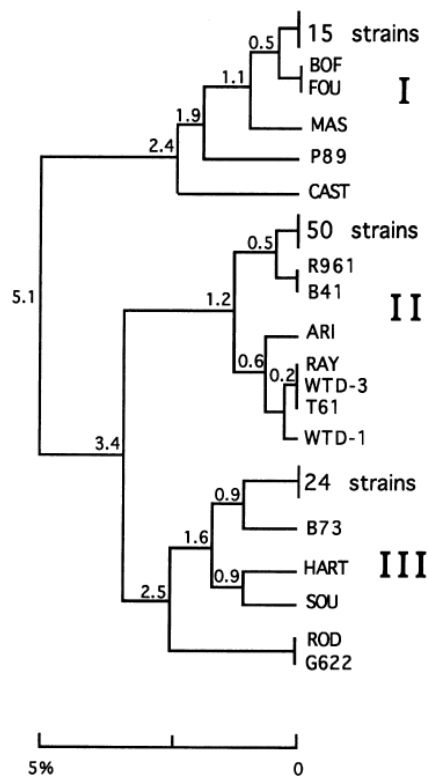
### **II.1.5. Cepas.**

Anteriormente la clasificación de las cepas de *T. gondii* se agrupaban en cepas virulentas y avirulentas, lo cual se demuestra dependiendo de la mortalidad observada en ratones infectados con el parásito (Kaufman, 1958). En estudios posteriores se describió que otro factor en la susceptibilidad con *T. gondii* dependía de la cepa de ratón estudiada, sugiriendo que el genotipo del hospedero también es importante en la susceptibilidad (Araujo, 1979).

En 1995 se reportaron análisis genotípicos de las poblaciones de *T. gondii* por medio de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), las cepas se agruparon dentro de tres linajes distintos (Fig. 6), en los cuales se encontró un índice de variación alrededor del 5% (Howe et al., 1995). Esto indica que los tres linajes de *T. gondii* comparten un polimorfismo genético muy pequeño (Geita, 2012).

Aunque *T. gondii* cuenta con una fase sexual, la cual podría dar pie a una gran diversidad genética entre las distintas cepas, el nivel elevado en la clonalidad de sus poblaciones sugiere que la propagación de *T. gondii* en la naturaleza es por la fase asexual. Para que se diera la recombinación sería necesario que un hospedero definitivo se infectara con dos cepas diferentes al mismo tiempo, sin embargo, la probabilidad es muy baja (Dardé, 2004).

Los tres linajes encontrados por RFLP's (I, II y III) difieren en virulencia y patrones epidemiológicos. El tipo I contiene cepas que crecen rápidamente, no forman quistes y son altamente virulentas; estas cepas se han aislado principalmente de animales de granja (Dardé, 2004). Las cepas del tipo II son medianamente virulentas dependiendo de la cepa de ratón; estas cepas fueron aisladas de casos de reactivación en pacientes con SIDA (Dardé, 2004; Montoya, 2004). El tipo III fue aislado de animales salvajes y raramente aislado de casos humanos (Dardé, 2004); conllevan una infección crónica y tienen un nivel de replicación parecida a las del tipo II, por lo tanto no son virulentas (Sullivan, 2012). Durante esta tesis se ocupó la cepa ME49, la cual se encuentra dentro del tipo II.



**Figura 6. Cepas de *T. gondii* agrupadas en tres linajes: I, II, III.** La escala horizontal está estimada en el porcentaje de divergencia de las secuencias de los nucleótidos. Imagen tomada y modificada de (Howe et al., 1995).

### II.1.6. Respuesta inmune.

*Toxoplasma gondii* desencadena una fuerte respuesta inmune de tipo Th1 en el modelo murino (Denkers, 2003; Montoya, 2004). Esta infección es caracterizada por la inducción de reguladores intracelulares que son necesarios para la diferenciación de la respuesta Th1 tales como T-bet, los transductores de señal y activador de transcripción (STAT) 1 y 4 (Denkers, 2003). Esta respuesta de resistencia al parásito depende de la producción de interleucina (IL) -12 e IFN- $\gamma$  (Gaddi, 2007; Gazzinelli, 2014; Halonen and Weiss, 2013).

El sistema inmune reconoce al parásito indirectamente por dos principales mecanismos: 1) los taquizoítos secretan ciclofilina 18 (Cyp18) la cual es detectada por el receptor de quimiocinas CCR5 que se encuentra en macrófagos y células dendríticas; CCR5 al ser activado induce una cascada de señalización para la producción de IL-12 (Ibrahim et al., 2010).

2) El segundo mecanismo ocurre cuando el parásito secreta profilina que a su vez interacciona con el receptor de tipo Toll (TLR) 11 (Yarovinsky, 2005) y TLR 12 (Gazzinelli, 2014), provocando una cascada de señalización intracelular por MYD88 (Pollard, 2009) la cual activa la transcripción de STAT 4 y finalmente activa el gen de la IL-12 (Cai et al., 2000).

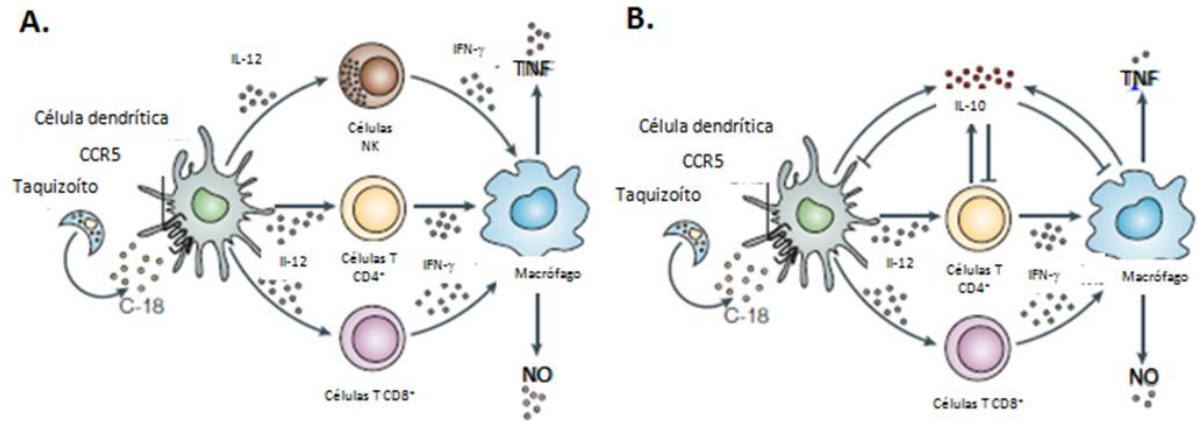
Se ha reportado que en ratones que carecen de CCR5 y TLR 11 producen menor cantidad de IL-12 e IFN- $\gamma$  provocando un aumento en la susceptibilidad durante la toxoplasmosis (Khan et al., 2006; Pollard, 2009). Lo mismo se ha observado en ratones MYD88<sup>-/-</sup>, que mueren rápidamente por encefalitis, lo que demuestra que MYD88 es esencial para desencadenar la cascada de señalización adecuada para la protección del hospedero (Torres

et al., 2013).

La IL-12 inicialmente es producida por macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Esta citocina es indispensable para activar STAT 4 y promover la diferenciación Th1 (Denkers, 2003), aunque en el transcurso de la infección también la IL-12 puede ser producida por células T que expresen el factor de transcripción T-bet (Denkers, 2003), el cual desarrolla una respuesta celular Th1 (Harms Pritchard et al., 2015).

Durante la fase aguda la IL-12 producida primero actúa sobre las células NK para activarlas y producir IFN- $\gamma$ , ya que son requeridas para desencadenar la respuesta inmune dependiente de IFN- $\gamma$  contra *T.gondii* (Fig. 7A) (Gigley, 2016; Hunter, 1994). Asimismo las células CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> también son capaces de producir IFN- $\gamma$  (Fig. 7A) (Filisetti and Candolfi, 2004); además otras células pueden producir IFN- $\gamma$  como linfocitos B, células NKT y células presentadoras de antígenos (APCs) como monocitos, macrófagos y células dendríticas. (Schroder, 2004).

El IFN- $\gamma$  es la citocina clave para la protección en la infección con *T. gondii* (Suzuki et al., 1985). Este IFN- $\gamma$  producido se encarga de activar a los macrófagos para la eliminación del parásito (Suzuki et al., 1985). El IFN- $\gamma$  induce la producción del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el cual activa la expresión de citocinas, quienes tienen un papel crucial para la atracción de leucocitos durante la respuesta inflamatoria (Fig. 7A ) (Silva et al., 2009).



**Figura 7. Control de la respuesta inmune durante la infección con *Toxoplasma gondii*.**

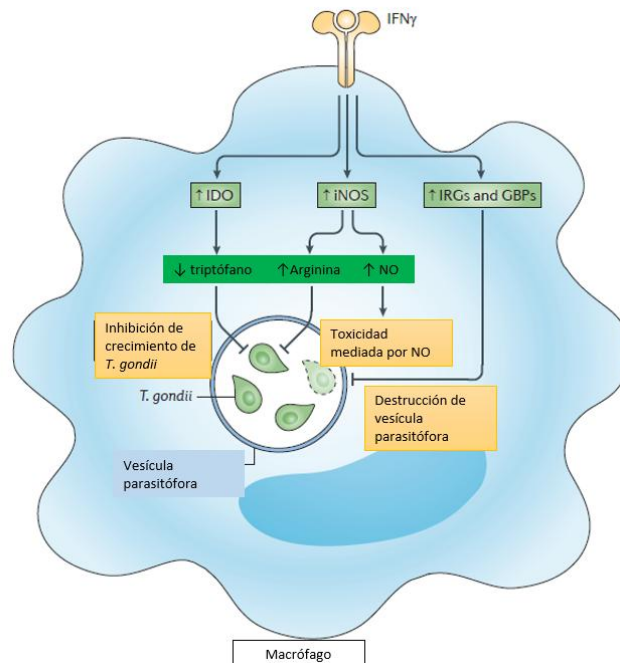
A: Inmediatamente después de la infección, las células dendríticas producen IL-12, la cual favorece la diferenciación de una respuesta Th1 que inicia la producción de IFN- $\gamma$ , el cual activa a los macrófagos para producir mecanismos antimicrobianos contra *T. gondii*. B: la IL-10 interviene como mecanismo inmunorregulador para impedir una respuesta inmune exacerbada. Imagen tomada y modificada de (Aliberti, 2005).

La respuesta inmune de tipo Th1 contra *T. gondii* es muy fuerte, lo que implicaría inflamación severa en múltiples órganos. Por lo tanto el huésped induce una respuesta para controlar los altos niveles de toxicidad producidos por el IFN- $\gamma$  y para mantener una respuesta efectora hacia el parásito, este proceso está conducido por la IL-10, la cual es una citocina inmunorreguladora que inhibe las funciones efectoras de las células T y células NK (Fig. 7B), bloquea las vías de procesamiento y presentación de antígenos, inhibe producción de citocinas y actividad citotóxica de células T (Aliberti, 2005; Gazzinelli, 1996). Lo anterior fue comprobado al usar ratones IL-10<sup>-/-</sup> los cuales son incapaces de contrarrestar los efectos inflamatorios producidos por la respuesta del IFN- $\gamma$  (Miller, 2009; Neyer, 1997).

Durante la fase crónica se ha observado que la producción de anticuerpos se mantiene por el resto de la vida del hospedero y tienen las funciones de opsonización de parásitos

extracelulares para que después sean fagocitados. En ratones que carecen de célula B, estos mueren durante la fase crónica (Halonen and Weiss, 2013).

Los mecanismos de acción del IFN- $\gamma$  para bloquear la replicación o llevar a cabo la destrucción del parásito son: 1) el efecto antiproliferativo mediado por la inducción de idoleamina 2,3dioxigenasa (IDO), la cual es una enzima que degrada el triptófano que es esencial para la replicación de *T.gondii*. 2) La óxido nítrico sintetasa (INOS) degrada arginina para producir óxido nítrico (NO), que es tóxico para el parásito. Además del NO, el IFN- $\gamma$  induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que al igual que el NO ayuda a eliminar al parásito. 3) El IFN- $\gamma$  puede inducir proteínas GTPasas (IRGs), que entran a las vacuolas parasitóforas y las rompen para que el parásito sea eliminado mediante la degradación con lisosomas (Fig. 8) (Yarovinsky, 2014).



**Figura 8. Mecanismos efectores mediados por el IFN- $\gamma$  para la eliminación del parásito en células infectadas.** El IFN- $\gamma$  tiene efecto pleiotrópico sobre las células infectadas para disminuir la replicación del parásito por la inducción de la idoleamina 2,3dioxigenasa (IDO), la inducción de la óxido nítrico sintasa (INOS) y la expresión de las proteínas GTPasas (IRGs). Imagen tomada y modificada de (Yarovinsky, 2014).

## **II.2. Células T reguladoras.**

El sistema inmune ha evolucionado para responder con una defensa efectiva contra los patógenos y reducir la inflamación provocada por el sistema inmune que causan los microorganismos comensales, respuestas inmunes contra antígenos propios y externos, así como trastornos metabólicos inflamatorios (Josefowicz et al., 2012).

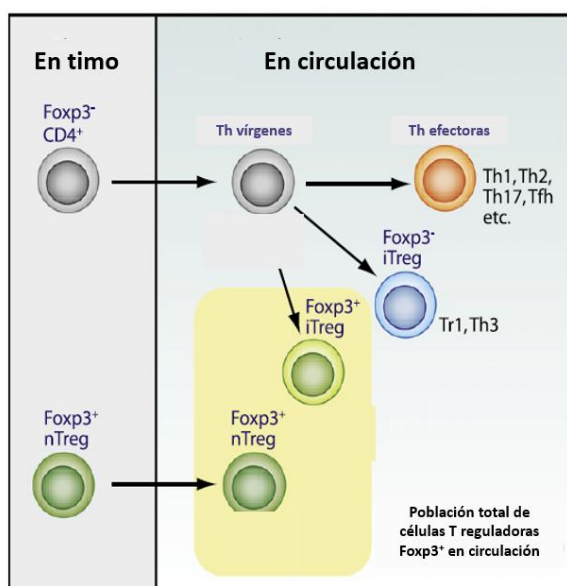
Las células T reguladoras mantienen la tolerancia inmunológica, el control de la respuesta inmune a antígenos no propios (Sakaguchi et al., 2007) y suprimen las respuestas inmunes excesivas que puede ser letales para el huésped (Sakaguchi et al., 2008).

Las células T reguladoras pertenecen a una subpoblación de células T CD4<sup>+</sup>, las cuales expresan constitutivamente CD25; esta molécula de superficie es el receptor de la IL-2 (De la Rosa, 2004), la cual es indispensable para mantener el desarrollo de las células Tregs. La IL-2 es obtenida de la producción de las células T efectoras ya que aunque es necesaria para el mantenimiento de las Tregs, estas últimas no la producen (Boyman and Sprent, 2012; Wang, 2016; Yuan and Malek, 2012). Asimismo expresan el factor de transcripción Foxp3 que se ha denominado como el regulador maestro de las células T reguladoras para su desarrollo, diferenciación y el mantenimiento de sus actividades supresoras (Fontenot, 2003, 2005; Geita, 2012; Hori, 2003; Li, 2015; Ohkura and Sakaguchi, 2010). Esto se reportó por primera vez en 2003, en ratones “*scurfy*”, los cuales tienen una mutación ligada al cromosoma X, específicamente en el gen de Foxp3, provocándoles enfermedades linfoproliferativas con inflamación en múltiples órganos, y en los machos por ser hemicigotos, es letal llevándolos a la muerte entre las semanas 3-4 de edad (Hori, 2004; Lahl, 2007).



### II.2.1. Tipos de células T reguladoras.

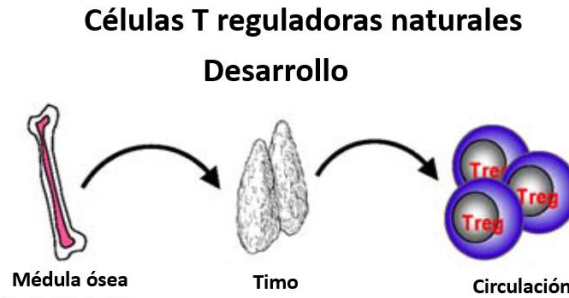
Existen dos principales tipos de las células T reguladoras: las células T reguladoras naturales (nTregs) y las células T reguladoras adaptativas o inducidas (iTregs), y dentro de estas últimas también se encuentran las Tregs de tipo Tr1 y Th3 (Fig. 9) (Gratz et al., 2013).



**Figura 9. Generación de células T reguladoras naturales y adaptativas.** Las nTregs se diferencian en timo y posteriormente migran a circulación. Las iTregs Foxp3<sup>+</sup> se diferencian en órganos linfoides secundarios. Por lo tanto la población de células Tregs Foxp3<sup>+</sup> comprende las iTreg y nTreg. Imagen tomada y modificada de (Curotto de Lafaille, 2009).

#### II.2.1.1. Células T reguladoras naturales.

Las células Tregs naturales (nTregs) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> tienen origen en el timo (Fig. 10) (Peterson, 2012). El mecanismo que determina la elección entre la generación de Tregs y células T autorreactivas ocurre durante el proceso de selección negativa, sin embargo aún no está bien definido (Gratz et al., 2013). En circulación, las células Tregs naturales comprenden alrededor del 5-10% de las células CD4<sup>+</sup> en órganos linfoides (Sakaguchi and Sakaguchi, 1995).



**Figura 10. Proceso para la generación de células T reguladoras naturales  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ .** Las células precursoras  $CD4^+$  derivadas de médula ósea se desarrollan hacia nTregs por tener un buen acoplamiento del TCR a péptidos propios con el MHC y se les induce expresión de Foxp3. Imagen tomada y modificada de (Becker and Stoll, 2006)

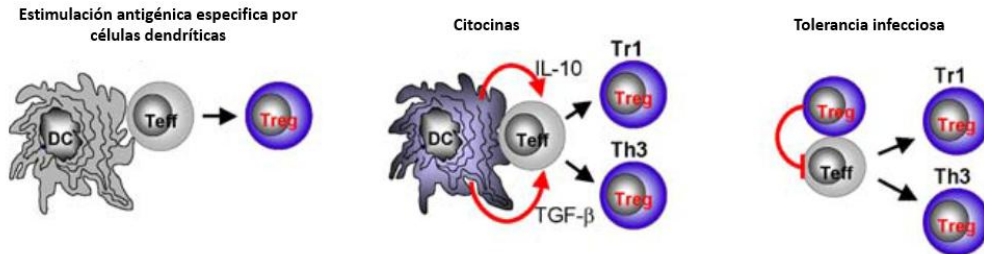
Las nTregs tienen la capacidad de supresión sobre diversos tipos celulares como células  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , células dendríticas, células NKTs, monocitos y macrófagos, células B, células cebadas, basófilos, eosinófilos y osteoblastos (Peterson, 2012). El fenotipo de las nTregs está dado por la combinación de marcadores de activación y diferenciación, algunos de ellos son: Foxp3, CD25, CTLA-4, GITR, CD62L y OX40 (Becker and Stoll, 2006; Nocentini, 2007; Walunas et al., 2016). También existen otros marcadores que las células nTregs expresan a niveles muy altos en comparación con las iTregs; entre estos marcadores se encuentran: PD-1, Nrp1, Helios y CD73 (Lin and Chen, 2013).

#### II.2.1.2. Células T reguladoras adaptativas.

Las células T reguladoras adaptativas o inducidas (iTregs) se originan en circulación, fuera del timo (Becker and Stoll, 2006). Estas células iTregs son  $Foxp3^+$  y son generadas a partir de células  $CD4^+$  vírgenes por estimulación antigénica específica (Fig. 11). Asimismo las subpoblaciones Tr1 y Th3 son células iTregs  $Foxp3^-$  que también tienen capacidad supresora y se originan principalmente por la estimulación con citocinas (Becker and Stoll,

2006; Lin and Chen, 2013; Yadav and Stephan, 2013).

