



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO MURINO
PARA LA EVALUACIÓN DE CÉLULAS
TH1 Y TH17 ANTÍGENO ESPECÍFICAS *IN VIVO*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

MONTES DE OCA LAGUNAS MERCEDES SELINA

ASESORAS:

DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

DRA. SANDRA AMYRIS ORTEGA FRANCISCO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi madre, Olga Montes de Oca, la mujer más fuerte que conozco y que me proporcionó siempre las armas para salir adelante. A ti te lo debo todo, gracias por impulsarme y enseñarme que siempre puedo dar un poco más de lo que pienso.

A mis abuelos, Atanacia Lagunas y Roberto Montes de Oca, que me dieron un hogar y siempre me arroparon como su hija. Ustedes siempre serán mi motivación e inspiración en la vida.

A Francisco Ajuech, gracias por apoyarme en los momentos de crisis donde necesito calma para resolver los problemas.

A Julio César Vanegas, a ti lo que has estado conmigo apoyándome, animándome y creyendo en mí en cada momento durante el tiempo que ha durado esta travesía. Eres el mejor compañero que pude haber elegido para compartir mi vida.

A mis tíos, Francisco y Marisela Montes de Oca, que siempre me han apoyado y han visto por mí. Ustedes son unos segundos padres para mí.

A Marlene Zepeda, gracias por todas tus porras, acompañamiento durante mis momentos de estrés y por apoyarme incluso con mis alucinaciones de parálisis del sueño.

A mis amigos Mariana Caballero, Adán Torres, Sharon Padilla, Gabriela Morales, Daniela López, Hugo Martínez, Fernando Téllez, Jessica Gómez e Irais Domínguez, por todos estos años de estudio, apoyo, chisme y diversión en los salones, biblioteca, cafetería y en las prácticas de hemisemestres. Gracias por su apoyo y ayuda en cada paso recorrido.

A Serafina. Siempre serás la mayor y principal inspiración para haber estudiado esta carrera tan noble y que tanto amo. Te fuiste hace años, pero me enseñaste que el amor perruno es el más puro e incondicional que los humanos podemos recibir.

A mis gatos, Vaca Isabel, Güero Israel, Frijol Antonio, Parches David, Beta, Mami, Félix, Negrito, Alicia, Rocky, Lía Stephania y Picky, gracias por cada ronroneo lleno de amor, por acompañarme cada noche estudiando y por inspirarme día a día en cada aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia FMVZ por su apoyo para mi formación profesional.

A los profesores de la FMVZ UNAM que fueron parte importante de mi formación académica, la MVZ Laura Patricia Noe Martínez, el M. en C. Jesús Manuel Cortez y el M. en C. Antonio Roldán Roldán. Ustedes son un modelo a seguir para mí. Gracias por enseñarme a razonar, a cuestionarme todo y a estudiar para la vida y no para un examen. Los admiro demasiado y los tengo siempre presentes en cada paso que doy.

A la Dra. Gloria Soldevila le agradezco enormemente por aceptarme como su alumna y darme la oportunidad de aprender sobre el campo de la inmunología en un laboratorio de excelencia; además, le agradezco profundamente y con el corazón todo el apoyo y comprensión que me ha brindado a nivel personal.

A mis compañeros de equipo "inhibinas/betaglicano" del Soldelab. A la Dra. Sandra, gracias por la inmensa paciencia que me has tenido todos estos años, sé que ha sido muchísima porque soy chiquita, jaja, también gracias por siempre motivarme a aprender y por todo el conocimiento que me transmitiste siempre con la mejor disposición. Alexandra, muchas gracias por lo ameno que me recibiste cuando llegué al laboratorio, valoro muchísimo tu amistad y agradezco cada enseñanza, consejo y conversación. Adrián, compa, agradezco muchísimo todo lo que me apoyaste, fue increíble conocerte y apreciar mucho nuestros recuerdos escuchando música mientras trabajábamos y reíamos mil.

A mis compañeros del Soldelab: Dinorah, Miguel, Frida, Arimelek, Saúl, Katya, Cynthia y Nara, gracias por sus consejos, apoyo, orientación y compañerismo. Sin duda la hora de la comida con ustedes en el jardín del instituto era de mis momentos favoritos del día en tiempos pre-covid. También debo agradecer a Marco y a Alicia por todo el cariño con el que me han tratado, por echarme porras y compartir conmigo un poquito de su esencia.

Al M. en C. Óscar Hernández por el apoyo en la transferencia de células en los ratones.

A la Dra. Roxana Alor por el apoyo en la inoculación subdérmica en la oreja de ratón.

Al Laboratorio Nacional de Citometría por el apoyo brindado para realizar el *sorting* y adquisición de las muestras de los experimentos realizados en esta tesis.

*“La medicina cura al hombre,
la medicina veterinaria cura a la humanidad”*

Louis Pasteur.



CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. RESPUESTA INMUNE	2
2.1.1. RESPUESTA INMUNE INNATA.....	3
2.1.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....	4
2.2. LINFOCITOS T.....	8
2.2.1. DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.....	8
2.2.2. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T.....	12
2.2.3. DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T COOPERADORES.....	15
2.3. MODELOS MURINOS PARA EVALUAR LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T.....	23
2.3.1. MODELOS DE INMUNIZACIÓN PARA EVALUAR LA RESPUESTA ANTÍGENO ESPECÍFICA <i>IN VIVO</i>	24
2.3.2. MODELOS TRANSGÉNICOS PARA EVALUAR LA RESPUESTA PÉPTIDO ESPECÍFICA.....	26
2.3.3. MODELOS DE DIRECCIONAMIENTO A CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	29
2.4. APLICACIÓN DE UN MODELO MURINO CON ANTÍGENO DIRIGIDO.....	32
3. ANTECEDENTES.....	33
4. JUSTIFICACIÓN.....	36
5. HIPÓTESIS.....	37
6. OBJETIVOS.....	37
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
8. METODOLOGÍA.....	54
9. RESULTADOS.....	55
10. DISCUSIÓN.....	81
11. CONCLUSIONES.....	89
12. PERSPECTIVAS.....	90
13. REFERENCIAS.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Componentes del sistema inmune innato y adaptativo.	7
2	Esquema general del desarrollo de linfocitos T en el timo.	11
3	Señalización mediante el TCR.	15
4	Diferenciación de linfocitos T CD4 ⁺ .	16
5	Polarización de los linfocitos T CD4 ⁺ .	20
6	Flexibilidad y plasticidad de linfocitos T CD4 ⁺ .	22
7	Principio del antígeno dirigido.	30
8	Identificación de ratones por muesca en las orejas.	39
9	Sexado de ratones por observación de la zona perianal.	40
10	Toma de muestra de sangre de ratón de vena mandibular.	41
11	Comparación entre un reestímulo <i>in vitro</i> de 48 horas con el péptido de OVA y un doble reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA y además 6 horas con PMA-Ionomicina, inmunizando con PBS, OVA y OVA-CT.	53