## Células T reguladoras adaptativas Desarrollo



**Figura 11. Proceso para la generación de células T reguladoras adaptativas/inducidas.** Las células iTregs se diferencian de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes que son sometidas a estimulación antigénica específica por células dendríticas. Asimismo esta diferenciación puede ocurrir por estimulación con citocinas supresoras o por la interacción contacto dependiente con células nTregs. Imagen tomada y modificada de (Becker and Stoll, 2006).

Las células iTregs Foxp3<sup>-</sup> de tipo Tr1 son productoras de IL-10 y son generadas por la estimulación de células CD4<sup>+</sup> vírgenes con IL-10, o con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD46 (Becker and Stoll, 2006). Por otro lado están las células Th3 que son productoras del factor de crecimiento transformante β (TGF-β) y se producen a partir de células CD4<sup>+</sup> vírgenes que son estimuladas con TGF-β (Fig.11). Otra manera de inducir células Tr1 o Th3 ocurre cuando las nTregs cambian de fenotipo a las células T suprimidas hacia células iTregs, y así controlar la respuesta inmune con TGF-β e IL-10 (Fig. 11) (Becker and Stoll, 2006; Dhamne, 2013).

### II.2.2. Mecanismos de supresión.

Diversos estudios apuntan que las células T reguladoras naturales Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> tienen la capacidad de suprimir la activación y/o expansión de múltiples tipos celulares del sistema inmune (Guzmán-Flores, 2013; Miyara, 2007). Estos mecanismos de supresión que usan las células Tregs pueden ser agrupados en 4 modelos de acción: supresión por

inhibición de citocinas, supresión por citólisis, supresión por interrupción metabólica y supresión por modificación de la función o maduración de células dendríticas (Vignali, 2008).

**Supresión por interrupción metabólica:** Las células T reguladoras  $\text{Foxp3}^+$  expresan constitutivamente el receptor para la IL-2 (CD25) en altos niveles, por lo tanto son competidoras muy eficientes para consumir la IL-2 provocando que las células T efectoras que no consuman IL-2 mueran por apoptosis (Fig. 12) (Shevach, 2009).

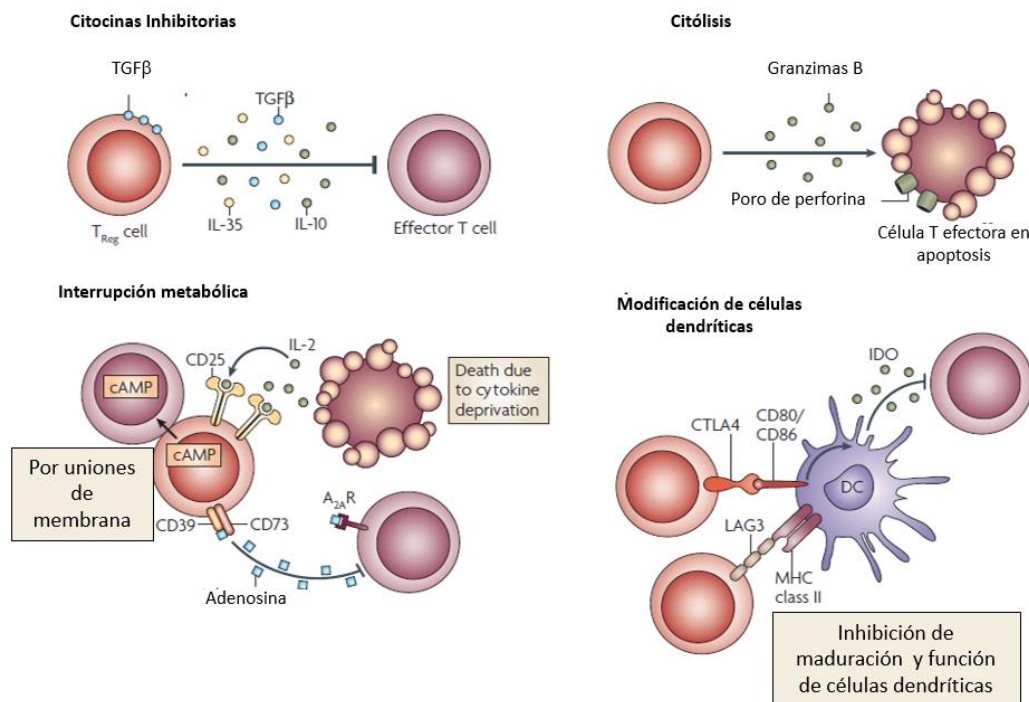
La liberación de adenosina es otro mecanismo propuesto recientemente, el cual involucra a las enzimas de membrana CD39 y/o CD73 que generan adenosina fuera de la célula (Sakaguchi, 2009). Esta adenosina es captada por el receptor 2A que se encuentra en las células T efectoras provocando supresión de sus funciones (Fig.12); asimismo las células Tregs pueden suprimir directamente las funciones de las células T efectoras por la transferencia de un mensajero de AMP cíclico por uniones de membrana (Fig. 12) (Vignali, 2008).

**Supresión por células dendríticas:** las células Tregs también pueden modificar la función y/o maduración de las células dendríticas. Esto ocurre cuando las células Tregs utilizan la molécula CTLA-4 para que interaccione con los receptores CD80 y/o CD86 de las células dendríticas, provocando que las células dendríticas produzcan indolamina 2,3 dioxigenasa, un potente inmunorregulador que cataboliza el triptófano a kinurenina y este último es tóxico para las células T efectoras ya que induce la producción de metabolitos proapoptóticos (Fig. 12) (Sakaguchi, 2009).

El gen 3 de activación de linfocitos (LAG3 o CD233) que es expresado por las células Tregs también juega un papel importante en la modificación de la maduración de las células

dendríticas, ya que LAG3 es homólogo al receptor CD4, el cual se une con gran afinidad al MHC de clase II provocando supresión en la maduración y en la capacidad inmunoestimuladora de las células dendríticas (Fig. 12) (Sakaguchi, 2009).

El receptor Neuropilin-1 (Nrp-1) se ha propuesto como otra molécula de las células Tregs que está involucrada en la supresión de células dendríticas. Nrp-1 promueve que las células Tregs y las células dendríticas duren más tiempo en contacto cuando están interaccionando para que la supresión sea efectiva (Mizui and Kikutani, 2008; Shevach, 2009).



**Figura 12. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras.** Las células T reguladoras tienen diversos mecanismos para suprimir la activación y/o expansión de diversos tipos celulares del sistema inmune, los cuales se agrupan en cuatro modelos: supresión por inhibición de citocinas, supresión por citólisis, supresión por interrupción metabólica y supresión por modificación de la función o maduración de células dendríticas. Imagen tomada y modificada de (Vignali, 2008).

**Supresión por citólisis:** en investigaciones anteriores se observó que a pesar de que las células T CD4<sup>+</sup> no tienen capacidad citolítica, las células Tregs pueden regular la expresión de granzimas B y de esta forma suprimir la función de las células T efectoras (Sakaguchi, 2009). Esta supresión dependiente de granzima B parece ser independiente a la supresión con perforinas que son inducidas por las células T reguladoras que desencadenan la apoptosis de las células T efectoras (Fig. 12) (Miyara, 2007; Vignali, 2008).

Otra molécula secretada por las Tregs es galectina-1, que se une a glicoproteínas incluyendo CD45, CD43 y CD7 (Shevach, 2009). Aunque no está claro si galectina-1 actúa como citocina o por contacto célula-célula, pero la interacción con las células T efectoras induce arresto celular, apoptosis y el bloqueo en la producción de citocinas proinflamatorias (Shevach, 2009).

**Supresión por citocinas:** las células T reguladoras pueden inducir supresión de células T por la producción de citocinas supresoras como la IL-10 y el TGF- $\beta$  (Becker and Stoll, 2006). Recientemente se ha encontrado que la IL-35 secretada por las células Tregs también tiene un papel supresor en el desarrollo y/o función de células T, células dendríticas y macrófagos (Fig. 12) (Vignali, 2008).

### **II.3. *El IFN- $\gamma$ .***

#### **II.3.1. Los interferones.**

Los interferones fueron descubiertos por Issacs y Lindermann en 1957 (Isaacs and Lindenmann, 1957). Ellos infectaron células de membrana corioalantoidea de huevos de gallina de gestación con el virus de la influenza, estas células produjeron un factor, el cual les confirió la capacidad de inducir resistencia a la infección, por lo tanto se describió como

un factor con actividad antiviral como mecanismo de defensa. Este factor fue llamado interferón (Isaacs and Lindenmann, 1957; Vilcek, 2006).

Existen tres tipos de interferones, los cuales están clasificados con base a sus características estructurales, a los receptores de superficie a los que se unen para activar las vías de señalización, y sus actividades biológicas (Kotenko, 2011). Los interferones de tipo I son estables a pH 2 y son producidos por una gran variedad de células (Meager, 2009); dentro del tipo I se incluye al IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\kappa$ , - $\omega$ , - $\epsilon$ , y estos se unen a receptores diméricos  $\alpha/\beta$  (Fensterl et al., 2015). El interferón de tipo II incluye solamente al IFN- $\gamma$ , el cual es inestable entre pH 2-10 y es producido sólo por algunos leucocitos (Meager, 2009; Tying, 1995). El IFN- $\gamma$  se une a un receptor tetramérico para desencadenar la vía de señalización (Fensterl et al., 2015). Los interferones de tipo III incluyen los IFN- $\lambda$ , que también son llamados IL-28 e IL-29. Este tipo III incluye a los IFN- $\lambda$ 1,- $\lambda$ 2, - $\lambda$ 3, y - $\lambda$ 4 (Lazear et al., 2015), los cuales se unen a un receptor heterodímero compuesto por las cadenas IFNLR1 e IL10RB (Fensterl et al., 2015).

### **II.3.2. Características del IFN- $\gamma$ .**

En 1965, Wheelock reportó que en cultivos celulares de leucocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina se obtenía un interferón con actividad antiviral (Wheelock, 1965), que posteriormente se conocería como IFN- $\gamma$ . El interferón  $\gamma$  es una de las citocinas más importantes del sistema inmune para la defensa contra infecciones virales y otros patógenos, ya que induce una gran variedad de respuestas fisiológicas que contribuyen en la respuesta inmune. Es una proteína de ~17 kDa y funciona como un homodímero glicosilado (Shtrichman, 2001). El gen del IFN- $\gamma$  se encuentra localizado en el cromosoma 10 en ratón

(Naylor, 1984) y que la estructura del gen está altamente conservada y contiene cuatro exones y tres intrones (Howard A, 1995).

Las principales células productoras del IFN- $\gamma$  son la células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (Howard A, 1995) y las células NK (Boehm, 1997). Sin embargo, hay evidencia que otras células también lo producen como: células B, células NKTs y células presentadoras de antígenos que incluyen monocitos, macrófagos y células dendríticas (Billiau, 2009; Schroder, 2004). En ratones, la capacidad de producir IFN- $\gamma$  varía con el fondo genético de las cepas: las cepas C3H y C57BL/6 producen niveles más altos de IFN- $\gamma$  en comparación con otras cepas como BALB/c y B10.D2 (Schroder, 2004; Shtrichman, 2001).

El receptor del IFN- $\gamma$  está constituido por dos cadenas de las proteínas IFNGR1 y dos cadenas de las proteínas IFNGR2. La parte extracelular del IFNGR1 contiene el dominio de unión al ligando y la porción intracelular contiene los dominios necesarios para la transducción de señales y el reciclamiento del receptor (Blouin, 2013). Los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> y IFNGR1<sup>-/-</sup> no muestran problemas durante el desarrollo embrionario y el sistema inmune parece desarrollarse normalmente, sin embargo, estos ratones tienen deficiencia en la resistencia contra infecciones parasitarias, virales y microbianas (Schroder, 2004; Sturge and Yarovinsky, 2014).

### **II.3.3. Vía de señalización.**

La principal vía de señalización del IFN- $\gamma$  es la vía Jak-Stat, la cual inicia cuando dos polipéptidos maduros del IFN- $\gamma$  se unen para formar un homodímero; éste se une al IFNGR1 y la unión del ligando al receptor induce la autofosforilación y activación de Jak2, lo cual permite la transfosforilación de Jak1 por Jak2 (Kalvakolanu, 2003). La activación



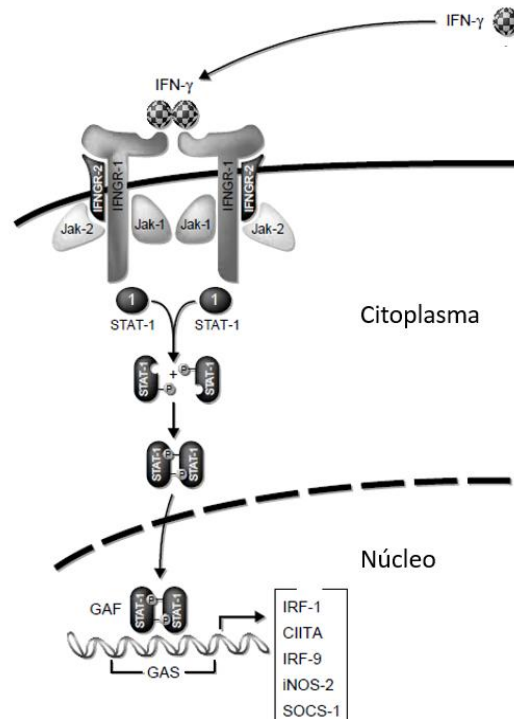
de Jak1 fosforila la tirosina 440 de cada cadena del IFNGR1 para formar dos sitios de acoplamiento para el dominio SH2 de las proteínas STAT1 inactivas; posteriormente Jak2 fosforila las tirosinas 701 de cada STAT1. Al estar fosforiladas las dos moléculas de STAT1, se induce la disociación con los receptores IFNGR1 formando un homodímero estable para migrar al núcleo y unirse a los elementos promotores en la región GAS del ADN que dan inicio a la regulación del IFN- $\gamma$  (Fig. 13) (Darnell, 1994; Kalvakolanu, 2003; Lang, 2012).

Existen factores que regulan la vía Jak-Stat, los cuales interfieren de manera negativa en la cascada de señalización para impedir la transducción de los productos finales de esta vía. Entre estos factores se encuentra la proteína supresora de la señalización de citocinas 1 (SOCS1) (Shtrichman, 2001), la cual se asocia con Jak1 y Jak2 para interferir con la actividad cinasa de tirosinas e inhibir la señalización del IFN- $\gamma$  río abajo; incluso SOCS1 se puede unirse a otras proteínas de la maquinaria de señalización para degradarlas por la vía de la Ubiquitina-Proteosoma (Schroder, 2004).

#### **II.3.4. Importancia del IFN- $\gamma$ en la respuesta inmune contra patógenos.**

Después de la infección con patógenos intracelulares, los macrófagos y las células dendríticas secretan IL-12, la cual promueve la producción de IFN- $\gamma$  por diferentes células, lo que provoca una diferenciación celular de tipo Th1. Por lo tanto la producción del IFN- $\gamma$  ayuda a incrementar y potencializar el desarrollo de la diferenciación celular Th1 por la inducción de T-bet, que es un factor de transcripción necesario para desarrollar una respuesta inmune Th1. De esta manera se realiza una retroalimentación para mantener y amplificar la producción del IFN- $\gamma$  (Harms, 2015; Lees, 2014; Lin, 2013). Por otro lado,

durante la producción de IFN- $\gamma$  se bloquea la expresión de la IL-4, lo cual inhibe el crecimiento de poblaciones celulares de tipo Th2 (Shtrichman, 2001).



**Figura 13. Vía de señalización del IFN- $\gamma$ .** El IFN- $\gamma$  en forma de homodímero se une al receptor IFNGR1, esta unión activa Jak2 y jak1 para inducir activación y translocación al núcleo del homodímero de STAT1, el cual se une a la región GAS del ADN. Imagen tomada y modificada de (Shtrichman, 2001).

El tráfico celular de leucocitos está coordinado por el IFN- $\gamma$ , que en sitios de inflamación regula la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas (Schroder, 2004). El IFN- $\gamma$  y el NO que se producen en el sitio de inflamación provoca dilatación local de los vasos sanguíneos y de este modo disminuye la velocidad de flujo local de la sangre lo que provoca recolección de sangre en los vasos con fugas, mientras tanto los leucocitos son conducidos por quimiotaxis para realizar extravasación en el tejido a través de interacciones

entre las moléculas de adhesión de leucocitos que se presentan en las superficies endoteliales (Lees, 2014).

El IFN- $\gamma$  regula las subunidades del proteosoma aumentando su actividad y la cantidad del repertorio de péptidos que pueden ser presentados por el MHC de clase I, por lo tanto IFN- $\gamma$  también regula las moléculas de superficie del MHC de clase I incrementando el potencial de las células T CD8<sup>+</sup> reconociendo péptidos extraños (Schroder, 2004). Asimismo el IFN- $\gamma$  puede mejorar la eficiencia en la vía de presentación de antígenos y promover la activación de células CD4<sup>+</sup>; además aumenta la expresión del MHC de clase II en células B, células dendríticas, macrófagos y monocitos (Schroder, 2004). Se ha reportado que el IFN- $\gamma$  suprime la producción de inmunoglobulinas de tipo IgG e IgE en células B y favorece la síntesis del isotipo IgG2a (Howard A, 1995). Respecto a las células NK, el IFN- $\gamma$  es esencial para que puedan activarse, desarrollarse y mantener su actividad citotóxica (Dalton et al., 1993)

Debido a que el IFN- $\gamma$  es el principal factor activador de macrófagos en circulación (Suzuki et al., 1985), éste activa diversas funciones de los macrófagos como citotoxicidad a células tumorales, actividad antimicrobianas y antivirales, aumento en la capacidad para eliminar patógenos intracelulares y aumento en el procesamiento y presentación de antígenos a linfocitos a través de la inducción del MHC (Howard A, 1995).

Después de que los macrófagos son activados por el IFN- $\gamma$  aumenta su capacidad microbicida que incluye la inducción de la óxido nítrico sintasa para producir óxido nítrico y eliminar virus, bacterias, protozoarios, hongos y células tumorales (MacMicking, 1997). También aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, además

se encargan de consumir el triptófano y la destrucción de patógenos por la vía lisosomal, estos mecanismos son similares en neutrófilos y monocitos (Lees, 2014).

### III. JUSTIFICACIÓN.

En estudios anteriores en nuestro laboratorio se ha observado que durante la infección aguda con *T. gondii* se induce una disminución en el número de células T reguladoras (Tenorio, 2011). Asimismo se observó que durante la infección con *T. gondii* existía una correlación inversa entre los altos niveles IFN- $\gamma$  y los bajos números de células Tregs, lo que sugiere que esta citocina es la responsable en la disminución de las células Tregs durante la infección aguda (Olguín, 2016). Para seguir con estos estudios se requiere un ratón doble transgénico que cuente con las siguientes características: que no produzcan IFN- $\gamma$  y que sus Tregs sean fluorescentes para evitar realizar tinciones intracelulares ya que el procedimiento de esta técnica implica que algunas células mueran, lo cual podría alterar los resultados.

En el laboratorio contamos con ratones BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup>, los cuales tienen la característica de que sus células T reguladoras son fluorescentes por tener el transgen de EGFP al final del gen de Foxp3, lo que facilita el estudio de las células Tregs ya que no se tiene que realizar ninguna tinción intracelular para identificarlas. Asimismo se tienen ratones BALB/c IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, que tienen interrumpido el gen de IFN- $\gamma$ , lo que provoca que no produzcan esta citocina. Por lo tanto, al tener estas dos cepas de ratones se harán cruza y retrocruza para obtener un ratón doble transgénico que tenga ambas características.

#### **IV. OBJETIVO.**

Obtener una cepa de ratón doble transgénico  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  por cruza y retrocruza entre el ratón knock-in  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$  y el ratón knock-out  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ , con el fin de facilitar el estudio del papel del  $\text{IFN-}\gamma$  en la disminución de las células T reguladoras durante la infección con *T. gondii*.

#### **V. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Montar un PCR para la identificación de ratones  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ .
2. Obtención de la cepa doble transgénica  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ .
3. Caracterización de la cepa doble transgénica  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ .
4. Analizar el papel del  $\text{IFN-}\gamma$  en la disminución de las células T reguladoras en sangre durante la infección con *T. gondii* usando los ratones dobles transgénicos obtenidos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

### VI.1. *Ratones.*

Los ratones son una herramienta experimental en la mayoría de los estudios de inmunología ya que reflejan la biología humana muy bien (Mestas, 2004). En el presente trabajo se utilizaron ratones transgénicos BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup> (C.Cg-Foxp3<sup>tm2tch/j</sup>) y BALB/c IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (C.129S7 (B6)-Ifng<sup>tm1Ts/J</sup>), los cuales son cepas “*Knock-In*” (KI) y “*Knock-out*” (KO) respectivamente.

Se usaron ratones transgénicos BALB/c IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> machos y BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup> hembras de 8-9 semanas de edad, los cuales se mantienen bajo las normas convencionales de la unidad de modelos biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los ratones BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup> (C.Cg-Foxp3<sup>tm2tch/j</sup>) son animales “*Knock-In*” que coexpresan el gen de la proteína EGFP junto al promotor de factor de transcripción Foxp3, el cual es específico de la población de células T reguladoras y por lo tanto las Tregs de estos ratones son fluorescentes. En cuanto a los ratones BALB/c IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (C.129S7 (B6)-Ifng<sup>tm1Ts/J</sup>) son ratones KO, que no expresan IFN- $\gamma$ , ya que se les insertó un gen de resistencia a neomicina en sustitución del gen de IFN- $\gamma$  (Dalton et al., 1993). El uso de animales para este protocolo fue aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

### VI.2. *Cruzas.*

Teniendo en cuenta las características de los ratones previamente descritas se realizaron las cruas esquematizadas en la Fig. 14. Además se tomó en cuenta la ubicación de los genes

Foxp3 e IFN- $\gamma$ , los cuales se encuentran en los cromosomas X y 10 respectivamente. Ya que Foxp3 es un gen ligado al sexo, se usaron hembras Foxp3<sup>EGFP</sup> porque al ser XX se garantizaría que todos los descendientes de la primera generación (F1) tendrían un cromosoma con el gen Foxp3<sup>EGFP</sup>. En cada generación obtenida se realizó la fenotipificación y genotipificación de cada individuo. Se inició con la cruce F0 en la que se utilizaron machos BALB/c IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> y hembras BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup> para obtener la F1, de esta generación obtenida únicamente se ocuparon los machos Foxp3<sup>EGFP</sup>/ IFN- $\gamma$ <sup>+/-</sup> para realizar las retrocruzas con hembras Foxp3<sup>EGFP</sup>. Al obtener la F2 se seleccionaron las hembras y machos con el genotipo Foxp3<sup>EGFP</sup>/ IFN- $\gamma$ <sup>+/-</sup> y se realizaron cruces entre estos para dar origen a la F3. De la F3 se obtuvieron los primeros ratones dobles transgénicos Foxp3<sup>EGFP</sup>/ IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, los cuales fueron seleccionados para hacer las cruces y obtener la F4 con el fin de expandir la colonia.

### **VI.3. *Identificación de animales transgénicos.***

#### **VI. 3.1. Obtención de sangre.**

Se corta la punta de la cola del ratón con tijeras de disección estériles y con la yema de los dedos se recorre oprimiendo la cola del ratón para obtener 1 gota de sangre (~5 $\mu$ L), la cual se deposita en un tubo Eppendorf con 1  $\mu$ L de heparina (1000 U/mL), se agita una vez el tubo para mezclar la sangre con la heparina y se mantiene en un recipiente con hielo a 4°C, hasta su uso.



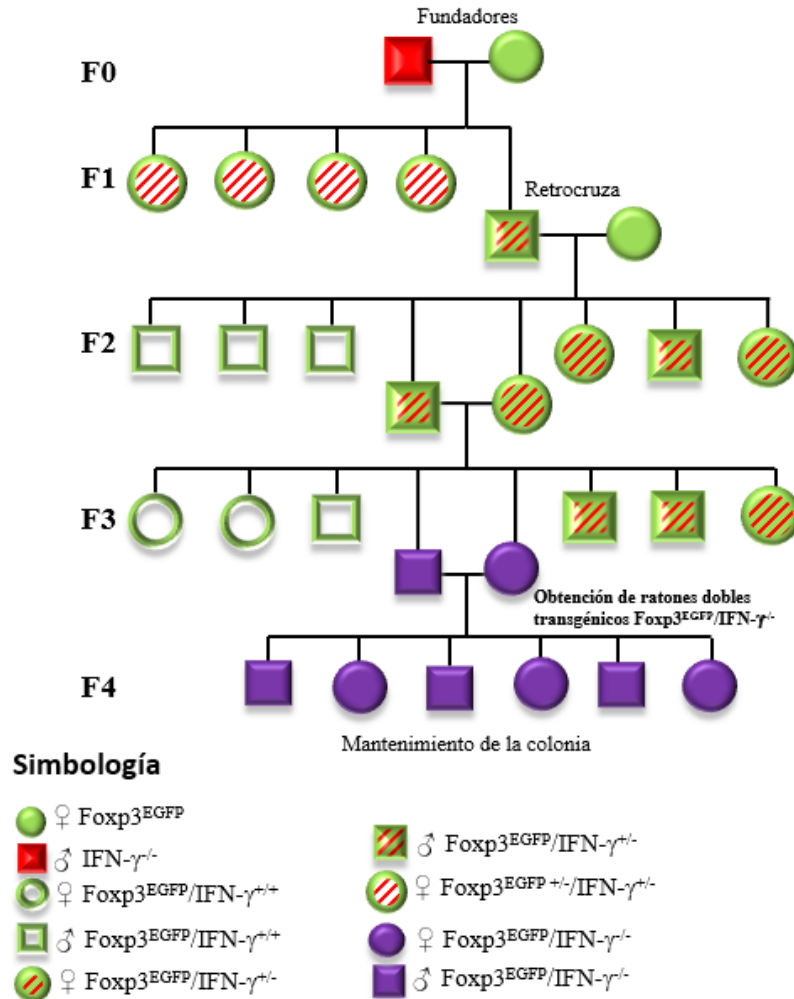


Figura 14. Esquema de las cruzas para la obtención del ratón doble transgénico Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>

### VI.3.2. Inmunofluorescencia en sangre total.

La sangre se centrifuga a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se agregan 45 $\mu$ L de buffer de lavado (DPBS, 1% de FCS y 0.1% de NaN<sub>3</sub>) con el anticuerpo Anti-CD4 PE (0.05 $\mu$ g) (Tonbo Biosciences), y se deja incubar 30 min a 4°C en la oscuridad. Al finalizar la incubación se agrega 1 ml de DPBS, y la muestra se analiza en el citómetro Attune azul/rojo o Attune azul/violeta (Applied Biosystems), capturando 2000 células Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>. Los datos se analizan usando el software FlowJo (versión 7.6.5).

### VI.3.3. Extracción de ADN.

#### A) ADN de tejido directo.

Para la extracción rápida de ADN se usó el kit comercial Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific): se corta un segmento de la cola de cada ratón (~0.5cm) y se coloca en un tubo Eppendorf estéril con 20µL de buffer de dilución y 0.5µL del *ADNRelease Aditive*, se incuba 5 min a temperatura ambiente y se calienta 2 min a 98°C; el sobrenadante se deposita en otro tubo Eppendorf estéril y se toma 1µL para la reacción de PCR. El resto de ADN se almacena a -20°C.

#### B) ADN purificado.

Se corta un pequeño segmento de la cola de cada ratón (~0.5cm) y se coloca en un tubo Eppendorf estéril con 500µL de buffer de lisis (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml de gelatina tipo B, 0.45% de NP40 y 0.45% Tween 20) y 10µL de proteinasa K (20mg/ml) y se deja toda la noche a 65°C en agitación. Posteriormente se centrifuga a 16,000g por 10 min a temperatura ambiente, se recupera el sobrenadante en otro tubo y se le adiciona 500µL de isopropanol frío para precipitar el ADN; se centrifuga nuevamente a 13,800g a 4°C, se decanta y se adiciona 1 ml de etanol al 70% al ADN precipitado, se deja evaporar el etanol a 55°C, se resuspende en 50µL de agua MQ estéril y se guarda a -70°C hasta su uso.

#### VI.3.4. Cuantificación de ADN.

La muestra de ADN a cuantificar se diluye 1:10 con agua MQ estéril, y se lee la densidad óptica (DO) a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro (MULTISKAN GO, Thermo Scientific). La concentración de ADN se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$A_{260} = 1 \text{ DO, que corresponde a } 50\mu\text{g/ml ADN}$$

$$\text{La concentración de ADN} = (50\mu\text{g/ml}) (A_{260}) (\text{factor de dilución})$$

Para determinar la pureza de la extracción del ADN se ocupa la fórmula:

$$\text{Pureza} = A_{260}/A_{280}$$

#### VI.3.5. Reacciones de la PCR.

A) Para IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>.

Para la reacción de PCR se agregó: 5  $\mu$ L del Phire Tissue Direct PCR Master Mix, 1 $\mu$ L o 500 ng de ADN según sea el caso y 0.5 $\mu$ L de cada uno de los “*primers*” (20 $\mu$ M). A continuación se muestra la secuencia de los primers utilizados para detectar los ratones IFN- $\gamma$  KO.

- 1) Gen neomicina Forward: 5'-CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG- 3'
- 2) Gen IFN- $\gamma$  Reverse: 5'-AGG GAA ACT GGG AGA GGA GAA ATA T- 3',
- 3) Gen IFN- $\gamma$  Forward: 5'-AGA AGT AAG TGG AAG GGC CCA GAA G- 3'

Se afora con agua libre de nucleasas para completar el volumen final de 12 $\mu$ L. Se utiliza ADN de un ratón IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> como control positivo y se incluyeron dos controles negativos: ADN de un ratón WT y otro tubo con la mezcla de reacción pero sin ADN. El PCR se

lleva a cabo en un termociclador (Gen amp PCR System 2400 PERKIN ELMER) con las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos (#)
94	2 min	1
94	20 s	10 *
65	15 s	
68	10 s	
94	15 s	28
60	15 s	
72	10 s	
72	2 min	1
10	-----	Hold

\* Con un “rampeo” de -0.5°C por cada ciclo en la temperatura de alineamiento.

B) Para EGFP.

Se utiliza el kit Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific). Las reacciones de PCR se realizaron con: 5 µL del Phire Tissue Direct PCR Master Mix, 1µL o 500 ng de ADN según sea el caso, se adicionó 0.5 µL de cada uno de los “*primers*” (20µM). A continuación se muestran los primers utilizados para detectar ratones con el transgen EGFP.

- 1) Gen EGFP Forward: 5´- GCG TAA GCA GGG CAA TAG AGG- 3´
- 2) Gen EGFP Reverse: 5´- GCA TGA GGT CAA GGG TGA TG- 3´

Finalmente se aforó con agua libre de nucleasas a un volumen de 12 $\mu$ L. El PCR se lleva a cabo en un termociclador (Gen amp PCR System 2400 PERKIN ELMER) con las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos (#)
94	3 min	1
94	30 s	35
60	1 s	
72	1 s	
72	2 s	1
10	-----	Hold

### VI.3.6. Electroforesis y revelado.

Se prepara una solución de 1.5% de agarosa (UltraPure™ Life Technologies) en buffer TAE 1X y se vierte ~75 ml en la cámara de electroforesis con el peine y se deja gelificar. Posteriormente, se cargan las muestras de las reacciones del PCR y éstas se corren por 60 min a un voltaje de 70 Volts. Después del tiempo transcurrido el gel se pasa a un recipiente con 100 ml de buffer TAE y 10 $\mu$ L bromuro de etidio (10mg/ml) y se deja en agitación lenta por 30 min en la oscuridad, se enjuaga en otro recipiente con agua MQ estéril y se deja nuevamente en agitación lenta por 15 min en la oscuridad; al terminar, el gel se visualiza en un transiluminador con luz UV (FOTO/Prep. Kodak Documental science) y se toma una foto para analizar los resultados con el software Kodak Digital Science 1D.

#### **VI.4. CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS EN SANGRE DE RATONES INFECTADOS**

##### **VI.4.1. Obtención de quiste e infección.**

Los quistes de la cepa ME49 fueron obtenidos de ratones CD-1. Los ratones se sacrifican por dislocación cervical y posteriormente con material de disección estéril se retira el cerebro, se coloca en un macerador con 500  $\mu$ L de DPBS y se homogeniza completamente. Una vez que se obtiene el homogenizado se toman 10  $\mu$ L de éste y se colocan en un portaobjetos, se coloca el cubreobjetos sobre la muestra y se cuentan los quistes en la totalidad de la muestra usando un microscopio óptico a 20X. Después se calcula el volumen del macerado para tomar 20 quistes. Los ratones BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup> y BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> de 8-10 semanas de edad fueron infectados con 20 quistes en un volumen de 0.1 ml de DPBS por vía intraperitoneal.

##### **VI.4.2. Obtención de sangre.**

La obtención de sangre se realiza los días 0, 3, 4, 6, 7, 8 y 10 post-infección. Se coloca el ratón en una trampa para inmovilizarlo y se corta la punta de la cola del ratón y con una micropipeta se toman 12  $\mu$ L de sangre, la cual se deposita en el fondo de un tubo Eppendorf de 2 ml con 1  $\mu$ L de heparina (1000 U/mL), se mezcla perfectamente y se mantiene en un recipiente con hielo a 4°C hasta su uso.

##### **VI.4.3. Inmunofluorescencia en sangre total.**

Se agregan 45 $\mu$ L de buffer de lavado (ver 3.2) con el anticuerpo Anti-CD4 PE (0.05 $\mu$ g) (Tonbo Biosciences), se homogeniza suavemente en el Vortex y se deja incubar 30 min a 4°C en la oscuridad. Al finalizar la incubación se agrega 1.5 ml de buffer de lavado (ver

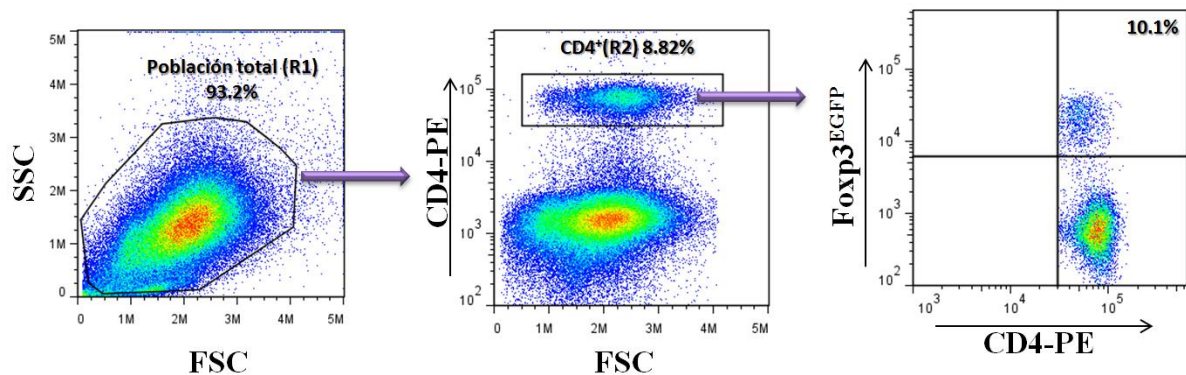
3.2), se centrifuga a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se quita el sobrenadante y se agregan 2 ml de DPBS. La muestra se analiza en el citómetro Attune azul/rojo o Attune azul/violeta (Applied Biosystems), capturando 1667 $\mu$ L de la muestra para identificar y cuantificar el número de células Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ L de sangre. Los datos se analizan usando el software FlowJo (versión 7.6.5) y finalmente se graficaron en el software GraphPad Prism 5, asimismo también se graficó el registro de peso y mortalidad durante la infección de los ratones.

## VII. RESULTADOS.

### VII.1. *Detección de células T reguladoras por citometría de flujo.*

Para llevar a cabo la fenotipificación de los ratones que se obtendrían de las cruzas, se realizó la técnica de inmunotipificación y análisis por citometría de flujo. La técnica consistió en realizar una inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-CD4 en sangre y su posterior análisis por FACS para la detección de células Tregs  $\text{Foxp3}^+\text{CD4}^+$ .

La estrategia de análisis que se utilizó se muestra en la Fig. 15; de un “dot plot” de tamaño vs granularidad (FSC vs SSC) se seleccionó la población total donde se encuentran los linfocitos (R1) y de este “gate” se graficó tamaño vs CD4 (FSC vs CD4) y se seleccionó la población de linfocitos  $\text{CD4}^+$  (R2). Finalmente se analizó la población  $\text{Foxp3}^+$  EGFP dentro de la población  $\text{CD4}^+$ . De esta manera se verificó la expresión del transgen EGFP y se determinó el porcentaje de células T reguladoras, el cual debe oscilar entre 8 y 12 %. Este análisis se realizó para todos los ratones obtenidos de las diferentes cruzas.



**Figura 15. Estrategia de análisis para identificar células T reguladoras en los ratones transgénicos  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ .** Se realizó un “dot plot” de FSC vs SSC y se seleccionó la población total (R1) para hacer un “gate” de FSC vs CD4, del cual se seleccionó la población  $\text{CD4}^+$  (R2) para realizar otro “gate” de CD4 vs  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ .



## VII.2. *Montaje de PCR para identificar ausencia o presencia del gen de IFN- $\gamma$ .*

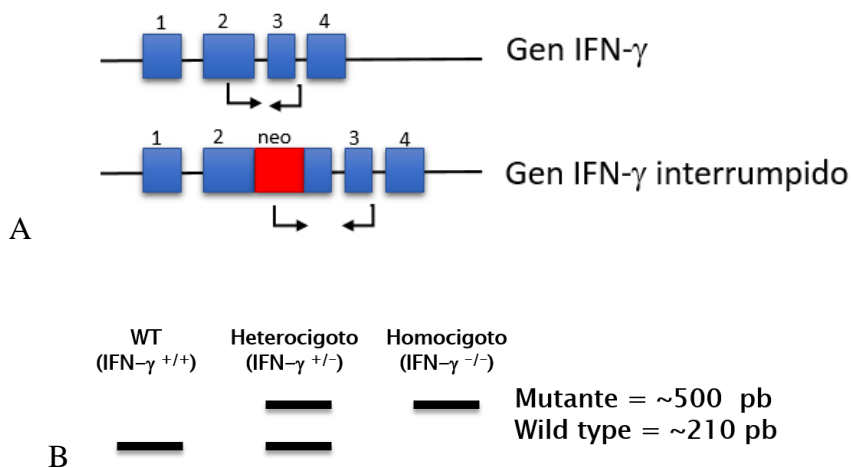
Para realizar la genotipificación de los ratones que se obtendrían de las cruzas se llevó a cabo el montaje de un PCR para permitir la identificación de ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>.

Este PCR consiste en amplificar el exón 2 y 3 del gen de IFN- $\gamma$ ; en los ratones WT el amplificado tiene un peso molecular de ~210pb, pero en los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> el amplificado es de ~500pb. Esta diferencia es debida a que a los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> se les insertó un gen de resistencia a la neomicina dentro del exón 2 del gen de IFN- $\gamma$  y como consecuencia de esta modificación, el gen del cassette de neomicina funciona como codón de término durante la traducción (Dalton et al., 1993); por lo tanto, el amplificado es de mayor tamaño en los ratones IFN- $\gamma$  KO (Fig 16A).

Una vez que se obtengan los resultados de la reacción de PCR se podrán identificar los tres genotipos posibles en las diferentes generaciones (homocigotos para IFN- $\gamma$ , heterocigotos y homocigotos para IFN- $\gamma$  KO) como se muestra en la Fig. 16B. De esta manera se seleccionará a los ratones adecuados para seguir con las cruzas.