12	Comparación entre un reestímulo <i>in vitro</i> de 6 horas con PMA-Ionomicina y un reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT.	53
13	Comparación entre un reestímulo <i>in vitro</i> de 48 horas con el péptido de OVA inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA-CT.	54
14	Comparación entre un reestímulo <i>in vitro</i> de 6 horas con PMA-Ionomicina, y 24 y 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT.	54
15	Análisis para la fenotipificación del modelo murino OT-II.	55
16	Análisis para la fenotipificación del modelo murino CD45.1	56
17	Análisis de la diferenciación <i>in vivo</i> para determinar la población Th1 y Th17.	58
18	Viabilidad celular después del reestímulo <i>in vitro</i> .	59
19	Número de células antígeno específicas V β 5 ⁺ y CD4 ⁺ después del re-estímulo <i>in vitro</i> .	60
20	Evaluación de la expresión de IL-17 e IFN- γ en linfocitos murinos.	61
21	Número de células y porcentaje de linfocitos Th1 y Th17 diferenciados en un modelo murino <i>in vivo</i> .	62
22	Viabilidad celular después del reestímulo <i>in vitro</i> .	64
23	Número de células antígeno específicas V β 5 ⁺ y CD4 ⁺ después del reestímulo <i>in vitro</i> .	65
24	Evaluación de la expresión de IL-17 e IFN- γ en linfocitos murinos.	66
25	Número de células y porcentaje de linfocitos Th1 y Th17 diferenciados en un modelo murino <i>in vivo</i> .	68

26	Viabilidad celular después del reestímulo <i>in vitro</i> .	70
27	Número de células antígeno específicas V β 5 ⁺ y CD4 ⁺ después del reestímulo <i>in vitro</i> .	71
28	Evaluación de la expresión de IL-17 e IFN- γ en linfocitos murinos.	72
29	Número de células y porcentaje de linfocitos Th1 y Th17 diferenciados en un modelo murino <i>in vivo</i> .	74
30	Viabilidad celular después del reestímulo <i>in vitro</i> .	76
31	Número de células antígeno específicas V β 5 ⁺ y CD4 ⁺ después del reestímulo <i>in vitro</i> .	77
32	Evaluación de la expresión de IL-17 e IFN- γ en linfocitos murinos.	78
33	Número de células y porcentaje de linfocitos Th1 y Th17 diferenciados en un modelo murino <i>in vivo</i> .	79
34	Resumen de resultados de la estandarización de un modelo murino <i>in vivo</i> para la evaluación de linfocitos T efectores Th1 y Th17 con un antígeno específico dirigido.	88

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Características principales de los subtipos de linfocitos T CD4 ⁺ .	18
2	Ejemplos de algunos modelos murinos transgénicos que se usan para diversas vacunas y sus características.	25
3	Anticuerpos acoplados a fluorocromos utilizados durante los experimentos.	52
4	Resumen de resultados: número y porcentaje de eventos de cada condición de inmunización y de tiempo de reestímulo <i>in vitro</i> de cada ensayo realizado.	80

ABREVIATURAS

ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2.
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium.
ADAP	Adhesion and Degranulation-Promoting Adaptor Protein.
AP-1	Activator Protein 1.
APC	Antigen Presenting Cells.
BCR	B Cell Receptor.
Bcl-6	B-Cell Lymphoma 6.
CFA	Complete Freund's Adjuvant.
CMJ	Corticomedullary junction.
CT	Cholera Toxin.
cTECs	Cortical Thymic Epithelial Cells.
DAMPs	Damage-associated molecular pattern.
DC	Dendritic Cell.
DN	Double Negatives.
DP	Double Positive.
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis.
ELP	Early lymphoid progenitors.
FDA	Food and Drug Administration.
FoxP3	Forkhead box P3.
GATA-3	GATA-binding protein 3.
GRB2	Growth factor Receptor-Bound protein 2.
ILC	Innate Lymphocyte Cells.
IFN-γ	Interferon Gamma.
IS	Immunological synapse.
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif.
LAT3	Linker for Activation of T cells 3.
LCK	Lymphocyte-Specific Protein Tyrosine Kinase.
MAC	Membrane attack complex.
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue.
MAP	Mitogen-Activated Protein Kinases.

MHC	Major Histocompatibility Complex.
MS	Multiple sclerosis.
mTECs	Medular Thymic Epithelial Cells.
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells.
NF-KB	Nuclear Factor Kappa B.
NK	Natural Killer.
OVA	Ovalbumin.
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns.
PMA-IONO	PMA-Ionomycin.
pOVA	OVA peptide.
PKC	Protein kinase C.
PLCy1	Phospholipase C gamma 1.
PMA	Phorbol Myristate Acetate.
PP	Peyer's patches.
PRRs	Pattern-Recognition Receptors.
PVR	Poliovirus receptor.
RORyT	RAR-related orphan receptor gamma.
S1P1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1.
SLO	Secondary lymphoid organs.
SP	Simple Positives.
SPF	Specific Pathogen Free.
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription.
TCR	T Cell Receptor.
Tg	Transgenic.
TGF-β	Transforming Growth Factor β.
Th	T helper.
Treg	T regulatory cell.
WT	Wild type.
ZAP70	Zeta-Chain-Associated Protein Kinase 70.

1. RESUMEN

MONTES DE OCA LAGUNAS MERCEDES SELINA. “Estandarización de un modelo murino para la evaluación de células Th1 y Th17 antígeno específicas *in vivo*”. Bajo la supervisión de la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo y la Dra. Sandra Amyris Ortega Francisco.