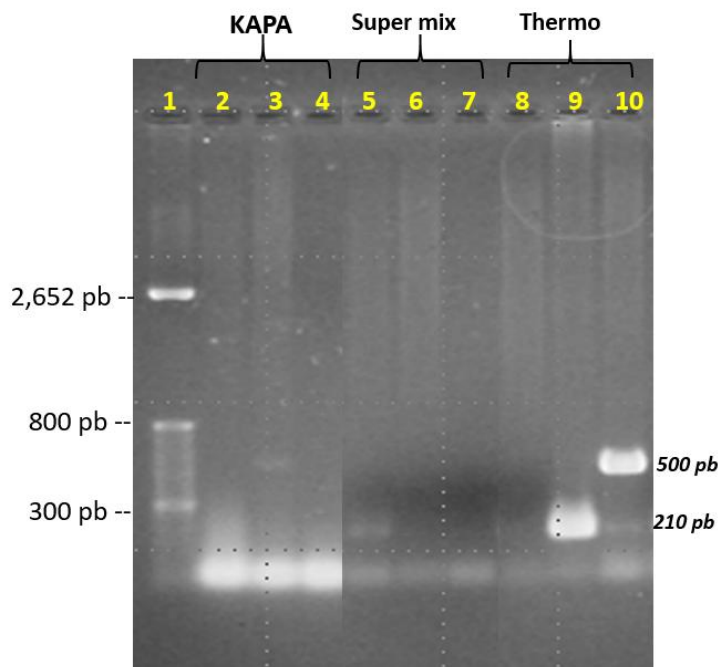
Para realizar el montaje del PCR inicialmente se probaron tres kits comerciales diferentes: 1) el kit **PCR SuperMix** (Invitrogen), que es una mezcla que contiene los componentes para realizar la reacción dentro de un buffer; 2) el kit **KAPA Taq PCR** (Biosystems), que incluye los componentes para realizar la reacción por separado, y 3) el kit **Phire Tissue Direct PCR Master Mix** (Thermo Scientific), que contiene todos los componentes necesarios para realizar la reacción dentro de un buffer; además la ADN polimerasa que usa este kit es una *Taq* ADN polimerasa que está especialmente modificada en un dominio

para unirse al ADN y aumentar la eficacia de polimerización y también exhibe una alta resistencia a muchos inhibidores de PCR que se encuentran en el tejido animal.



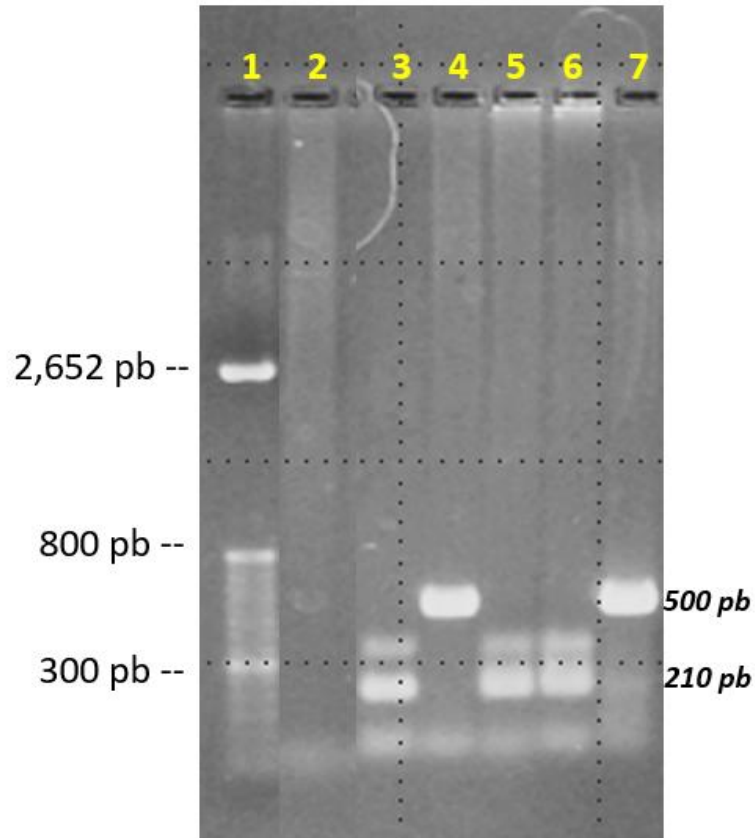
**Figura 16. A: Estructura del gen del IFN- $\gamma$  interrumpido en el exón 2 por el cassette de neomicina.** Las flechas corresponden a la posición de los primers del PCR. B: Esquema de las bandas esperadas en un gel de agarosa, después de la amplificación por PCR de ratones WT, IFN- $\gamma$   $^{+/-}$ , e IFN- $\gamma$   $^{-/-}$ .

Para realizar las reacciones y probar los kits se usó ADN extraído de la cola de ratones con el genotipo IFN- $\gamma$   $^{+/+}$  e IFN- $\gamma$   $^{-/-}$  (además se usó también como control una reacción sin añadirle ADN). Después de revelar la electroforesis se observaron los amplificados que se muestran en la Fig. 17. Al analizar el gel se observó que el único kit donde hay amplificación es el de Thermo Scientific, pues las bandas de los amplificados WT e IFN- $\gamma$   $^{-/-}$  se observan claramente (Fig. 17). Por lo tanto, se decidió utilizar este kit para realizar la genotipificación de los ratones.



**Figura 17. PCR de prueba de tres kits diferentes para la identificación de ratones IFN- $\gamma$  KO.** Electroforesis (1.5% agarosa), marcador de peso molecular (carril 1), ratones WT (carriles 2, 5,9) ratones IFN- $\gamma$  KO (carriles 4, 6,10).

Otra ventaja del kit **Phire Tissue Direct PCR Master Mix** (Thermo Scientific) por la que se escogió es que permite hacer la reacción de PCR usando una muestra de tejido (~0.5 cm se cola de ratón) sin tener que purificar ADN, lo que reduce considerablemente el tiempo. Por esta razón se realizó nuevamente un PCR para comparar el resultado de la reacción con ADN purificado y ADN directo de tejido. Al revelar la electroforesis se compararon las muestras y como podemos ver en la Fig. 18, el ADN purificado, así como el ADN directo de cola amplifican de forma correcta. Por lo tanto se optó por utilizar ADN directo de cola sin purificación previa del ADN en los siguientes experimentos, usando el kit Thermo Scientific.



**Figura 18. Comparación de PCR usando como templado de ADN purificado o muestra de tejido.** Electroforesis (1.5% agarosa), se realizó PCR para amplificación del gen de IFN- $\gamma$  (neo) usando ADN purificado (carriles 3,4) o muestra de tejido de cola de ratón (carriles 5, 6, 7). Ratones WT (carriles 3, 5,6) y KO (carriles 4,7).

### VII.3. Estrategia para obtener la cepa doble transgénica.

El ratón BALB/c IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> usado se compró y se obtuvo reemplazando un alelo del IFN- $\gamma$  de células madres embrionarias de ratón, con un gen de resistencia a la neomicina dentro del exón 2 del IFN- $\gamma$ , el cual funciona como un codón de término antes de que se traduzca la proteína del IFN- $\gamma$  madura (Dalton et al., 1993).

El ratón Foxp3<sup>EGFP</sup> se compró y se generó por la inserción del gen de la proteína EGFP seguido de un codón de término dentro del exón 11 de Foxp3 (Lin, 2007). Estos ratones se

desarrollaron normalmente y libres de enfermedades (Haribhai et al., 2007).

Para obtener el ratón doble transgénico  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  se realizaron las cruzas basándonos en el esquema teórico que se muestra en la Fig. 19. Se empezó con la craza parental (F0) en la que se utilizaron machos  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  y hembras  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ , ambos con un genotipo de fondo BALB/C. Para realizar las cruzas se tomó en cuenta la ubicación de los genes  $\text{Foxp3}$  e  $\text{IFN-}\gamma$ , los cuales se encuentran en los cromosomas X y 10 respectivamente. Ya que  $\text{Foxp3}$  es un gen ligado al sexo, se usaron hembras  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$  porque al ser XX se garantizaría que todos los descendientes de la primera generación (F1) tendrían un cromosoma con el gen  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$  y por lo tanto el transgen se fijaría en todos los individuos de la F1.

La descendencia F1 sería en su totalidad heterocigota para el gen de  $\text{IFN-}\gamma$  por tratarse de un gen autosómico. Por otro lado tenemos el transgen de EGFP que por las características que se mencionaron anteriormente, las hembras serían heterocigotas, es decir, con un genotipo  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP} -/+}$  mientras que los machos, al ser XY serían hemicigotos y ya tendrían fijado el gen de EGFP. Por esta razón se ocuparon únicamente los machos de la F1, que generarían el genotipo  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/+}$ ; los machos con este genotipo se usarían para realizar las retrocruzas con hembras  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$  y de esta forma asegurar que toda la generación de la F2 tenga fijado el gen de EGFP en su genoma.

Los ratones que se obtendrían de la F2 tendrían el transgen EGFP fijado en toda la población, de forma hemicigota en los machos y homocigota en las hembras. Respecto al gen de  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ , se obtendrían ratones WT ( $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$ ) y heterocigotos ( $\text{IFN-}\gamma^{-/+}$ ) de ambos sexos. Por lo tanto se obtendrían hembras y machos con los genotipos  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/+}$ ,

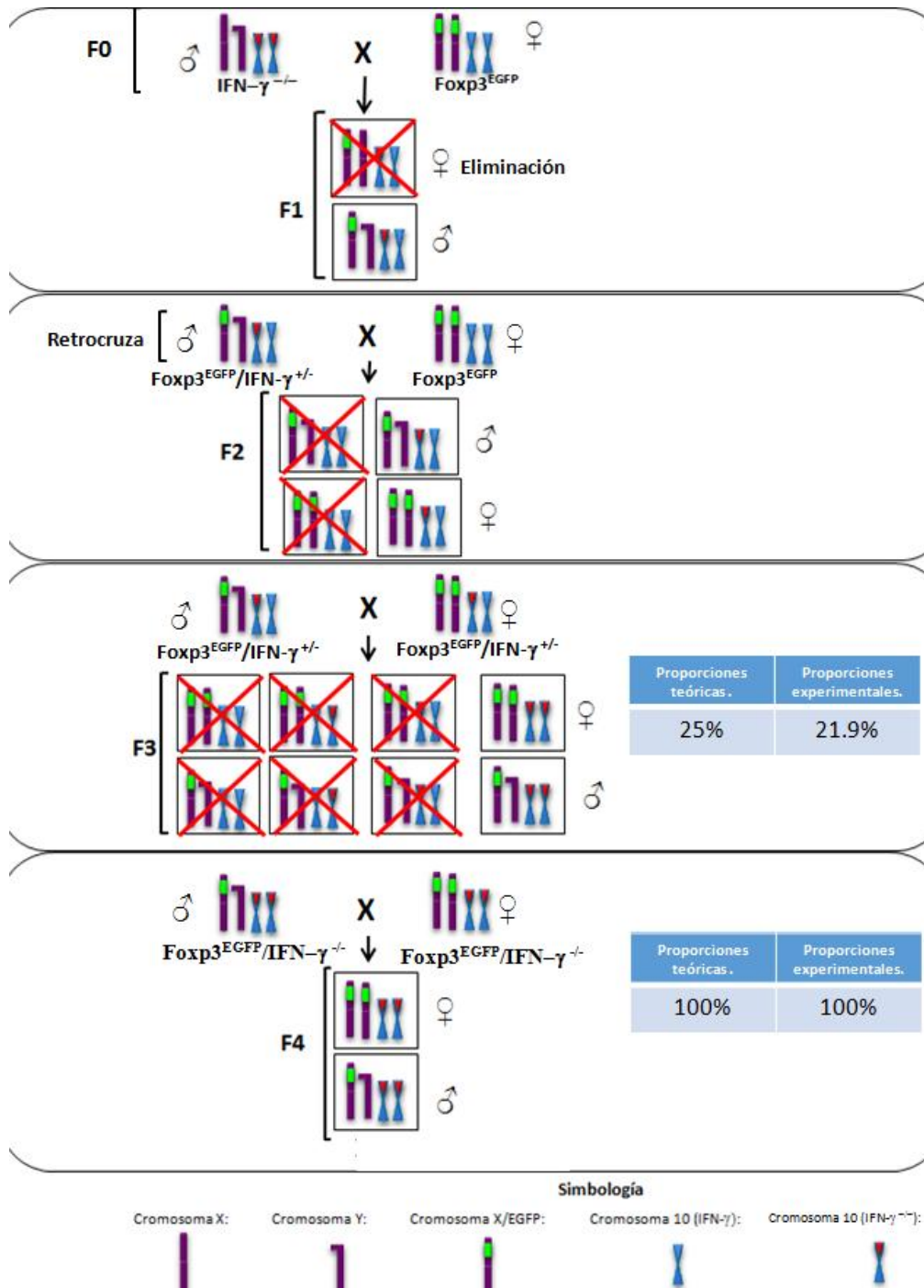
los cuales corresponden al 50% de la población, y ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{+/+}$ , el restante 50% de la población. Para seguir con nuestro objetivo se seleccionaría a los machos y las hembras, con el genotipo  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/+}$ , con los cuales se realizarían las siguientes cruzas y obtener la F3.

Como las cruzas para obtener la F3 serían con hembras y machos  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/+}$ , se obtendría un porcentaje del 25% de ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{+/+}$ , un 50% de ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/+}$  y un 25% de ratones que corresponderían a ratones con el genotipo  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ ; estos últimos serían los primeros ratones dobles transgénicos. Finalmente para ampliar y mantener la colonia de ratones doble transgénicos se realizarían cruzas con ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ . Una vez que se obtuvieron los ratones de la F4, el 100% de la población tendría un genotipo  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  y estarían listos para realizar los experimentos posteriores.

#### **VII.4. Cruzas.**

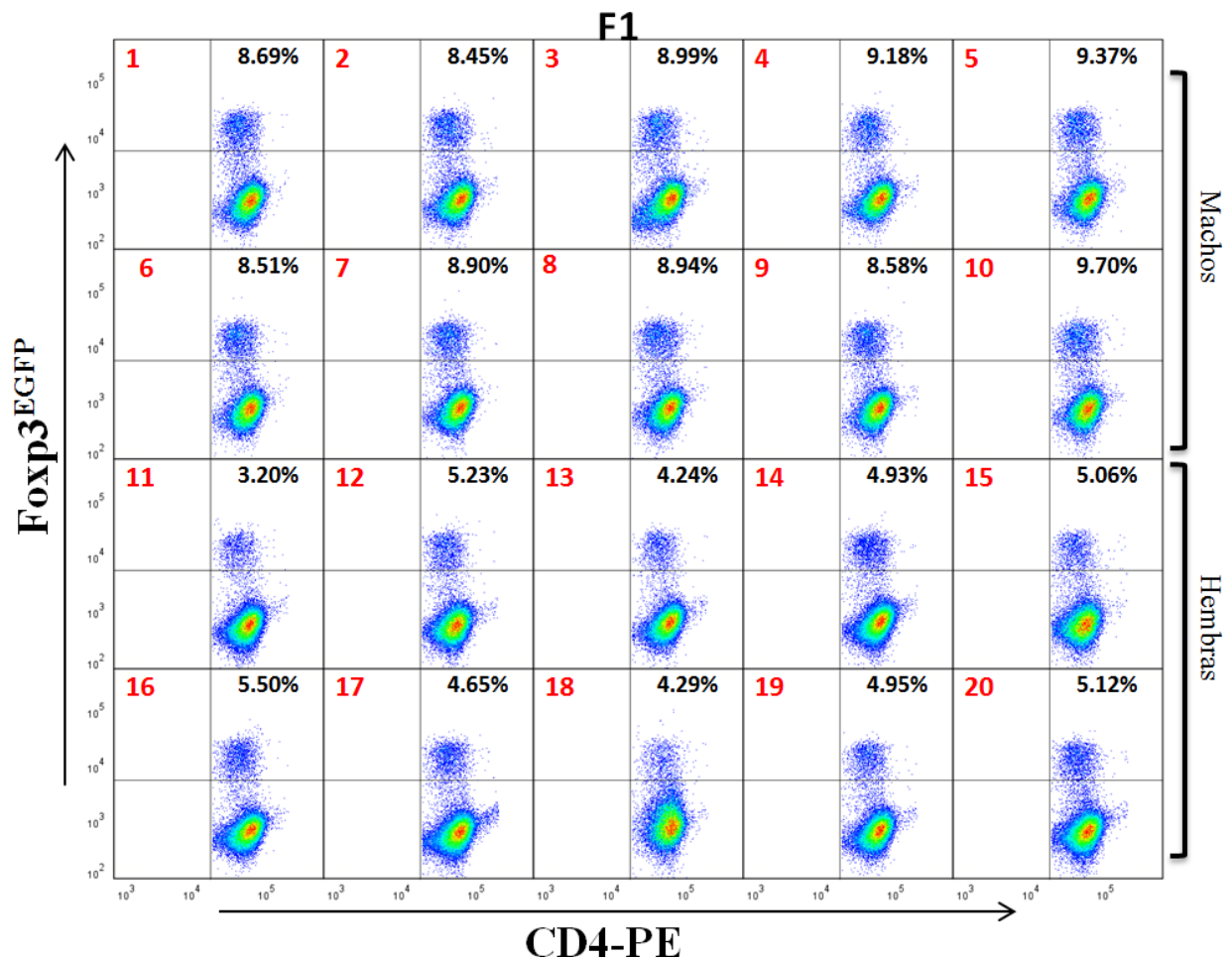
##### **VII.4.1. Obtención de la F1.**

Se realizaron 6 cruzas parentales con machos  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  y hembras  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ , y se obtuvieron los ratones de la F1, de los cuales fueron 37 hembras y 24 machos. Después de 4 semanas se destetaron y se tipificaron para determinar la expresión de la proteína EGFP y para identificar los ratones heterocigotos para el gen de  $\text{IFN-}\gamma$ . En la Fig. 20 podemos observar algunos de los análisis obtenidos por citometría de flujo de los ratones tanto machos como hembras de la F1.



**Figura 19. Esquema teórico para la obtención del ratón doble transgénico  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$ .** Se hicieron cruces de machos  $IFN-\gamma^{-/-}$  y hembras  $Foxp3^{EGFP}$  (F0) para obtener la F1, de la cual se ocuparon solamente los machos para realizar las retrocruzas con hembras  $Foxp3^{EGFP}$  para obtener la F2. Una vez obtenida la F2 se seleccionaron los machos y hembras con el genotipo  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$ , estos ratones se pusieron en cruce para obtener la F3. Posteriormente de la F3 obtenida se seleccionaron los primeros ratones dobles transgénicos con el genotipo  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$ . Finalmente se usaron estos ratones dobles transgénicos para hacer nuevas cruces para expandir y mantener la colonia, esta generación corresponde a la F4.

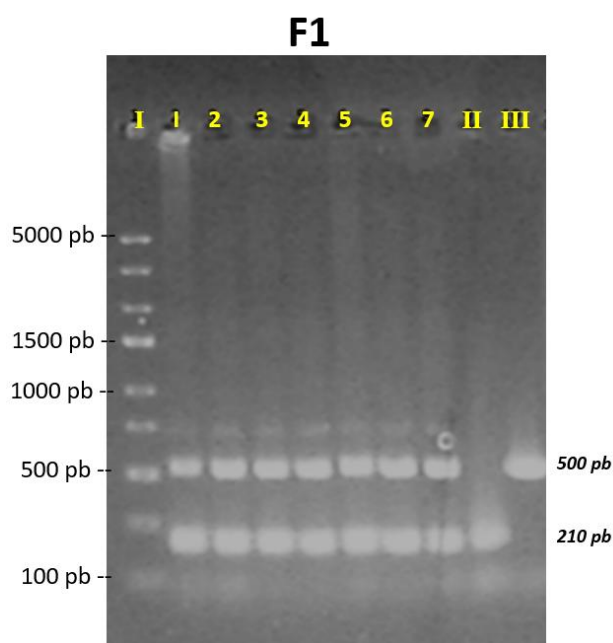
Los dot plot nos muestran que todos los ratones obtenidos expresan el transgen EGFP. Como ya se mencionó anteriormente, el transgen de EGFP se encuentra en el cromosoma X, por lo tanto únicamente los machos (por ser hemicigotos) expresan un porcentaje alrededor de 10 % de células T reguladoras  $Foxp3^{+EGFP}$ , el cual se encuentra dentro del porcentaje esperado (8-12%), mientras las hembras mantienen un porcentaje de células T reguladoras  $Foxp3^{+EGFP} < 6\%$ ; este bajo porcentaje es el esperado, ya que son heterocigotas para el gen de  $Foxp3^{EGFP}$ .



**Figura 20. Dot plots del fenotipificado de ratones de la F1 para determinar la expresión de la proteína EGFP y el porcentaje de Tregs.** Los números rojos representan el número de ratón. Toda la población expresa la proteína EGFP, sin embargo, únicamente los machos (1-12) expresan un porcentaje esperado (8-12%) de células T reguladoras por ser hemicigotos, en cambio las hembras (13-24) tienen porcentajes por debajo del rango esperado por ser heterocigotas para el transgen EGFP.



Al identificar que los ratones machos obtenidos expresaran la proteína EGFP y que el porcentaje de Tregs se mantuviera dentro del rango esperado (8-12%) se realizó un PCR para identificar a los animales que fueran heterocigotos para el gen de IFN- $\gamma$ . Los amplificadores de algunos ratones machos de la F1 que fueron genotipificados para identificar que fueran IFN- $\gamma^{+/-}$  se muestran en la Fig. 21. Se observa únicamente los ratones que fueron heterocigotos para el gen de IFN- $\gamma$ .

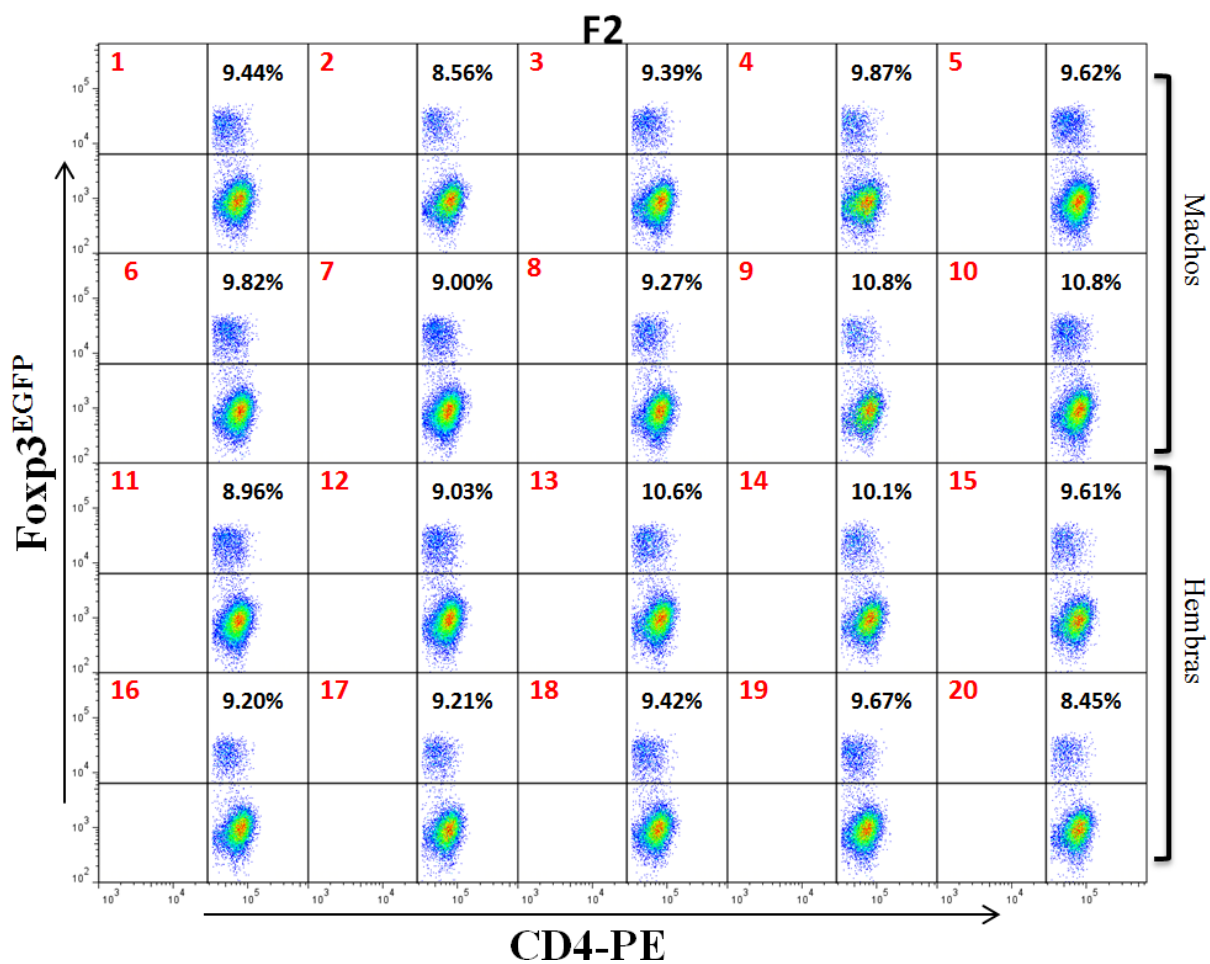


**Figura 21. PCR del genotipificado de los machos obtenidos de la F1.** Electroforesis 1.5% agarosa, se observa el marcador de peso molecular (carril I), ratón WT (carril II), ratón IFN- $\gamma^{-/-}$  (carril III) y ratones IFN- $\gamma^{+/-}$  (carriles 1-7).

#### VII.4.2. Obtención de la F2.

Luego de haber identificado a los ratones machos  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{+/-}$  de la F1, se usaron para realizar las retrocruzas con hembras  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$  para obtener la F2. Se obtuvieron 39 hembras y 41 machos de 7 cruzas. La F2 debía tener fijado el transgen EGFP en toda la

población, en hembras de forma homocigota y en los machos de forma hemicigota, y que ya había ocurrido desde la F1. Para corroborar la expresión de la proteína EGFP, se realizó el fenotipificado de la F2 después del destete de las crías. Como se puede observar en la Fig. 22 el porcentaje de células T  $\text{Foxp3}^+$  (alrededor de 8.23 -10.8 %) es similar en las hembras y los machos, lo que indica que las hembras de la F2 ya son homocigotas para el transgen EGFP.



**Figura 22. Dot plots del fenotipificado de ratones de la F2 para determinar la expresión de la proteína EGFP y el porcentaje de Tregs.** Los números rojos representan el número de ratón. Toda la población expresa la proteína EGFP, los machos (1-10) expresan un porcentaje esperado de células T reguladoras (8.56-10.8%), así como las hembras (11-20) tienen un porcentaje similar de Tregs (8.45.-10.6%).

De la descendencia de las retrocruzas se obtendrían dos diferentes genotipos para el gen de IFN- $\gamma$ : ratones IFN- $\gamma^{+/+}$  y ratones IFN- $\gamma^{+/-}$ . Por este motivo, después de verificar la expresión del transgen EGFP de los ratones de la F2, se realizó el genotipificado para identificar a los machos y hembras heterocigotos para el gen de IFN- $\gamma$ . En la Fig. 23, podemos observar algunos de los geles de las electroforesis que muestran los amplificadores de los dos genotipos mencionados anteriormente. Se obtuvieron 20 hembras y 11 machos con el genotipo Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma^{+/-}$ , que corresponden al 38.75% de la población.

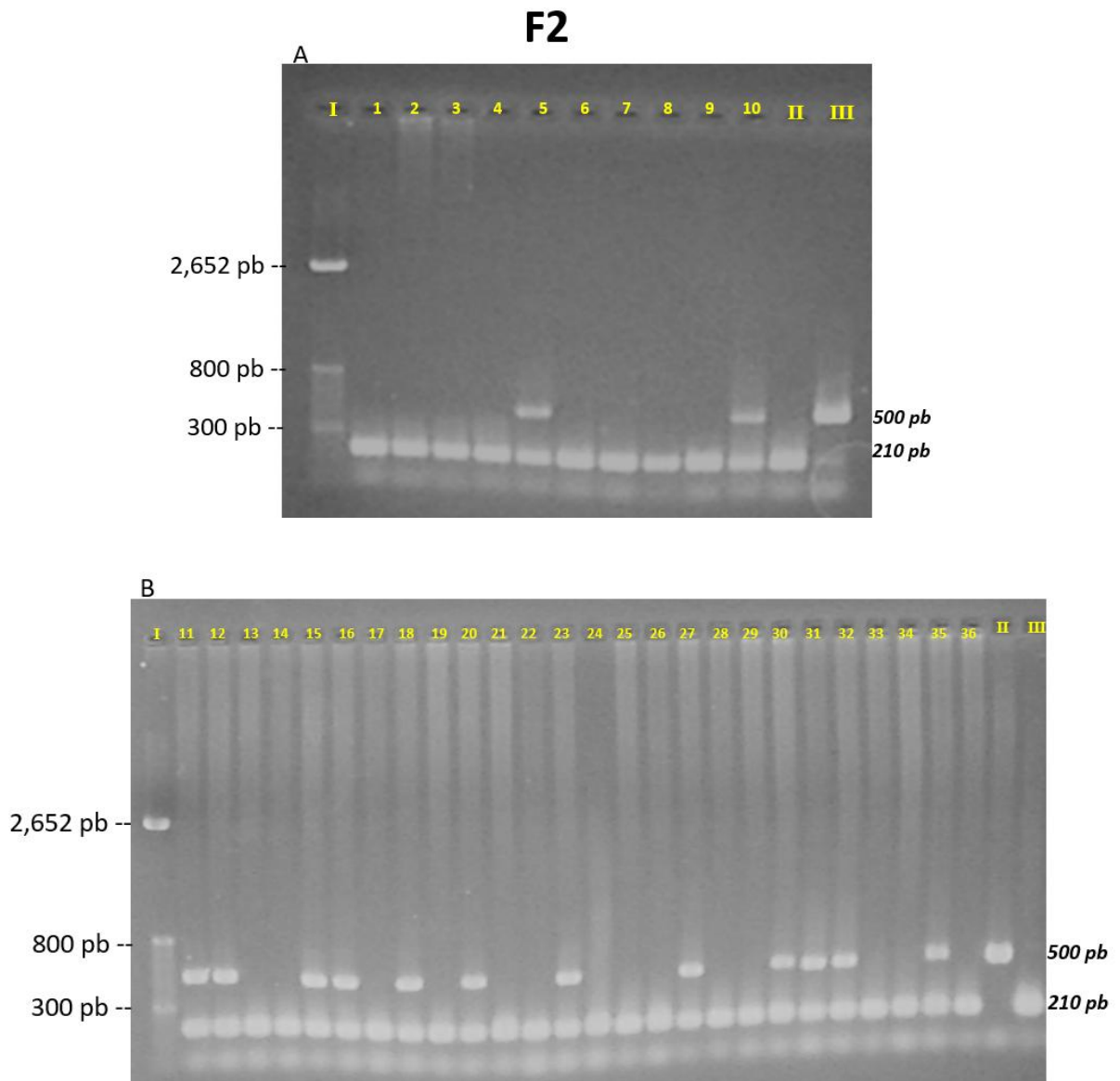
### VII.4.3 Obtención de la F3.

Una vez identificados los ratones machos y hembras Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma^{+/-}$  de la F2, se realizaron 11 cruzas para obtener la F3. Se obtuvieron 45 hembras y 37 machos; el gen de EGFP ya se encontraba fijado en toda la población de esta generación. En estos ratones se identificarían los tres genotipos diferentes para el gen de IFN- $\gamma$  ( ratones IFN- $\gamma^{+/+}$ , IFN- $\gamma^{-/+}$  e IFN- $\gamma^{-/-}$ ), por lo tanto basándonos en la genética mendeliana se esperaría que un 25 % de la población sería Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma^{-/-}$ .

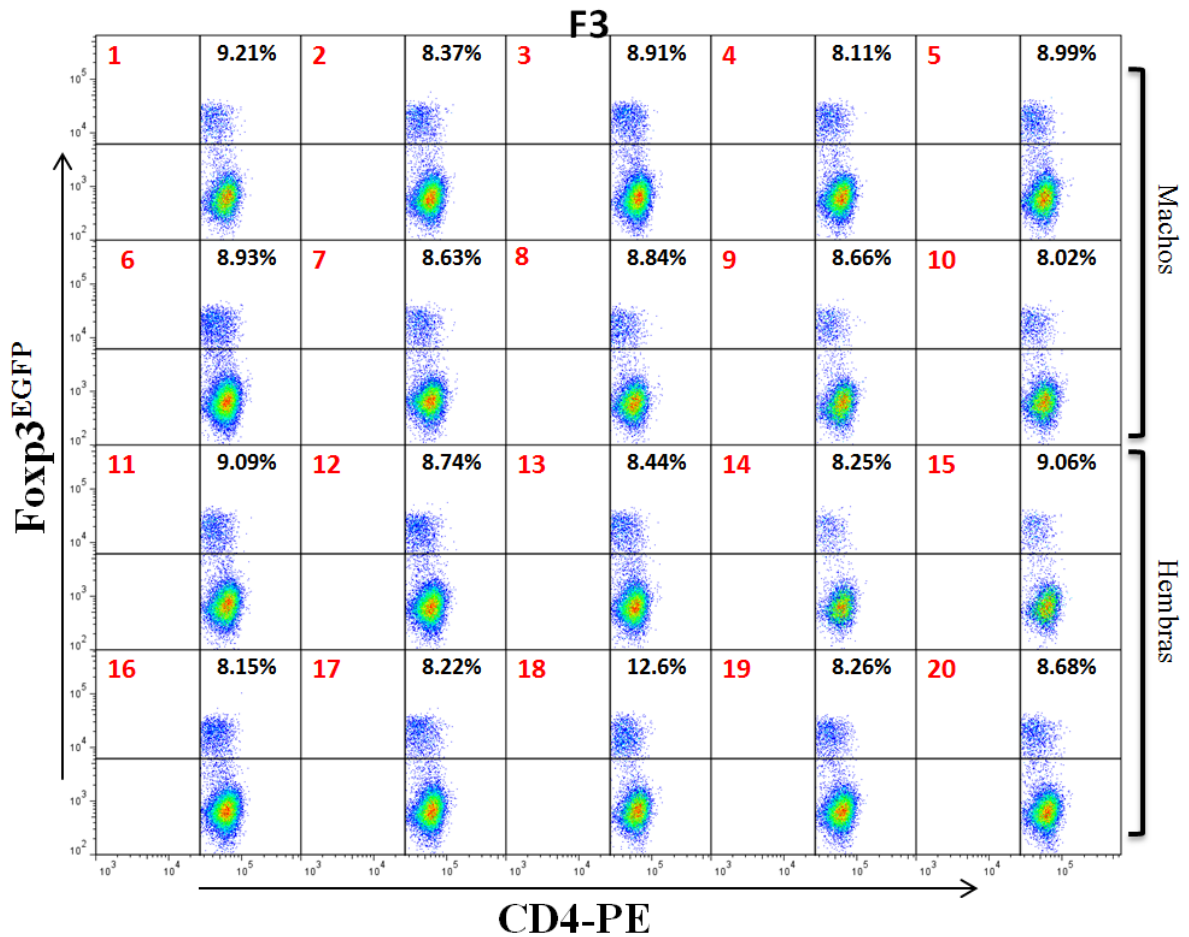
Se realizó el fenotipificado para verificar la expresión del transgen EGFP de los ratones de la F3, y como se muestra en la Fig. 24 la expresión de la proteína EGFP sigue presente en toda la población como se esperaba, así como el porcentaje de células T Foxp3<sup>+</sup> esperado (8-12%), en machos y hembras.

Al estar seguros que los ratones de la F3 expresaban adecuadamente la proteína EGFP, se identificó a los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$ , que serían ya los ratones dobles transgénicos. Para iniciar se realizó el genotipificado de los ratones de la F3 por PCR. En la Fig. 25 podemos

observar que en los geles de las electroforesis se encuentran los diferentes genotipos ( $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$ ,  $\text{IFN-}\gamma^{+/-}$ ,  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ ). Se obtuvieron 24 ratones  $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$ , 40 ratones  $\text{IFN-}\gamma^{+/-}$ , y 18 ratones  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ .

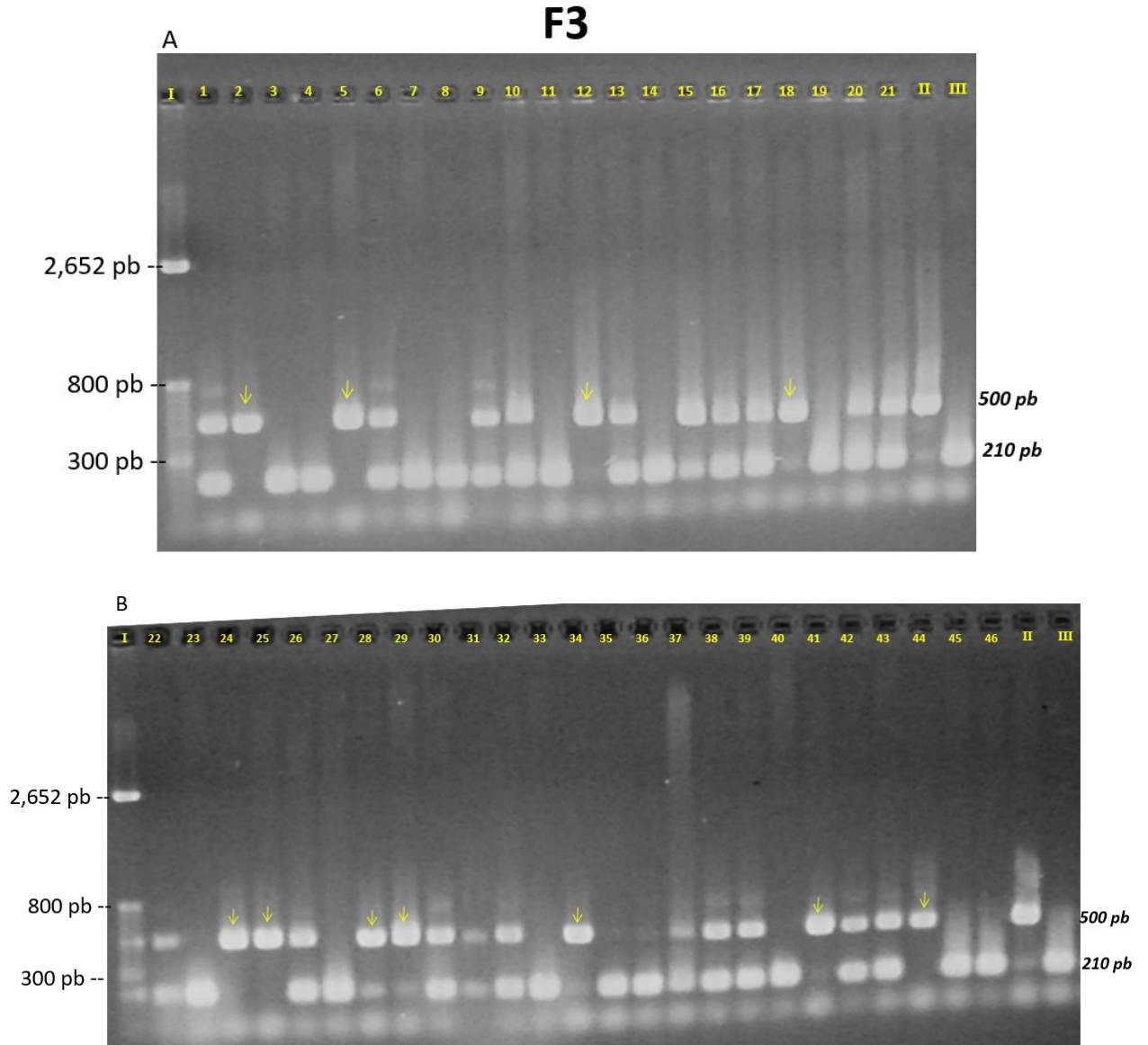


**Figura 23. Electroforesis de los PCRs del genotipificado de ratones obtenidos de la F2.** A: podemos observar el marcador de peso molecular (carril I), control de ratón WT (carril II), control de ratón  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  (carril III) y ratones  $\text{IFN-}\gamma^{+/-}$  (carriles 5 y 10), los demás ratones son WT para  $\text{IFN-}\gamma$ . B: se observa el marcador de peso molecular (carril I), control de ratón WT (carril II), control de ratón  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  (carril III) y ratones  $\text{IFN-}\gamma^{+/-}$  (carriles 11, 12, 15, 16, 18, 20, 23, 27, 30, 31 y 32) y ratones WT para  $\text{IFN-}\gamma$  en los carriles restantes. Se obtuvieron 20 hembras y 11 machos con el genotipo  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{+/-}$ .