Los ratones son los animales más utilizados en la investigación médica, esto debido a que los seres humanos compartimos muchas características genéticas comunes con ellos y, al examinar la fisiología, anatomía y el metabolismo de un ratón a través de diversas investigaciones, se puede obtener una valiosa información que se puede extrapolar hacia los seres humanos, es por ello que se realizó la estandarización de un modelo murino para la evaluación de linfocitos T efectores Th1 y Th17 antígeno específicos *in vivo*.

En el presente trabajo se evaluaron diferentes condiciones de inmunización y de reestímulo *in vitro* de células diferenciadas *in vivo* para llegar a las condiciones ideales que permitan evaluar la diferenciación de linfocitos T efectores Th1 y Th17, para ello se aislaron células CD4⁺CD25⁻ de ratones OT-II que se transfirieron a ratones CD45.1 por vía intravenosa a través del seno retro-orbital. Después, se inmunizó a las ratonas CD45.1 por vía intradérmica en las orejas con las condiciones de PBS, OVA, OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA-CT. Pasada una semana, se realizó la colección y procesamiento de linfonodos mandibulares de las ratonas CD45.1 para obtener una suspensión de células CD4⁺Vβ5⁺CD45.1⁺ y realizar diferentes tiempos de reestímulo *in vitro* con el péptido de OVA y PMA-Ionomicina. Al final se realizó inhibición del transporte de proteínas, una tinción superficial, permeabilización y tinción intracelular, para adquirir y evaluar las muestras por citometría de flujo y analizar los datos obtenidos de cada una de éstas. De acuerdo con los resultados, las condiciones ideales para observar una buena cantidad de células y un buen porcentaje de células diferenciadas para ambos linajes Th1 y Th17 es la inmunización con OVA-CT y 6 horas de reestímulo con PMA-Ionomicina.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La respuesta inmune

El término "inmunidad" deriva del latín *immunitas*, término inicialmente utilizado para hacer referencia al estatus legal o protección de la que gozaban las ciudades-estado romanas a las que se les otorgaba inmunidad para pagar tributos a Roma o eran exentas de los deberes municipales (1). Posteriormente, el término se utilizó en un contexto biológico para hacer referencia a la defensa contra microorganismos infecciosos, como bacterias, virus, hongos y parásitos, así como el desarrollo de diversas enfermedades como el cáncer. Dicha protección es posible gracias a la organización de moléculas, células, órganos y tejidos con funciones especializadas, que forman al sistema inmunológico (2).

La respuesta inmune utiliza una compleja serie de mecanismos de protección para regular y, por lo general, eliminar microorganismos dañinos o sus productos como toxinas. Todos estos mecanismos se basan en la detección de características estructurales de los patógenos que los distinguen de las células hospedero. Dicha discriminación hospedero-patógeno es esencial para permitir que el hospedero elimine el patógeno sin daño excesivo a sus propios tejidos. A partir de la integración de funciones de los componentes del sistema inmunológico, la respuesta inmune puede ser rápida, específica y protectora, y por consiguiente mantener la homeostasis inmunológica en un individuo (3) (4).

El sistema inmunológico se divide para su estudio en dos "líneas de defensa": inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad innata y adaptativa no son mecanismos de defensa mutuamente excluyentes, sino que son complementarios,

por ende, la sinergia entre ellos es esencial para una respuesta inmunitaria completamente eficaz (5).

2.1.1. Inmunidad innata

La respuesta inmune innata es un mecanismo de defensa del huésped de primera línea que se encuentra en todas las especies, desde organismos multicelulares primitivos hasta vertebrados (6). Está conformada por distintas barreras y mecanismos de defensa: anatómica (piel y membranas mucosas), fisiológica (temperatura, pH bajo y mediadores químicos), endocítica y fagocítica e inflamatoria (5).

Por definición, el sistema inmune innato es inespecífico del antígeno, carece de memoria y ocurre inmediatamente o en un breve lapso (de minutos a horas) después de la exposición al antígeno (2). Dentro de los componentes celulares de la respuesta inmune innata, se encuentran células fagocíticas, células dendríticas, mastocitos, basófilos, eosinófilos, células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) y células linfoides innatas (ILCs, por sus siglas en inglés) (**Figura 1**) (5). El reconocimiento de patógenos por parte de las células es mediado por receptores superficiales codificados en la línea germinal (7), dichos receptores, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés), han cuestionado el concepto de que la inmunidad innata no es específica (8). Los PRR son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), como polisacáridos complejos, glucolípidos, lipoproteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos (9). Además de esto, reconocen moléculas endógenas asociadas con el daño celular y la inflamación, que generalmente se

conocen como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) (2) (10).

La inmunidad innata también está formada por una gran cantidad de elementos solubles, como las quimiocinas, citocinas, defensinas y el complemento. El sistema del complemento está compuesto por proteínas séricas que reaccionan contra microorganismos a través de una cascada molecular, lo que resulta en opsonización, aumento de la respuesta inflamatoria y formación de un poro macromolecular que penetra en la membrana, conocido como complejo de ataque a membrana (MAC, por sus siglas en inglés), que produce la lisis del microorganismo (9) (11).

El reconocimiento de patógenos induce respuestas que desencadenan la producción de una variedad de citocinas y quimiocinas, lo cual promueve la migración y activación de células inmunes. Entre estas células inmunes, las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) capturan y procesan péptidos derivados de microorganismos, dichos péptidos son presentados en la superficie celular mediante el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), posteriormente las DCs migran hacia el linfonodo regional y activan las células T afines, lo que resulta de la inducción de la inmunidad adaptativa (6).

2.1.2. Inmunidad adaptativa

La evolución de los vertebrados se condujo por importantes innovaciones morfológicas y funcionales, incluido el desarrollo de un sistema inmunológico adaptativo (12). La respuesta inmune adaptativa es el mecanismo de defensa de

segunda línea y se caracteriza por la especificidad del antígeno, la diversidad, la memoria y el reconocimiento de lo propio y de lo extraño. Está mediada por linfocitos T (inmunidad celular) y por linfocitos B (inmunidad humoral) (2).