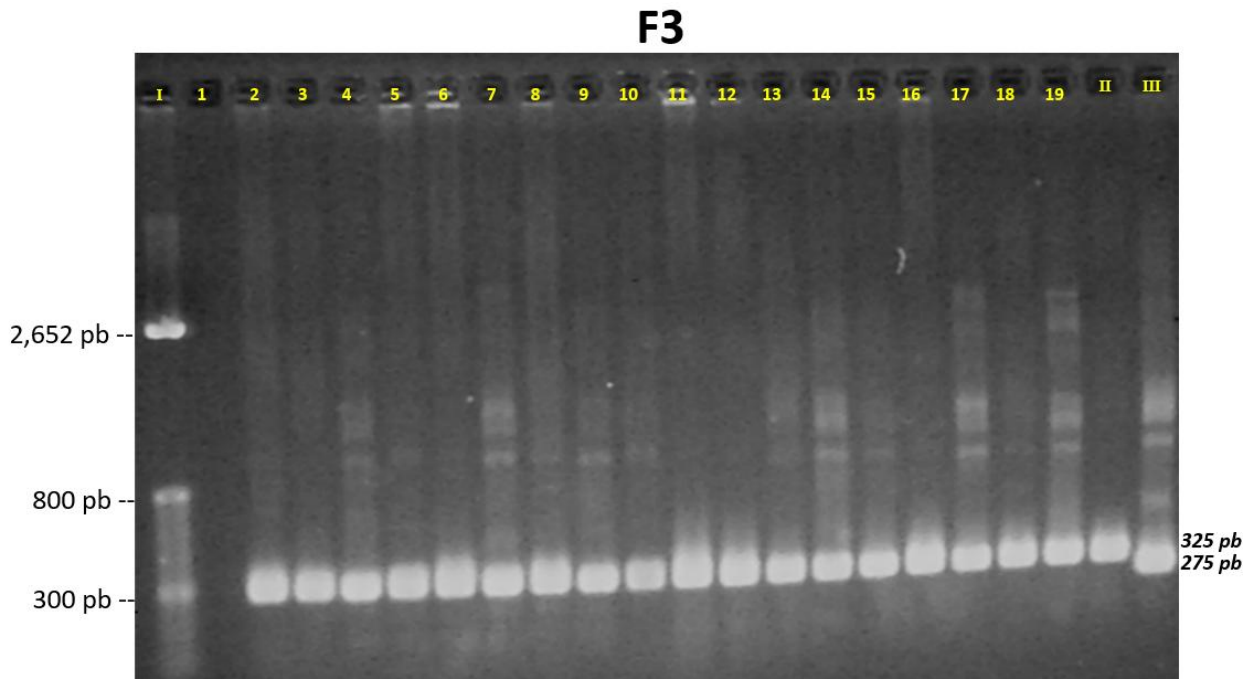


**Figura 24. Dot plots del fenotipificado de ratones de la F3 para determinar la expresión de la proteína EGFP y el porcentaje de Tregs.** Los números rojos representan el número de ratón. Toda la población expresa la proteína EGFP, los machos (1-12) expresan un porcentaje esperado de células T reguladoras (8.02-9.21%), así como las hembras (11-20) tienen un porcentaje similar de Tregs (8.15-12.6%).

Una vez tipificados los 82 ratones que se obtuvieron de la F3, se identificaron 9 hembras y 9 machos, los cuales fueron los primeros ratones dobles transgénicos con el genotipo  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$ . Estos 18 ratones correspondían al 21.9 % de la población total y se acerca al 25% esperado teóricamente de la genética mendeliana. Finalmente, al ser los primeros ratones dobles transgénicos se decidió realizar un PCR para corroborar la presencia del transgen EGFP, como se puede observar en la Fig. 26.



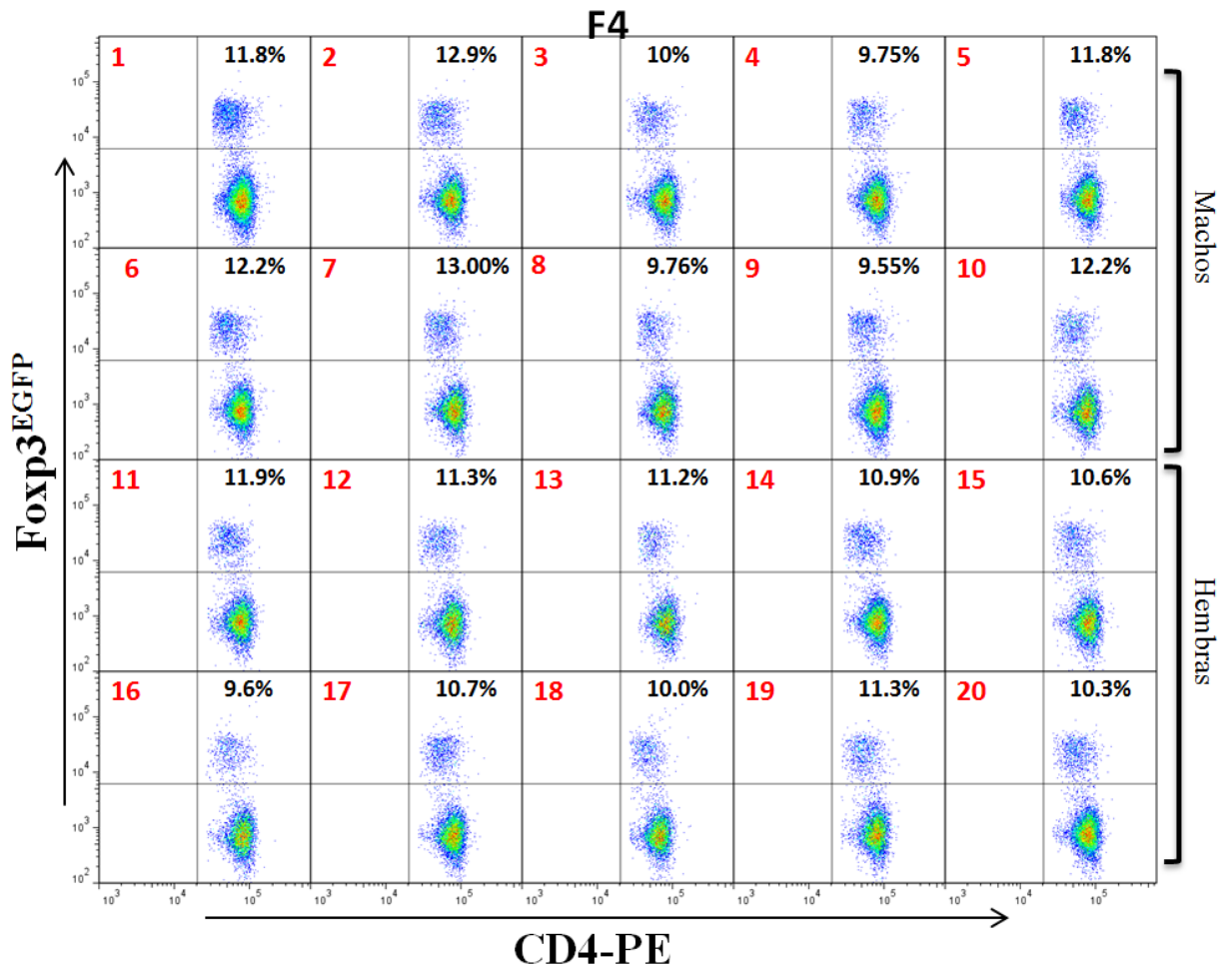
**Figura 25: Electroforesis de los PCRs para el genotipificado de ratones obtenidos de la F3.** A: podemos observar el marcador de peso molecular (carril I), control de ratón WT (carril III), control de ratón  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  (carril II), ratones  $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$  WT (carriles 3,4,7,8,11,14, 19), ratones  $\text{IFN-}\gamma^{+/-}$  heterocigotos (carriles 1,6, 9,10,13,15,16,17,20,21) y ratones  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  (carriles 2,5,12,18). B: se observa el marcador de peso molecular (carril I), control de ratón WT (carril III), control de ratón  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  (carril II), ratones  $\text{IFN-}\gamma^{+/+}$  WT (carriles 23,27,33,35,36,40,45,46), ratones  $\text{IFN-}\gamma^{+/-}$  heterocigotos (carriles 22,26,30,31,32,37,38,39,42,43) y ratones  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  KO (carriles 24,25,28,29,34,41,44). Se obtuvieron 9 hembras y 9 machos con el genotipo  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ .



**Figura 26. Electroforesis del PCR para corroborar la presencia del transgen de EGFP en los ratones  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  de la F3.** Marcador de peso molecular (carril I), control de ratón WT (carril III), control de ratón  $Foxp3^{EGFP}$  (carril II), ratones  $Foxp3^{EGFP}$  (carriles 2-19). Los 18 ratones  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  expresaron el transgen EGFP.

#### VII.4.4. Obtención de la F4.

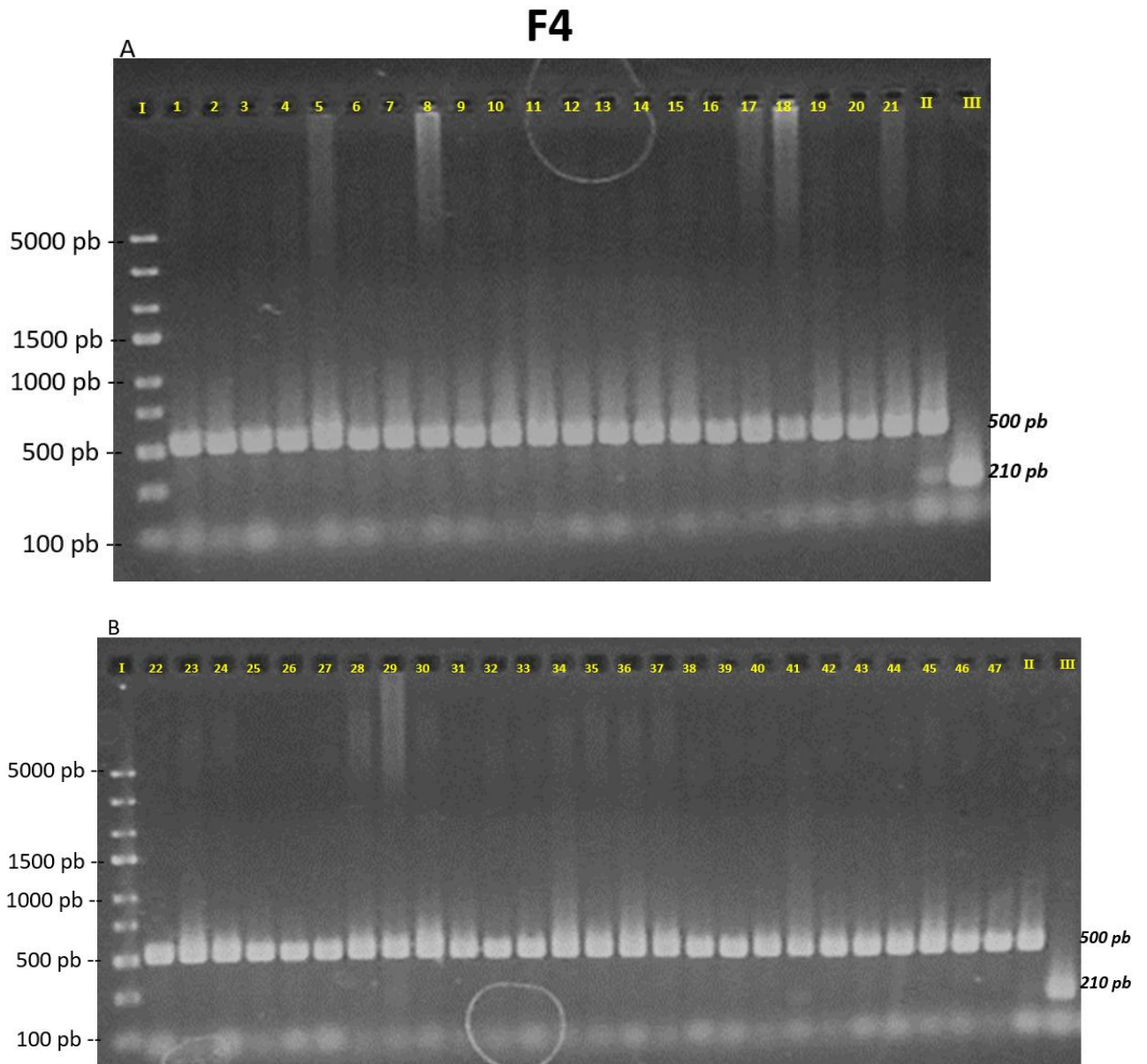
Ya obtenidos los ratones dobles transgénicos  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$ , se usaron como pies de cría para expandir la población. De las nueve cruzas se obtuvieron un total de 98 ratones (49 hembras y 49 machos). Se realizó el fenotipificado de los ratones de la F4 para identificar al transgen EGFP, y se observó que todos los ratones expresan la proteína EGFP y el porcentaje de células Tregs se encuentra dentro del rango esperado como se muestra en la Fig. 27.



**Figura 27. Dot plots del fenotipificado de ratones de la F4 para determinar la expresión de la proteína EGFP y el porcentaje de Tregs.** Los números rojos representan el número de ratón. Toda la población expresa la proteína EGFP, los machos (1-10) expresan un porcentaje de células T reguladoras alrededor de 9.55-13.0%, así como las hembras (11-20) tienen un porcentaje similar de Tregs entre 9.6-11.9%.

Para realizar la genotipificación y corroborar que toda la población fuera IFN- $\gamma$  KO se realizó un PCR. En la Fig. 28 se muestran unos gels de algunos de los ratones tipificados de la F4 y como podemos observar el 100% de la población tiene un genotipo homocigoto para IFN- $\gamma^{-/-}$ , por lo tanto, toda la población obtenida de la F4 son animales dobles transgénicos Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma^{-/-}$ .

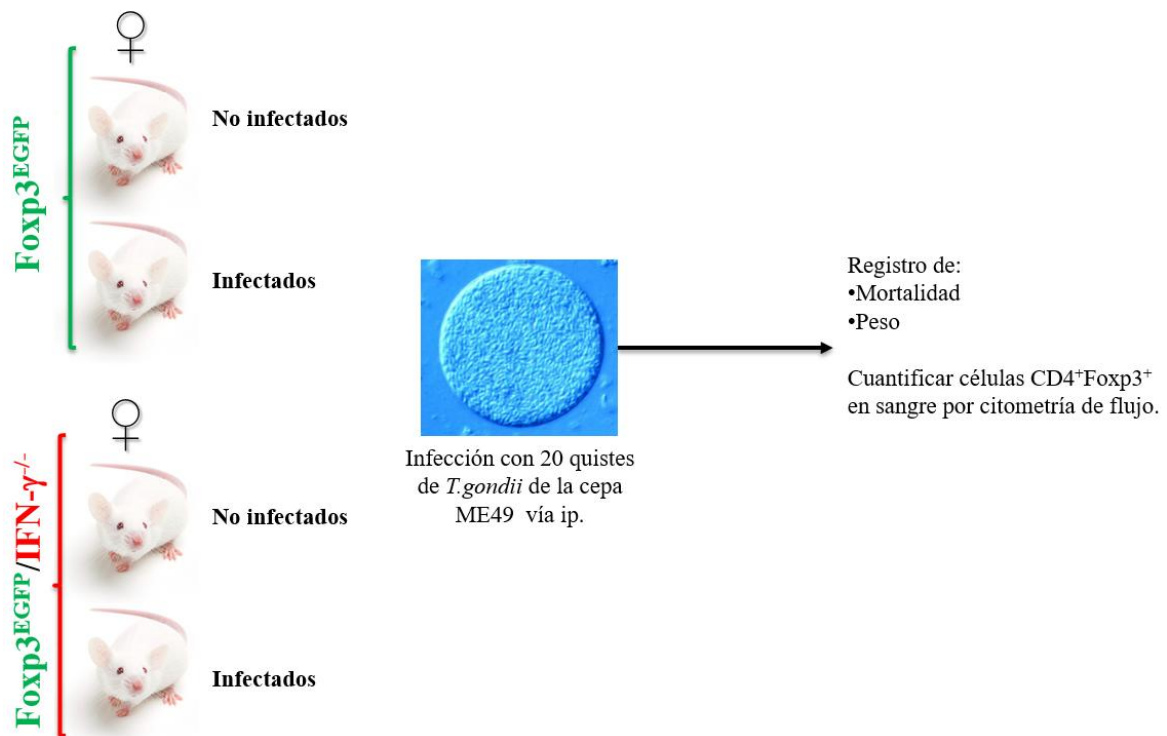




**Figura 28. Electroforesis de los PCRs para el genotipificado de ratones obtenidos de la F4.** A: marcador de peso molecular (carril I), control de ratón WT (carril III), control de ratón  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  (carril II), y ratones  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  KO (carriles 1-21). B: marcador de peso molecular (carril I), control de ratón WT (carril III), control de ratón  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  (carril II) y ratones  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  KO (carriles 22-47). Se obtuvieron 98 ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ .

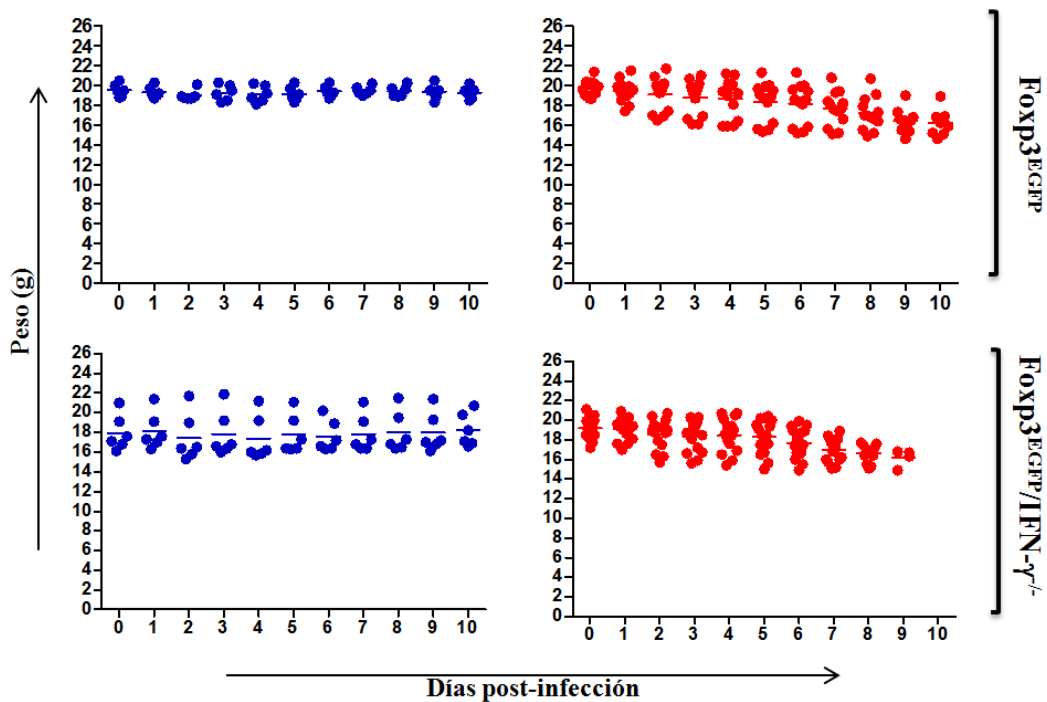
**VII.5. El papel del IFN- $\gamma$  sobre las células T reguladoras durante la fase aguda de la toxoplasmosis.**

La infección con *T. gondii* induce una disminución del número de células Tregs Foxp3<sup>+</sup> durante la fase aguda (Tenorio, 2011). En nuestro laboratorio se observó una correlación inversa entre los altos niveles IFN- $\gamma$  y los bajos números de células Tregs, lo que sugirió que esta citocina podría ser responsable de la disminución de las células Tregs durante la infección aguda (Olguín, 2016). Por lo tanto, para analizar el papel del IFN- $\gamma$  sobre las células T reguladoras se utilizaron los ratones dobles transgénicos Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> obtenidos, los cuales nos permitirán facilitar el estudio. La estrategia experimental se muestra en la Fig. 29.



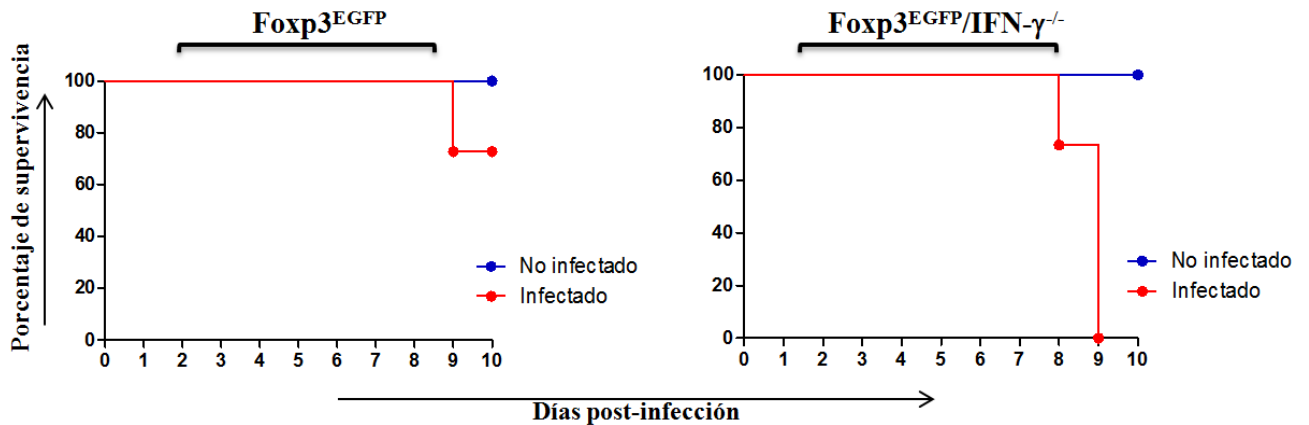
**Figura 29. Estrategia experimental para corroborar el papel que juega el IFN- $\gamma$  en la disminución de las Tregs durante la toxoplasmosis.** Todos los días se tomó registro de mortalidad, peso y se detectaron células T Foxp3<sup>EGFP+</sup> por citometría de flujo.

Desde el día 0 de la infección se tomó registro del peso de todos los ratones. Como se observa en la Fig. 30, los ratones infectados muestran una disminución de peso conforme avanza la infección en comparación a los ratones no infectados, ya que estos últimos mantienen su peso. No se observan diferencias significativas en la disminución del peso de los grupos infectados.



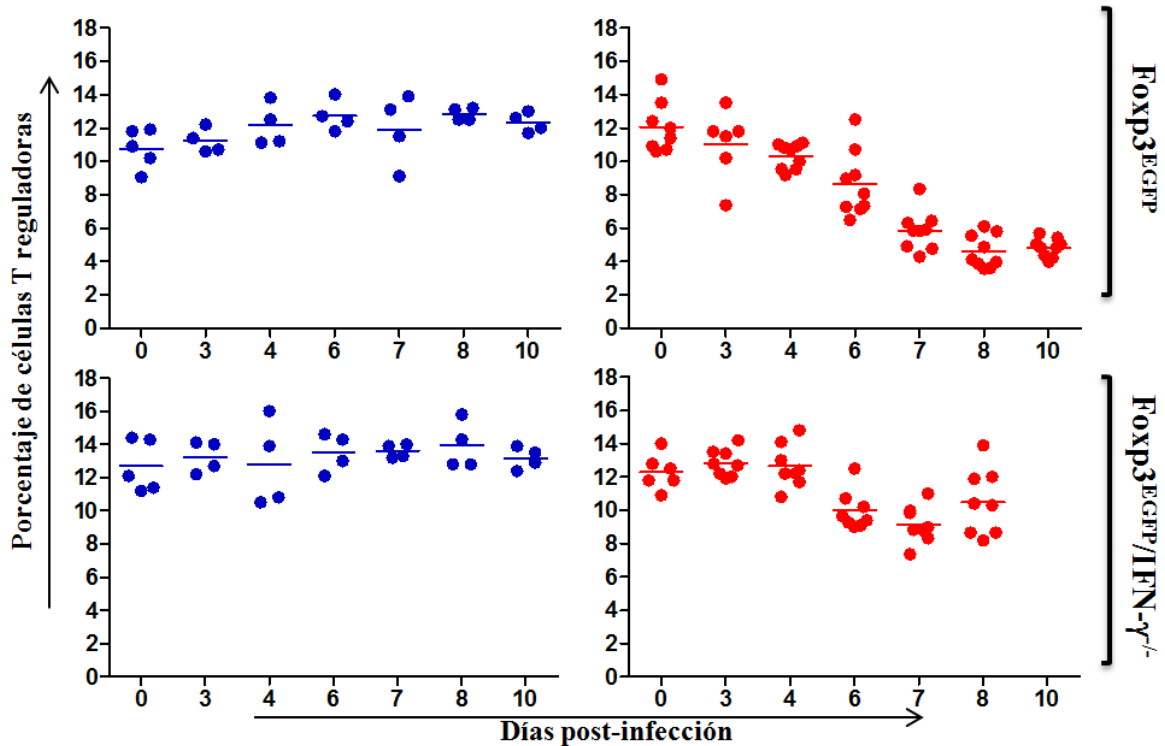
**Figura 30.** Registro de la disminución del peso (g) de los ratones  $Foxp3^{EGFP}$  y  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$ .

Los ratones  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  infectados murieron antes del día 9, mostrando un 100% de mortalidad, en comparación con los ratones  $Foxp3^{EGFP}$ , que sólo mostraron un 30 % en el día 10 (Fig. 31). Por lo tanto los ratones  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  son más susceptibles a la infección por *T. gondii*, como se esperaba. De los ratones  $Foxp3^{EGFP}$  no murieron, se mantuvo registro de la mortalidad alrededor de un mes de estos ratones y no se mostraron cambios.



**Figura 31. Porcentaje de supervivencia en los ratones  $Foxp3^{EGFP}$  y  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$ .** La infección con *T. gondii* en los ratones  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  es letal ya que el 100% de la población infectada muere entre el día 8 y 9.

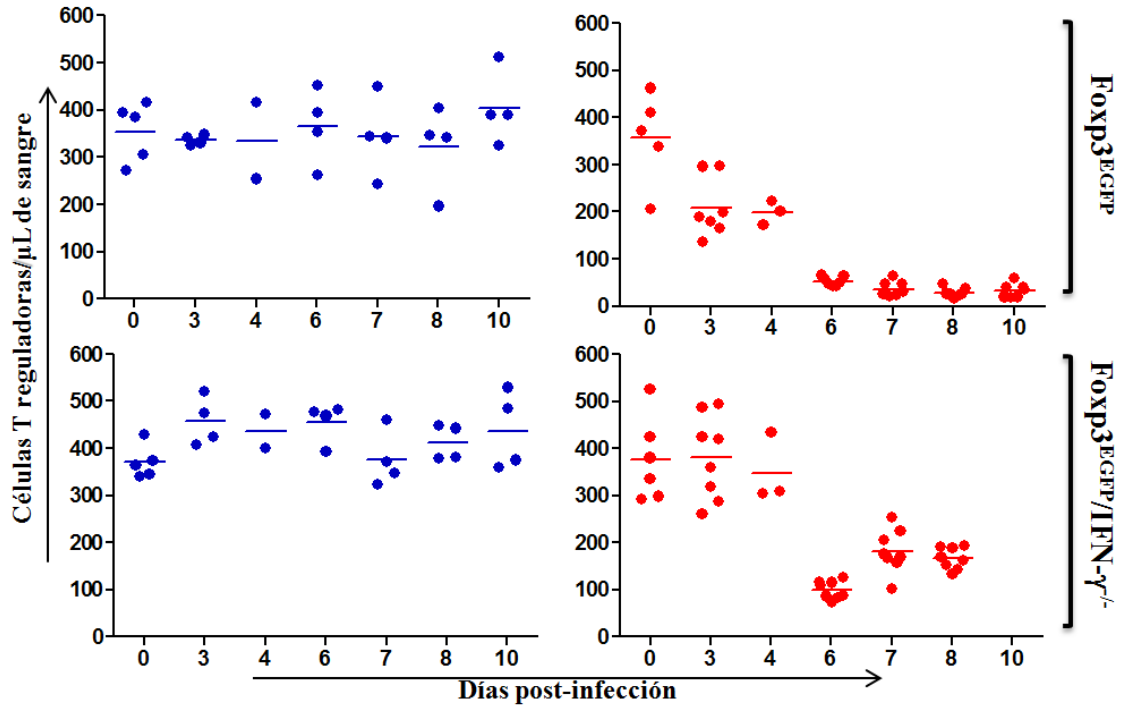
Por otra parte, se determinaron los niveles de células Tregs  $Foxp3^+$  en sangre de ambos grupos de ratones. En la Fig. 32 se observa que en los dos grupos infectados existe una disminución de células T reguladoras, en comparación con los grupos no infectados que mantienen sus porcentajes de Tregs normales. En los ratones  $Foxp3^{EGFP}$  infectados se observa una disminución continua desde el inicio de la infección; los porcentajes de las Tregs disminuyen hasta un 50% el día 7 y siguen disminuyendo aún más hasta el día 10. En los ratones  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  infectados, los primeros 4 días muestran un porcentaje de las células Tregs normal y a partir del día 6 se observa una disminución de un 20% de las Tregs, pero previo a la muerte se puede apreciar una ligera recuperación en el porcentaje.



**Figura 32. Disminución en el porcentaje de células T reguladoras.** La disminución de Tregs se retrasa en los ratones  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  ya que empieza a partir del día 4 y en la disminución del porcentaje solamente bajan hasta ~9%, por lo tanto la disminución no es tan agresiva en comparación con los ratones  $Foxp3^{EGFP}$ . Los puntos azules corresponden a los ratones no infectados y los puntos rojos a los ratones infectados.

Asimismo, se determinaron los números absolutos de células T reguladoras y se compararon las diferencias entre los ratones infectados (Fig. 33). En los ratones  $Foxp3^{EGFP}$  la disminución empieza desde el día 3 y continúa disminuyendo a lo largo del experimento; podemos observar que en el día 6 se detecta el menor número de Tregs, las cuales disminuyen alrededor de 86.85% y se mantienen a estos niveles hasta el día 10. En los ratones  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  las células T reguladoras se mantienen estables hasta el día 4 y posteriormente se observa una caída de alrededor de 73.6%, similar a la que se observa en

los ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ ; sin embargo, en los ratones doble transgénicos se observa una ligera recuperación en el número de Tregs en los días 7 y 8, previo a la muerte de los animales.



**Figura 33. Disminución en los números absolutos de células T reguladoras.** Los ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  presentan un retraso en la caída de las Tregs y en comparación de los ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ , muestran una ligera recuperación en los niveles de Tregs. Los puntos azules corresponden a los ratones no infectados y los puntos rojos a los ratones infectados.

## VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

El objetivo de este trabajo fue obtener una línea de ratón doble transgénica, la cual coexpresara el gen de EGFP después del factor de transcripción Foxp3 y que no se expresara el gen de IFN- $\gamma$ . Este ratón doble transgénico Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> fue obtenido mediante curzas y retrocruzas entre los ratones BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup> y BALB/c IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>. La obtención de esta línea de ratón nos permitiría el estudio y entendimiento del papel del IFN- $\gamma$  sobre las células T reguladoras durante la infección con *T. gondii*.

Para llevar a cabo este objetivo primero se tenía que montar un PCR para genotipificar a los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Este PCR nos permitiría identificar la ausencia o presencia del gen del IFN- $\gamma$ . Aunque éste se tratara de un PCR simple y que está reportado en la página *The Jackson Laboratory*, se necesitaba montarlo en nuestro laboratorio.

Para montar el protocolo del PCR en el laboratorio se usaron muestras de ADN de ratones WT e IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Se inició usando el kit **PCR SuperMix**; sin embargo, después de realizar varias pruebas no pudimos encontrar ningún amplificado, lo cual llamó nuestra atención, pues este kit se había utilizado en el laboratorio para genotipificar a los ratones BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup>. Dada esta situación se optó por utilizar el kit **KAPA Taq PCR kit**. Se realizaron las reacciones pero tampoco se observaron amplificados. Sin embargo, durante una repetición, sorpresivamente se encontró amplificado de las secuencias deseadas de los ratones WT y KO, pero al revisar el protocolo se identificó que debido a un error se agregó una concentración 10 veces más alta que lo establecido de la Taq polimerasa. Esta observación nos llevó a concluir que el componente responsable que la reacción no amplificara era la Taq polimerasa, debido a que se necesitan concentraciones muy altas de

la enzima por lo que este kit no fue viable.

Posteriormente se probó el kit **Phire Tissue Direct PCR Master Mix**, el cual tiene dos ventajas importantes: 1) permite obtener ADN directamente de tejido en ~10 min, lo que ahorra tiempo en comparación con los protocolos de purificación de ADN utilizados previamente (Laird et al., 1991), y 2) la Taq polimerasa de este kit está modificada en un dominio para unirse al ADN, lo que aumenta la eficiencia de polimerización. Tiene alta resistencia a muchos inhibidores de la PCR que se encuentran en el tejido animal. Asimismo esta polimerasa está unida a un *affibody*, el cual inhibe a la actividad de la enzima para prevenir amplificación de productos inespecíficos a temperatura ambiente, cuando se alcanzan temperaturas de polimerización el *affibody* se separa de la enzima para dejarla totalmente activa (Löfblom et al., 2010). Al realizar pruebas se observaron los amplificadores claramente de las regiones esperadas de los ratones WT y KO. Por lo tanto se eligió este kit para tener el protocolo de PCR que identifique la presencia o ausencia del gen de IFN- $\gamma$ .

Una vez montado el PCR para genotipificar a los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> se continuó con la realización de las cruzas para iniciar la obtención de la cepa doble transgénica. La razón por la cual se utilizaron machos IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> y hembras Foxp3<sup>EGFP</sup> para iniciar las cruzas consistió en la ubicación de los genes IFN- $\gamma$  y Foxp3. Estos genes se encuentran en los cromosomas 10 y X respectivamente. Por lo tanto como Foxp3 es un gen ligado al sexo, se usaron hembras Foxp3<sup>EGFP</sup>, las cuales son XX, por lo tanto se garantiza que todos los descendientes de la primera generación F1 tengan un cromosoma con el gen Foxp3<sup>EGFP</sup>. Los machos, por ser hemicigotos tendrían fijado desde la primera generación el gen de EGFP y por otro lado las hembras serían heterocigotas y presentarían un genotipo



Foxp3<sup>EGFP</sup> <sup>-/+</sup>. Respecto al IFN- $\gamma$  por tratarse de un gen autosómico, todos los descendientes tendrían una copia del alelo del gen del IFN- $\gamma$  interrumpido por lo que tendrían un genotipo heterocigoto para este gen (IFN- $\gamma$  <sup>-/+</sup>).

Se ocuparon solamente a los ratones machos de la F1 con el genotipo Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$  <sup>-/+</sup>, los cuales correspondieron al 50% de la población que se obtuvo, y se realizaron retrocruzas con hembras Foxp3<sup>EGFP</sup> para que todos los descendientes de la F2 heredaran un cromosoma X con el gen de EGFP de cada padre. Respecto al gen del IFN- $\gamma$  se obtuvo un 50% de la población con genotipo IFN- $\gamma$  <sup>-/+</sup>.

Es importante mencionar que las cruzas no se iniciaron con hembras IFN- $\gamma$  <sup>-/-</sup> y machos Foxp3<sup>EGFP</sup> ya que se hubiera seleccionado sólo a las hembras de la F1 con el genotipo Foxp3<sup>EGFP</sup> <sup>-/+</sup>/ IFN- $\gamma$  <sup>-/+</sup> y al realizar las retrocruzas con machos Foxp3<sup>EGFP</sup>, solamente un 25% de la población de la F2 (12.5% machos y 12.5% hembras) tendrían un genotipo Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$  <sup>-/+</sup>, lo cual corresponde a la mitad de la población obtenida cuando usamos machos IFN- $\gamma$  <sup>-/-</sup> y hembras Foxp3<sup>EGFP</sup> desde un inicio.

Después de haber fijado el gen de EGFP en toda la población de la F2 se realizaron cruzas entre hermanos heterocigotos Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$  <sup>-/+</sup> para fijar el gen interrumpido de IFN- $\gamma$ . Esta estrategia se utilizó para dar origen a la F3 ayudó a obtener los siguientes genotipos para el gen de IFN- $\gamma$ : ratones homocigotos (Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$  <sup>-/-</sup>), heterocigotos (Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$  <sup>-/+</sup>) y WT (Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$  <sup>+/+</sup>) (Crawley et al., 1997).

Al genotipificar a los ratones de la F3 se obtuvo un total de 82 individuos, de los cuales el 29.2% tuvieron el genotipo Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$  <sup>+/+</sup>, el 48.7% fueron Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$  <sup>-/+</sup>, y el 21.9% con un genotipo Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$  <sup>-/-</sup>. Estos porcentajes indican las frecuencias de los

genotipos obtenidos y corresponde a las frecuencias esperadas de la herencia mendeliana que se han descrito cuando se cruzan dos individuos de la misma especie siendo heterocigotos para un carácter (25% genotipo dominante, 50% heterocigotos y 25% genotipo recesivo) (Gayon, 2016).

De la generación F3 se obtuvieron los primeros ratones dobles transgénicos  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$ , los cuales se usaron como fundadores para realizar cruzas y expandir la cepa de ratones dobles transgénicos. Estas cruzas de apareamiento establecen que esta cepa sea endogámica por las repetidas cruzas de apareamiento entre hermanos (Paigen, 2003). Los descendientes de estas cruzas correspondieron a la generación F4, de los cuales el 100% de la población obtenida mostraron un genotipo  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  (50% machos y 50% hembras).

Algunas de los problemas que se pueden encontrar para obtener líneas de ratones consanguíneas son la obtención de camadas reducidas o que sean incompatibles para generar descendencia fértil (Beck et al., 2000). Sin embargo, durante el cruzamiento entre hermanos con el genotipo  $Foxp3^{EGFP}/IFN-\gamma^{-/-}$  no encontramos ninguno de estos dos problemas. De hecho encontramos lo contrario, es decir, los ratones dobles transgénicos obtenidos produjeron camadas más grandes en comparación con los ratones BALB/c  $Foxp3^{EGFP}$  y BALB/c  $IFN-\gamma^{-/-}$ . Sin embargo observamos una disminución de la talla de las crías pero después de la sexta semana de edad la talla se normalizó en comparación con las demás cepas. Por lo tanto, se concluyó que la disminución de talla en las crías se debe a la competencia por los nutrientes que les brinda la madre las primeras semanas, al crecer y alimentarse por sí solos la talla se normaliza.