Los linfocitos B y T son las principales células de la inmunidad adaptativa porque dictan la especificidad y además regulan la respuesta inmune adaptativa (4) **Figura 1.** Tanto los linfocitos B como los linfocitos T, se diferencian a partir de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Las células B salen de la médula como células maduras, expresando un receptor de unión a antígeno único en su membrana. En contraste, los linfocitos T se dirigen al timo para completar su desarrollo y maduración (5). Ambas células reconocen antígenos a través de sus receptores, en el caso de los linfocitos B se denomina BCR, mientras que los receptores de los linfocitos T se denominan TCR. Cada linfocito tiene un receptor único, y tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse si reciben las señales apropiadas (4). La función principal de las células B es la producción de anticuerpos contra antígenos y bajo ciertas circunstancias, las células B también pueden actuar como células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas en inglés). Cuando se activan por antígenos a los que tienen un receptor específico de antígeno apropiado, las células B proliferan y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos o células B de memoria. Las células B de memoria son "de larga duración" de infecciones pasadas y continúan expresando receptores de unión a antígeno. Dada su función en la producción de anticuerpos, las células B desempeñan un papel importante en la respuesta inmune humoral o mediada por anticuerpos (5). Por su parte, las células T requieren la acción de APCs para

activarse y reconocer un antígeno específico, generalmente son células dendríticas, pero también lo son los macrófagos y linfocitos B. Las superficies de las APCs expresan un grupo de proteínas conocido como complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). Los MHC se clasifican como clase I que se encuentran en todas las células nucleadas, o clase II que se encuentran solo en ciertas células del sistema inmune, incluidos los macrófagos, las células dendríticas y las células B. La proteína MHC une fragmentos de antígenos (péptidos) intracelulares o antígenos fagocitados (5).

Las células T se activan cuando encuentran una APC que presenta al TCR los péptidos específicos unidos a sus moléculas de MHC. Este proceso de presentación de antígenos estimula a las células T a diferenciarse principalmente en células T CD8⁺ citotóxicas o células T CD4⁺ efectoras o reguladoras. Las células T CD8⁺ se activan por la interacción de su TCR con el péptido unido a las moléculas de MHC de clase I. Participan en la eliminación de células infectadas por microorganismos, como virus, y en la destrucción de células tumorales que expresan antígenos tumorales. Las células CD4⁺ juegan un papel importante en el establecimiento y la maximización de la respuesta inmune. Estas células no tienen actividad citotóxica o fagocítica. Sin embargo, "median" la respuesta inmune al dirigir a otras células a realizar estas tareas y regular el tipo de respuesta inmune que se desarrolla. Las células CD4⁺ se activan mediante el reconocimiento por TCR del antígeno unido a las moléculas de MHC de clase II. Una vez activadas, las células Th liberan citocinas que influyen en la actividad de muchos tipos de células, incluidas las APCs que las

activan. Una APC puede inducir varios tipos de respuestas de células Th, como Th1, Th2, Th17 y Treg (5).

El establecimiento de un sistema inmune funcionalmente competente que puede responder a los patógenos y tolerar los auto-antígenos ocurre durante el desarrollo de linfocitos. En el caso de los linfocitos T, el timo cumple esta función especializada (13).

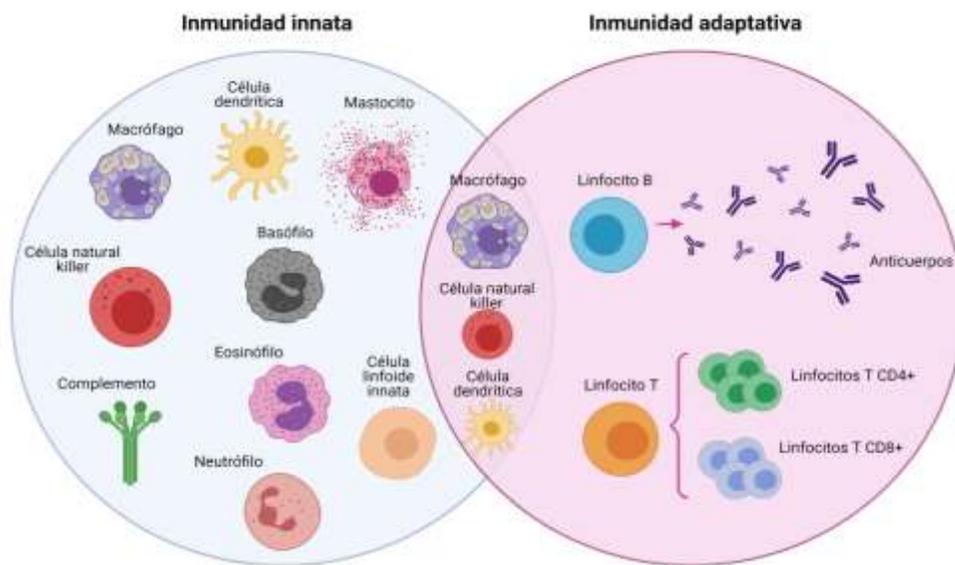


Figura 1. Componentes del sistema inmune innato y adaptativo. La respuesta inmune innata funciona como la primera línea de defensa contra la infección. Se compone de factores solubles, como proteínas del complemento y diversos componentes celulares, incluidos granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos), mastocitos, macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés). La respuesta inmune adaptativa es más tardía, pero se manifiesta con una mayor especificidad antigénica y de memoria. Se compone de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B y anticuerpos. Modificado de Medina, 2016 (4).

2.2. Linfocitos T

2.2.1. Desarrollo de los linfocitos T

El timo es el órgano en el que se lleva a cabo la diferenciación y selección de células. El estroma tímico promueve el desarrollo de linfocitos T al producir factores de crecimiento y ligandos para receptores expresados en timocitos (14). Este órgano consta de dos lóbulos piramidales conectados por un istmo de tejido conectivo fibroso. Una delgada cápsula de tejido conectivo rodea cada lóbulo y, en la mayoría de las especies da lugar a septos, que subdividen parcialmente el timo en lóbulos interconectados. No hay sub-lobulación en el ratón. En los mamíferos se encuentra en la región anterior del mediastino, ventral a la base del corazón y el arco aórtico (15) (16).

Histológicamente, el timo se divide en dos compartimentos principales, la corteza y la médula (13). La corteza es suministrada por extensas redes de capilares que están conectados a las vénulas y las arteriolas en la unión corticomedular (CMJ, por sus siglas en inglés (17)). Cada región está compuesta de células epiteliales especializadas; células epiteliales tímicas corticales (cTECs, por sus siglas en inglés) o células epiteliales tímicas medulares (mTECs, por sus siglas en inglés). Cada subconjunto de células epiteliales tiene funciones específicas para establecer un repertorio de células T competente (13).

Originalmente desarrollados en la médula ósea, los progenitores linfoides tempranos (ELP, por sus siglas en inglés) circulan en la sangre hasta que ingresan al timo a través de los vasos sanguíneos ubicados en el CMJ (**Figura 2**). Dentro del

timo, los timocitos transmigran entre microambientes anatómicamente distintos donde interactúan continuamente con las células estromales residentes. Estas interacciones son fundamentales para lograr la maduración, proliferación y selección de timocitos. Por lo tanto, la quimiotaxis es una de las características fundamentales de los timocitos (17).

Los ELP pierden el potencial para el desarrollo de células B y de células NK. El resultado es un precursor de células T doble negativo (DN; no CD4 o CD8). Los timocitos DN pueden subdividirse en cuatro etapas secuenciales de diferenciación (**Figura 2**), que se identifican por su expresión superficial de CD44 y CD25: DN1, CD44⁺CD25⁻; DN2, CD44⁺CD25⁺; DN3, CD44⁻CD25⁺; y DN4, CD44⁻CD25⁻(18). El desarrollo inicial de timocitos de DN1 a DN3 es promovido por moléculas producidas por cTEC, principalmente interleucina-7 (IL-7) y el ligando Notch (14). Los timocitos DN3 se someten a un reordenamiento de la cadena β del TCR con la proteína pre-T α invariante y moléculas de señalización CD3, lo que da como resultado la expresión de un complejo pre-TCR que induce el reordenamiento de la cadena α del TCR y permite la expresión del complejo $\alpha\beta$ TCR (selección β) (18) (19). La siguiente etapa es la de dobles positivos (DP; CD4⁺, CD8⁺) donde la especificidad y la fuerza de unión del $\alpha\beta$ TCR correctamente ensamblado para los ligandos del MHC determinan la supervivencia y diferenciación celular. Las células DP interactúan con antígenos propios en el contexto de MHC de clase I o clase II (**Figura 2**). Aquellas células que interactúan con afinidad débil resultan en apoptosis tardía (muerte por negligencia), mientras que las que interactúan con una alta afinidad resultan en apoptosis aguda. Los timocitos DP que interactúan con

avidez intermedia para los complejos del propio-péptido-MHC (presentados por cTEC, DC y fibroblastos) experimentan una selección positiva, y la expresión de un TCR auto-restringido por el MHC. Los timocitos DP se comprometen con el linaje CD4 simple positivo (SP; CD4⁺ CD8⁻) o CD8 simple positivo (SP; CD4⁻ CD8⁺) (20). El desarrollo de timocitos, y más específicamente su paso a través de la etapa de selección β inducida por el pre-TCR, está regulada por numerosos factores de transcripción (14). Durante la maduración, debido a las interacciones con sus microambientes estromales circundantes, los timocitos SP migran a la médula y se someten a una selección negativa, lo que elimina los timocitos SP con TCR de alta afinidad para antígenos propios, reduciendo así la posibilidad de generar células autorreactivas. Durante este estadio comienza el desarrollo regulatorio de las células T FoxP3⁺ (19). Los linfocitos T reguladores (Treg) expresan el factor de transcripción específico del linaje FoxP3 (Forkhead box P3) y altos niveles de la cadena α del receptor de interleucina 2 (IL-2) (CD25). Estas células desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica (21). Las células simples positivas maduras dependen en gran medida de la expresión del receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P1, por sus siglas en inglés), por lo que aquellos timocitos que sean S1P1⁺ SP saldrán del timo hacia la circulación a través del espacio perivascular, que se canaliza a las vénulas postcapilares, arteriolas y vasos linfáticos, donde hay un mayor gradiente de S1P1 (14) (20).