Se mantuvo registro de las generaciones obtenidas, las cuales estuvieron bajo observación constante para detectar alguna anomalía. A pesar de que los ratones dobles transgénicos carecen del IFN- $\gamma$ , se desarrollan sanos como los ratones BALB/c WT lo que indica que esta citocina no es esencial en el desarrollo del sistema inmune. Sin embargo, son muy susceptibles a diferentes patógenos ya que muestran una disminución considerable de la actividad antimicrobiana de los macrófagos y en células NK es inhibida su actividad citolítica (Dalton et al., 1993). Se ha observado que los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  muestran una menor expresión del MHC de clase I y II, así como una mala regulación en el procesamiento y presentación de antígenos (Goes, 1995). Estos ratones se mantuvieron en la unidad de modelos biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas sin presentar signos patológicos.

Una vez obtenida la población adecuada de ratones dobles transgénicos se utilizaron para analizar el papel del IFN- $\gamma$  sobre las células Tregs durante la infección aguda con *T. gondii*. Para este fin se infectaron dos grupos de ratones: el grupo control Foxp3<sup>EGFP</sup> y el grupo experimental Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma^{-/-}$  como se observa en la Fig. 29.

En estudios anteriores se ha reportado que existe una pérdida gradual del peso en ratones infectados con *T. gondii*, lo que coincide con el inicio de la respuesta inmune celular (Aliberti et al., 2002; Gatkowska et al., 2012; Hrda et al., 2000). Por lo tanto, se tomó registro diario del peso durante todo el experimento y se observó una disminución gradual del peso de los ratones infectados tanto Foxp3<sup>EGFP</sup> como Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma^{-/-}$  de aproximadamente 20% de su peso inicial; ambos grupos de ratones infectados (Foxp3<sup>EGFP</sup> y Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma^{-/-}$ ) no recuperaron su peso durante el experimento. Debido a la infección también mostraron signos como postración, erizamiento y pérdida de locomoción, lo que

les impidió poder alimentarse. Estas observaciones corresponden con lo reportado en la literatura para ratones de la cepa BALB/c (Hrda et al., 2000; M. Johnson, 1988).

Otro parámetro del que se tomó registro fue la mortalidad. Los ratones dobles transgénicos  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ , al no expresar IFN- $\gamma$ , son altamente susceptibles a la infección con *T. gondii* mostrando un 100% de mortalidad en un periodo de 9 días. Esta alta susceptibilidad observada concuerda con lo descrito en la literatura, ya que en ratones C57BL/6 y BALB/c IFN- $\gamma$  KO infectados con *T. gondii* por vía oral, mostrando una alta susceptibilidad a pesar de las diferencias del fondo genético de cada cepa, pues las dos cepas de ratones mueren entre 9-10 días post-infección (Norose, 2001). Por lo tanto la cepa de ratones dobles transgénicos tiene las características de susceptibilidad a *T. gondii* esperadas.

Al analizar la cinética del porcentaje de las células T reguladoras durante el avance de la infección aguda con *T. gondii*, observamos una ligera disminución en el porcentaje de las células Tregs en los ratones dobles transgénicos de alrededor del 25 %. Estos resultados nos indican que el IFN- $\gamma$  está involucrado en la disminución de las células Tregs. Sin embargo, debido a que la disminución en el porcentaje no es tan drástica, en comparación con los ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ , el IFN- $\gamma$  puede no ser el único factor implicado.

La disminución del número absoluto de células Tregs en los ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  infectados fue muy ligera y se retrasó en comparación con los ratones  $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ . Estos resultados sugieren que el IFN- $\gamma$  es un factor que está involucrado en la disminución de las Tregs durante la fase aguda de la infección, aunque no es el responsable directo de este fenómeno. De hecho se sabe que altos niveles de IFN- $\gamma$  provocan efecto antiproliferativo e

induce señales pro-apoptóticas por la expresión de la caspasa 1 o independientemente por la actividad de IRF-1 (Saha et al., 2010; Schroder, 2004). El IFN- $\gamma$  también potencializa el estrés del retículo endoplasmático en diferentes tejidos induciendo la muerte celular (Lees, 2014). Asimismo activa la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y NO en macrófagos, los cuales pueden formar un potente oxidante que provoca peroxidación lipídica en las membranas celulares (Miller, 2009). Incluso se ha reportado que la señalización del IFN- $\gamma$  induce autofagia en linfocitos llevándolos a una muerte celular programada (Feng et al., 2008).

Se sabe que durante la infección con *T. gondii* se desencadena una respuesta inmune tipo Th1 (Montoya, 2004), la cual promueve activación y expansión de células NK y células T que expresan altos niveles de T-bet, el cual está asociado con la producción de IFN- $\gamma$  (Szabo et al., 2000). Asimismo T-bet inhibe la producción de IL-2, IL-4 e IL-17, reprimiendo la diferenciación de células CD4<sup>+</sup> a otros tipos celulares como Th2 y Th17 (Harms Pritchard et al., 2015).

Se ha reportado que en ratones infectados con *T. gondii* durante la fase aguda muestran una disminución en la producción de IL-2 (Haque et al., 1994; Oldenhove et al., 2009). Posteriormente se demostró que debido a la respuesta Th1, las células CD4<sup>+</sup> muestran una reducción en la producción de IL-2, lo que provoca el colapso de las células Tregs durante la infección (Oldenhove et al., 2009). Por lo tanto, junto con la IL-2, el IFN- $\gamma$  también contribuye a dicha disminución.

En este trabajo también se realizó la cinética del número de células CD4<sup>+</sup> durante la infección. Esta población mostró una curva muy similar a las observadas en células T reguladoras, tanto en los ratones Foxp3<sup>EGFP</sup> como en los dobles transgénicos

Foxp3<sup>EGFP</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Esto concuerda con los resultados reportados (Oldenhove et al., 2009); la disminución de las células CD4<sup>+</sup> durante la infección probablemente es debido a la falta de la producción de la IL-2, la cual es indispensable para la supervivencia de las células T y células Tregs (Boyman and Sprent, 2012), por lo tanto, el IFN- $\gamma$  también influye en la disminución de las células CD4<sup>+</sup>.

En una investigación realizada por Hwang et al. reportan que T-bet sufre modificaciones post-traduccionales, en las cuales una caseína cinasa I (CKI) fosforila la serina 508 de la proteína T-bet (Oh and Hwang, 2014). Esta fosforilación es requerida para que T-bet forme un heterodímero con RelA, un factor de transcripción de la familia NF- $\kappa$ B, y esta interacción provoca que RelA interfiera con el promotor de la IL-2 suprimiendo de esta forma el gen (Hwang et al., 2005; Oh and Hwang, 2014).

Por lo tanto, la disminución de las células Tregs durante la infección aguda con *T. gondii* probablemente es causada por la disminución de la producción de la IL-2 y por el incremento del IFN- $\gamma$ . Aunque no sabemos exactamente los mecanismos del IFN- $\gamma$  sobre las células Tregs, los ratones dobles transgénicos obtenidos serán usados para investigar los mecanismos de acción del IFN- $\gamma$  durante este fenómeno.

## IX. REFERENCIAS.

1. Aliberti, J. (2005). Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature review*. 5, 162–170.
2. Aliberti, J., Serhan, C., and Sher, A. (2002). Parasite-induced lipoxin A 4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Exp. Med.* 196, 1253–1262.
3. Araujo, F.G. (1979). Strain-dependent differences in murine susceptibility to toxoplasma. *Infect. Immun.* 13, 1528–1530.
4. Beck, J.A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J.T., Festing, M.F.W., and Fisher, E.M.C. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nat. Genet.* 24, 23–25.
5. Becker, C., and Stoll, S. (2006). Regulatory T cells: Present facts and future hopes. *Med. Microbiol. Immunol.* 195, 113–124.
6. Billiau, A. (2009). Interferon-gamma: A historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 97–113.
7. Black, M.W., and Boothroyd, J.C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 607–623.
8. Blouin, C.M. (2013). Interferon gamma receptor: The beginning of the journey. *Front. Immunol.* 4, 1–10.
9. Boehm, U. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749–795.
10. Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12, 180–190.
11. Cai, G., Radzanowski, T., Villegas, E.N., Kastelein, R., and Hunter, C.A. (2000). Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 165, 2619–2627.
12. Cenci-Goga, B.T., Rossitto, P. V, Sechi, P., McCrindle, C.M.E., and Cullor, J.S. (2011). *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 751–762.
13. Crawley, J.N., Belknap, J.K., Collins, a, Crabbe, J.C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R.J., Maxson, S.C., Miner, L.L., Silva, a J., et al. (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)*. 132, 107–124.

14. Curotto de Lafaille, M.A. (2009). Natural and adaptive Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. *30*, 626–635.
15. Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, and Stewart, T. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* *259*, 1739–1742.
16. Dardé, M.L. (2004). Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. *40*, 57–63.
17. Darnell, J.E. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. *264*, 1415–1421.
18. De la Rosa, M. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2480–2488.
19. Denkers, E.Y. (2003). From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *Immunol. Med. Microbiol.* *39*, 193–203.
20. Dhamne, C. (2013). Peripheral and thymic Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in search of origin, distinction, and function. *Front. Immunol.* *4*, 1–11.
21. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* *11*, 267–299.
22. Dumetre, A., Dubey, J.P., Ferguson, D.J.P., Bongrand, P., Azas, N., and Puech, P.H. (2013). Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 11535–11540.
23. Feng, C.G., Zheng, L., Jankovic, D., Báfica, A., Cannons, J.L., Watford, W.T., Chaussabel, D., Hieny, S., Caspar, P., Pamela, L., et al. (2008). Immunity Related GTPase Irgm1 promotes expansion of activated CD4<sup>+</sup> T cell populations by preventing interferon- $\gamma$ -induced cell death. *Nat. Immunol.* *9*, 1279–1287.
24. Fensterl, V., Chattopadhyay, S., and Sen, G.C. (2015). No love lost between viruses and interferons. *Annu. Rev. Virol.* *2*:549–572
25. Filisetti, D., and Candolfi, E. (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. *40*, 71–80.
26. Fontenot, J.D. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.



27. Fontenot, J.D. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity* 22, 329–341.
28. Gaddi, P. (2007). Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol. Cell Biol.* 85, 155–159.
29. Gangneux, F.R., and Dardé, M.L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 264–296.
30. Gatkowska, J., Wiczorek, M., Dziadek, B., Dzitko, K., and Dlugonska, H. (2012). Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. *Parasitol. Res.* 111, 53–58.
31. Gayon, J. (2016). From Mendel to epigenetics: History of genetics. *C. R. Biol.* 339, 225–230.
32. Gazzinelli, R. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma, and TNF-alpha. *J. Immunol.* 157, 798–805.
33. Gazzinelli, R. (2014). Minireview innate resistance against *Toxoplasma gondii*: An evolutionary tale of mice, cats, and men. *Cell Host Microbe* 15, 132–138.
34. Geita, S. (2012). A review on human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 44, 805–814.
35. Gigley, J.P. (2016). The diverse role of NK cells in immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog.* 12, 13–18.
36. Goes, N. (1995). Disturbed MHC Regulation in the IFN-gamma Knockout Mouse. *J. Immunol.* 155, 4559–4566.
37. Gratz, I.K., Rosenblum, M.D., and Abbas, A.K. (2013). The life of regulatory T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1283, 8–12.
38. Guzmán-Flores, J.M. (2013). Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). *Gac. Med. Mex.* 149, 630–638.
39. Halonen, S.K., and Weiss, L.M. (2013). Toxoplasmosis. *Handb. Clin. Neurol.* 114, 125–145.
40. Haque, S., Khan, I., and Haque, A. (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.

41. Haribhai, D., Lin, W., Relland, L.M., Truong, N., Williams, C.B., and Chatila, T. (2007). Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J. Immunol.* *178*, 2961–2972.
42. Harms Pritchard, G., Hall, A.O., Christian, D.A., Wagage, S., Fang, Q., Muallem, G., John, B., Glatman Zaretsky, A., Dunn, W.G., Perrigoue, J., et al. (2015). Diverse roles for T-bet in the effector responses required for resistance to infection. *J. Immunol.* *194*, 1131–1140.
43. Hill, D.E., Chirukandoth, S., and Dubey, J.P. (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim. Heal. Res. Rev.* *6*, 41–61.
44. Hori, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* *299*, 1057–1061.
45. Hori, S. (2004). Foxp3: A critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* *6*, 745–751.
46. Howard A, Y. (1995). Role of interferon- $\gamma$  in immune cell regulation. *J. Leuk. Biol.* *58*, 373–381.
47. Howe, D.K., Sibley, L.D., Howe, D.K., and Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises of parasite three clonal lineages : correlation with human disease genotype. *J. Infect. Dis.* *172*, 1561–1566.
48. Hrda, S., Votypka, J., Kodym, P., and Flegr, J. (2000). Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral changes in mice. *J. Parasitol.* *86*, 657–663.
49. Hunter, C.A. (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: Regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* *62*, 2818–2824.
50. Hwang, E.S., Hong, J.-H., and Glimcher, L.H. (2005). IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J. Exp. Med.* *202*, 1289–1300.
51. Ibrahim, H.M., Xuan, X., and Nishikawa, Y. (2010). *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18 regulates the proliferation and migration of murine macrophages and spleen cells. *Clin. Vaccine Immunol.* *17*, 1322–1329.
52. Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Ser B* *147*, 258–267.
53. Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F.F., and Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T Cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 531–564.

54. Kalvakolanu, D. V (2003). Alternate interferon signaling pathways. *Pharmacol. Ther.* *100*, 1–29.
55. Kaufman, H.E. (1958). Toxoplasmosis: the nature of virulence. *Am. J. Ophthalmol.* *46*, 251–255.
56. Khan, I.A., Thomas, S.Y., Moretto, M.M., Lee, F.S., Islam, S.A., Combe, C., Schwartzman, J.D., and Luster, A.D. (2006). CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog.* *2*, 484–500.
57. Kotenko, S. V. (2011). IFN- $\lambda$ s. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 583–590.
58. Lahl, K. (2007). Selective depletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* *204*, 57–63.
59. Laird, P.W., Zijderveld, Linders, K., Rudnicki, M., Jaenisch, R., and Berns, (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* *19*, 4293.
60. Lang, C. (2012). Impaired chromatin remodelling at STAT1-regulated promoters leads to global unresponsiveness of *Toxoplasma gondii*-infected macrophages to IFN-gamma. *PLOS Pathog.* *8*, 1–17.
61. Lazear, H.M., Nice, T.J., and Diamond, M.S. (2015). Interferon- $\lambda$ : immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immunity* *43*, 15–28.
62. Lees, J.R. (2014). Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage. *Cytokine* *74*, 18–26.
63. Li, Z. (2015). FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells and their functional regulation. *Cell. Mol. Immunol.* *12*, 558–565.
64. Lin, F.C. (2013). The talented interferon-gamma. *Adv. Biosci. Biotechnol.* *04*, 6–13.
65. Lin, W. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat. Immunol.* *8*, 359–368.
66. Lin, X., and Chen, M. (2013). Advances in distinguishing natural from induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *6*, 116–123.
67. Löfblom, J., Feldwisch, J., Tolmachev, V., Carlsson, J., Ståhl, S., and Frejd, F.Y. (2010). Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Lett.* *584*, 2670–2680.
68. M. Johnson, A. (1988). Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* cysts and oocysts measured

- by fever and weight loss in mice. *Int. J. Parasitol.* *18*, 865–868.
69. MacMicking, J. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* *15*, 323–350.
70. Meager, A. (2009). The interferons: Past, present and future. *Dig. Liver Dis. Suppl.* *3*, 3–8.
71. Mestas, J. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* *172*, 2731–2738.
72. Miller, C.M. (2009). The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* *39*, 23–39.
73. Miyara, M. (2007). Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* *13*, 108–116.
74. Mizui, M., and Kikutani, H. (2008). Neuropilin-1: the glue between regulatory T cells and dendritic cells? *Immunity* *28*, 302–303.
75. Montoya, J. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* *363*, 1965–1976.
76. Naylor, S.L. (1984). Mouse immune interferon (IFN-gamma) gene is on chromosome 10. *Somat. Cell Mol. Genet.* *10*, 531–534.
77. Neyer, L.E. (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.
78. Nocentini, G. (2007). GITR/GITRL: More than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur. J. Immunol.* *37*, 1165–1169.
79. Norose, K. (2001). Organ infectivity of *Toxoplasma gondii* in interferon-gamma knockout mice. *J. Parasitol.* *87*, 447–452.
80. Oh, S., and Hwang, E.S. (2014). The Role of protein modifications of T-Bet in cytokine production and differentiation of T helper cells. *J. Immunol. Res.* *2014*, 1–7.
81. Ohkura, N., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells: Roles of T cell receptor for their development and function. *Semin. Immunopathol.* *32*, 95–106.
82. Olguín Hernández, E.J. (2016). Papel de las células T reguladoras en la respuesta inmune contra *Toxoplasma gondii* en el modelo murino. (Tesis doctoral). Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México.

83. Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J.A., Chou, D., Dos santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., et al. (2009). Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 31, 772–786.
84. Paigen, K. (2003). One hundred years of mouse genetics: An intellectual history. I. The classical period (1902-1980). *Genetics* 163, 1–7.
85. Peterson, R. a. (2012). Regulatory T-cells: Diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol. Pathol.* 40, 186–204.
86. Pollard, A.M. (2009). The role of specific *Toxoplasma gondii* molecules in manipulation of innate immunity. *Cell* 25, 491–494.
87. Saha, B., Jyothi Prasanna, S., Chandrasekar, B., and Nandi, D. (2010). Gene modulation and immunoregulatory roles of Interferon-gamma. *Cytokine* 50, 1–14.
88. Sakaguchi, S. (2009). Regulatory T cells: How do they suppress immune responses? *Int. Immunol.* 21, 1105–1111.
89. Sakaguchi, S., and Sakaguchi, N. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing 1L-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). *J. Immunol.* 155, 1151–1164.
90. Sakaguchi, S., Wing, K., and Miyara, M. (2007). Regulatory T cells - A brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* 37, 116–123.
91. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775–787.
92. Schlüter, D., Däubener, W., Schares, G., Groß, U., Pleyer, U., and Lüder, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 917–929.
93. Schroder, K. (2004). Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.
94. Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636–645.
95. Shtrichman, R. (2001). The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 251–259.
96. Silva, N.M., Vieira, J.C.M., Carneiro, C.M., and Tafuri, W.L. (2009). *Toxoplasma gondii*: The role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. *Exp. Parasitol.* 123, 65–72.

97. Sturge, C.R., and Yarovinsky, F. (2014). Complex immune cell interplay in the IFN- $\gamma$  response during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 82, 3090–3097.
98. Sullivan, W. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *Microbiol. Rev.* 36, 717–733.
99. Suzuki, Y., Oretunua, M. a, Schreiber, R.D., and Remington, J.S. (1985). Interferon-gamma : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 240, 1–3.
100. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655–669.
101. Tenorio, E.P. (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.* 41, 3529–3541.
102. Torres, M., Guiton, R., Lacroix-lamandé, S., Ryffel, B., Leman, S., and Dimier poisson, I. (2013). MyD88 is crucial for the development of a protective CNS immune response to *Toxoplasma gondii* infection. *J. Neuroinflammation.* 10, 1–12.
103. Tying, S.K. (1995). Interferons : Biochemistry and mechanisms of action. *Am. J. Obs. Gynecol* 172, 1350–1353.
104. Vignali, D.A. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.
105. Vilcek, J. (2006). Fifty years of interferon research: Aiming at a moving target. *Immunity* 25, 343–348.
106. Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (2016). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1, 405–413.
107. Wang, Y.M. (2016). Development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *Nephrology* 21, 81–85.
108. Wheelock, E.F. (1965). Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science.* 149, 310–311.
109. Yadav, M., and Stephan, S. (2013). Peripherally induced Tregs-role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front. Immunol.* 4, 1–12.
110. Yarovinsky, F. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-

like protein. *Science*. 308, 1626–1629.

111. Yarovsky, F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 109–121.
112. Yuan, X., and Malek, T.R. (2012). Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells. *Hum Immunol* 73, 773–782.