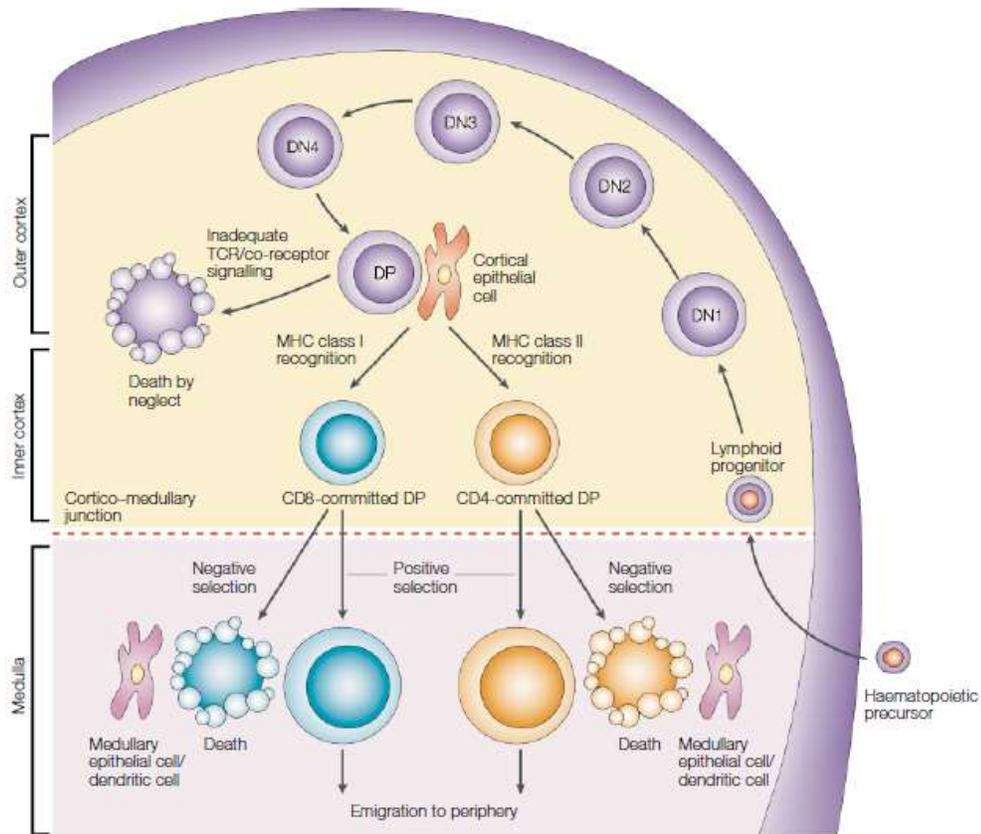


Figura 2. Esquema general del desarrollo de linfocitos T en el timo. Los progenitores linfoides surgen en la médula ósea y migran al timo. Éstas carecen de la expresión del TCR y se denominan timocitos doblemente negativos (DN; no CD4 o CD8). A medida que las células progresan a través de las etapas DN2 a DN4, expresan un pre-TCR, que se compone de la cadena pre-T α no reordenada y una cadena β TCR reordenada. La expresión exitosa de pre-TCR conduce a una proliferación celular sustancial durante la transición de DN4 a doble positivo (DP). Los timocitos $\alpha\beta$ TCR CD4⁺ CD8⁺ (DP) interactúan con las células epiteliales corticales que expresan una alta densidad de moléculas de MHC de clase I y clase II asociadas con propio-péptidos. El destino de los timocitos DP depende de la señalización mediada por la interacción del TCR con estos ligandos propio-péptidos-MHC, por lo que el nivel intermedio apropiado de señalización del TCR inicia la maduración efectiva (selección positiva). Los timocitos que expresan un TCR que se unen a los complejos propio-peptídicos-MHC-clase-I se diferencian a células T CD8⁺, mientras que los que expresan TCR que se unen a ligandos propio-peptídicos-MHC-clase-II se diferencian a células T CD4⁺. Estas células están entonces listas para migrar desde la médula a los sitios linfoides periféricos. DP, dobles positivos; DN, dobles negativos; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; TCR, receptor de linfocito T. Tomado de Germain, 2002 (18).

2.2.2. Activación de los linfocitos T

Los linfocitos T *naïve* CD4⁺, CD8⁺ y linfocitos T reguladores originados en el timo (tTregs), circulan por todo el sistema linfoide en la espera de reconocer un antígeno en la superficie de las APC. El reconocimiento del antígeno por los linfocitos T desencadena en éstos los procesos de activación, proliferación y diferenciación en células efectoras, reguladoras o de memoria (22).

La activación y funcionalidad de los linfocitos T requiere de una participación estructurada de las APC, las DCs son las células más importantes (23). Las DCs se han denominado células presentadoras de antígenos profesionales debido a su potente capacidad para cebar células T *naïve* (24). Estas células reconocen antígenos a través de moléculas de MHC de clase I y clase II para presentar péptidos en la superficie celular de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente (25). Este proceso se lleva a cabo principalmente en los órganos linfoides secundarios (SLO, por sus siglas en inglés) que incluyen el bazo, los linfonodos y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés) (26). El reconocimiento de antígenos y la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de las DC como CD80 y CD86, y su unión al receptor CD28, conducen a una sinapsis inmunológica (IS, por sus siglas en inglés) necesaria para la activación de los linfocitos T (27).

El TCR es uno de los receptores más complejos del sistema inmunológico. Está compuesto por las cadenas α y β asociadas no covalentemente con tres dímeros de la subunidad de la proteína de señalización invariante CD3 (CD3 ϵ -CD3 γ , CD3 ϵ -CD3 δ y CD3 ζ -CD3 ζ), encargada de dar las señales necesarias para la activación

de células T (27) (28). Las cadenas CD3 (γ , δ , ϵ) contienen cada una un motivo ITAM (por sus siglas en inglés "Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif"), mientras que la cadena CD3 ζ contiene tres motivos ITAM en tándem, por lo que cada TCR contiene un total de 10 ITAMs (28). La señalización intracelular inicia con la fosforilación de los sitios ITAM en los dominios citoplásmicos de CD3 mediante las cinasas LCK de la familia Src (asociadas principalmente con los correceptores CD4 y CD8), lo que conduce al reclutamiento de la cinasa ZAP70 (**Figura 3**) (27). La activación de ZAP70 facilita la fosforilación de proteínas de andamiaje como LAT3, que proporciona una multitud de sitios de acoplamiento para el reclutamiento de otras moléculas adaptadoras como la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB2, por sus siglas en inglés), la proteína adaptadora promotora de la adhesión y desgranulación (ADAP, por sus siglas en inglés) y la fosfolipasa Cy1 (PLCy1, por sus siglas en inglés). La activación de estas moléculas induce la reorganización citoesquelética y desencadenan un aumento en el calcio intracelular, así como la activación de varios efectores de señalización descendentes, incluidas las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP, por sus siglas en inglés), la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) y la calcineurina. El resultado de estos eventos de señalización es la activación y translocación nuclear de varios factores de transcripción clave, incluida la proteína activadora 1 (AP-1, por sus siglas en inglés), el factor nuclear- κ B (NF- κ B, por sus siglas en inglés) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT, por sus siglas en inglés), que, junto con el receptor co-estimulador y las señales de los receptores de citocinas, desencadenan múltiples respuestas de los linfocitos T, incluyendo proliferación, migración y producción de citocinas (29).

Los factores de transcripción activados regulan la transcripción de genes responsables de la activación del linfocito T. Dentro de éstos, NFAT es el más destacado ya que puede formar complejos con otros factores de transcripción, por ejemplo, la acción de la calcineurina sobre NFAT produce que ésta interactúe con AP-1 y promueva la expresión de genes como IL-2, y a la inversa, NFAT induce la anergia de los linfocitos T si no interactúa con AP-1 (30). La interleucina-2 (IL-2) es una citocina que desempeña un papel fundamental ya que promueve la actividad citolítica de los linfocitos T CD8⁺ y de las células NK, así como la diferenciación de las células T CD4⁺ *naïve* en T helper 1 (Th1) y T helper 2 (Th2) mientras que en cantidades altas inhibe la diferenciación de las células T helper 17 (Th17). Además, es esencial para el desarrollo y mantenimiento de las Tregs y para la muerte celular inducida por activación, por lo que media la tolerancia y limita las reacciones inmunes inapropiadas (31).

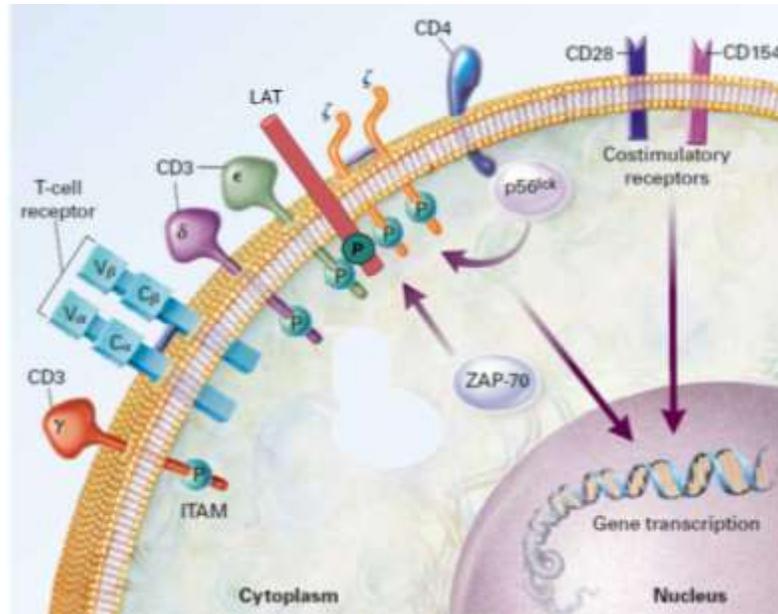


Figura 3. Señalización mediante el TCR. La activación de las células T se desencadena del entrecruzamiento (*cross-linking*) y el cambio conformacional del TCR. Los sitios ITAM de las cadenas CD3 son fosforilados por LCK, lo que permite el acoplamiento y la activación de la ZAP70, y ésta a su vez fosforila la proteína de andamiaje LAT. La activación de moléculas efectoras asociadas a LAT permite la propagación de la señal río abajo a través de diferentes vías de señalización, dando como resultado la activación de factores de transcripción implicados en la proliferación y diferenciación celular. TCR, receptor de linfocito T; ITAM, motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina; LCK, proteína tirosina cinasa específica de leucocitos; ZAP70, cadena Z asociada a proteína; LAT, enlazador para la activación de las células T. Modificado de Delves, 2000 (32).

2.2.3. Diferenciación de linfocitos T cooperadores

Después de la activación de linfocitos T CD4⁺ *naïve* por las APC, la señalización a través del TCR en presencia de citocinas específicas promueve la diferenciación de estas células en distintos subtipos de linfocitos T cooperadores (33). La capacidad de los linfocitos T CD4⁺ *naïve* para someterse a la polarización del linaje en distintos subtipos efectoros está mediada por citocinas, factores de transcripción maestros y modificaciones epigenéticas (34).

Las citocinas son moduladores clave de la maduración, activación y proliferación de los linfocitos T (35). Dirigen la diferenciación de células T CD4⁺ para poder diferenciarse en varios subtipos como: Th1, Th2, Th9, Th17, Thf y subtipos T reguladores como Tregs FoxP3⁺ y reguladoras tipo 1 (Tr1) (33). **Figura 4.** Además de la selección del linaje, las citocinas tienen un papel crítico en la homeostasis y función de los linfocitos T (35).

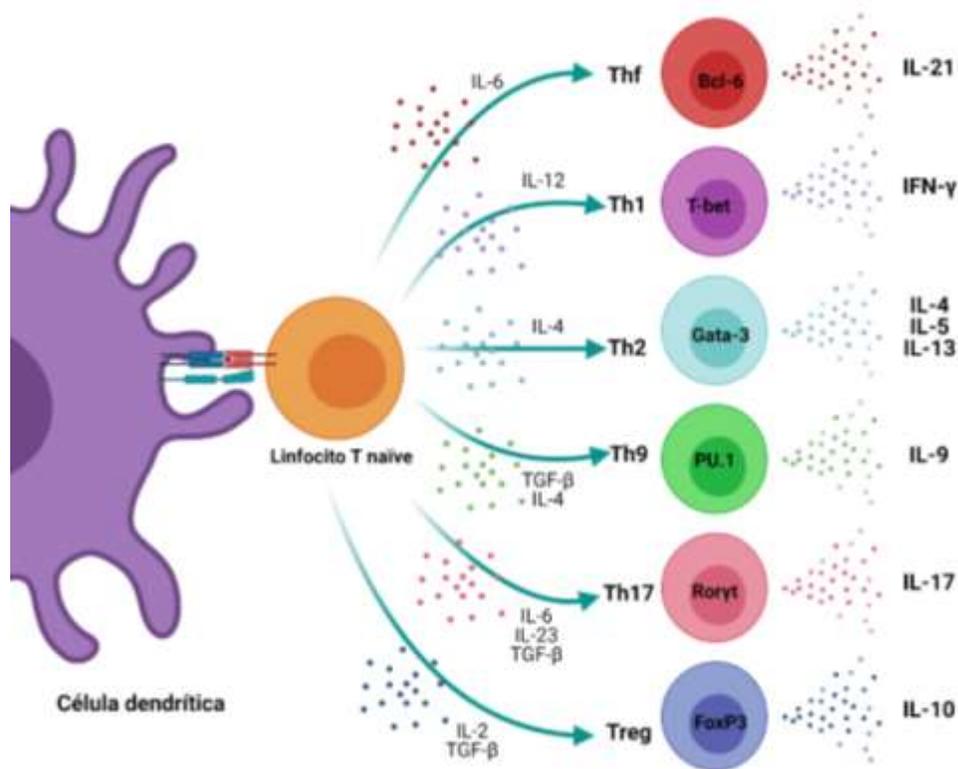


Figura 4. Diferenciación de linfocitos T CD4⁺. Una vez que los linfocitos T CD4⁺ han madurado, se diferencian en la periferia de acuerdo con el microambiente presente que dependerá de la expresión de los factores de transcripción y la producción selectiva de citocinas. Th, célula cooperadora; Thf, célula folicular; Bcl-6, proteína 6 del linfoma de células B; T-bet, proteína T-box expresada en células T; IFN- γ , interferón gamma; Gata-3, proteína de unión a gata 3; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; ROR γ t, receptor huérfano gamma relacionado con ácido retinoico; Treg, célula T reguladora; FoxP3, caja de horquilla P3. Modificado de O'Shea, 2010 (36).

Los linfocitos Th1 tienen como regulador maestro al factor de transcripción T-bet, se caracterizan por secretar IFN- γ de forma dominante y su diferenciación depende

de la estimulación con IL-12. Los linfocitos Th2 tienen como factor de transcripción regulador maestro a GATA-3, secretan IL-4, IL-5 e IL-13 y su diferenciación es inducida por la estimulación con IL-4. Los linfocitos Th9 se caracterizan por secretar IL-9, su regulador maestro es PU.1 y su diferenciación se induce por la estimulación con IL-4 y TGF- β . Los linfocitos Th17 tienen por regulador maestro a ROR γ t, secreta IL-17 y necesita IL-6, IL-23 y TGF- β para poder diferenciarse. Por otro lado, los linfocitos T reguladores se caracterizan por tener de regulador maestro a FoxP3 y secretar TGF- β , IL-10, mientras que las Tr1 solo secretan IL-10 (33) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características principales de los subtipos de linfocitos T CD4⁺.

Subtipo de linfocito T	Citocinas que inducen la diferenciación	Factor de transcripción maestro	Citocinas características de secreción	Función efectora
Th1	IL-12	T-bet	IFN- γ	Defensa contra patógenos intracelulares (33).
Th2	IL-4	GATA-3	IL-4	Participa en la respuesta a reacciones alérgicas y en la defensa contra helmintos (33).
Th17	IL-16, IL-23, TGF- β	Ror- γ t	IL-17	Protección frente a bacterias extracelulares y hongos (33).
Th9	IL-4, TGF- β	----- -	IL-9	Defensa contra helmintos (34).
iTreg	IL-2, TGF- β	FoxP3	TGF- β , IL-10	Mantenimiento de la auto-tolerancia y el control de respuestas inmunes excesivas (33).
Tr1	IL-10	----- -	IL-10	

Los factores de transcripción dictan el “destino” (“fate”) de los linfocitos ya sea induciendo la expresión de genes y coactivadores específicos de linaje o reprimiendo la expresión de genes que están asociados con linajes alternativos (34).

Además de los factores de transcripción maestros, las proteínas del transductor de señalización y activador de la transcripción (STATs, por sus siglas en inglés) son indispensables para la determinación del “destino” de los linfocitos T cooperadores y la producción de citocinas. Las actividades de los factores de transcripción maestros están determinadas principalmente por sus niveles de expresión, mientras que las de los STATs están reguladas por la modificación postraducciona mediada por citocinas (37).

La principal vía de señalización desencadenada por las citocinas es la activación de la familia de proteínas STAT (38). Se han identificado siete STATs (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6) (39). Éstas desempeñan funciones críticas en el crecimiento y la diferenciación de muchos tipos de células, pero son particularmente importantes en la diferenciación de los linfocitos T efectores (40). Por ejemplo, STAT4 se activa río abajo de IL-12 y es fundamental para la diferenciación de linfocitos Th1, mientras que STAT6 se induce río abajo de IL-4 para la diferenciación de linfocitos Th2. Se ha demostrado que la diferenciación de linfocitos Th1 también depende de la señalización de IFN- γ a través de STAT1, posiblemente por regulación autocrina, similar a la IL-4 en linfocitos Th2. La diferenciación de linfocitos Th17 y Thf depende de la señalización de STAT3 a través de IL-6/IL-23 e IL-21, respectivamente (34) **(Figura 5).**

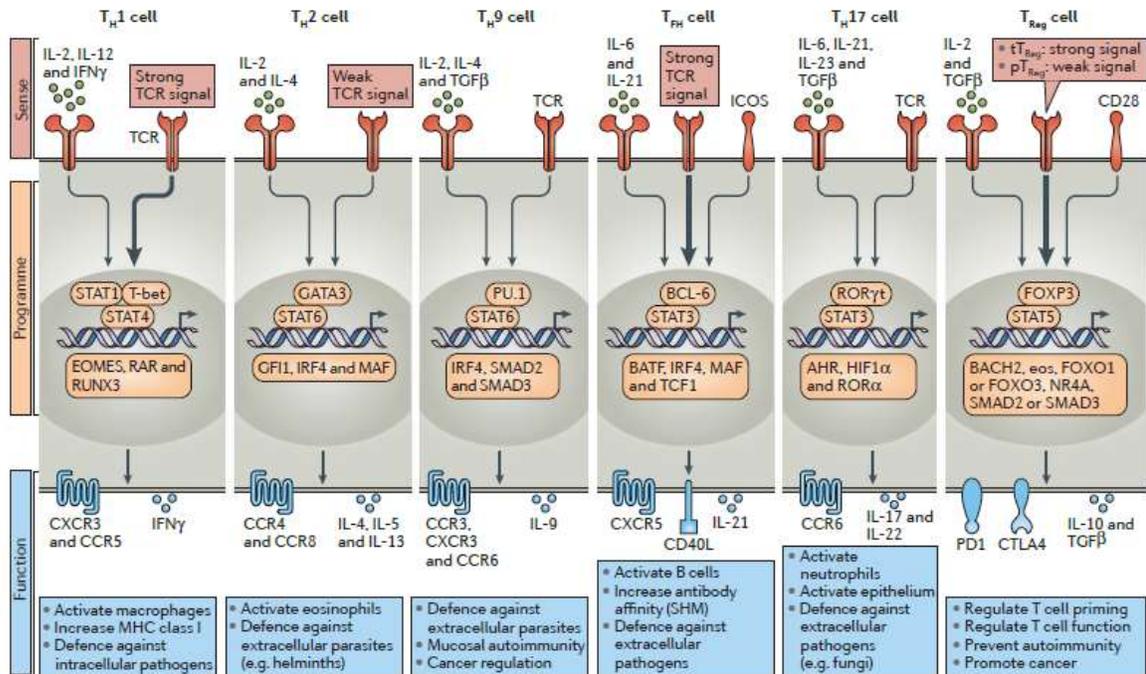


Figura 5. Polarización de los linfocitos T CD4⁺. Cada subconjunto de linfocitos T CD4⁺ se puede definir por los factores de transcripción y las citocinas que expresan, éstos serán característicos de cada subconjunto y tendrán formas específicas de defensa inmunitaria. Th, célula T cooperadora; TCR, receptor de células T; IFN γ , interferón gamma; T-bet, proteína T-box expresada en células T; GATA-3, proteína de unión a gata 3; ROR γ T, receptor huérfano gamma relacionado con ácido retinoico; BATF, factor de transcripción activador de células B; FoxP3, caja de horquilla P3; Bcl-6, proteína 6 del linfoma de células B; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; STAT, transductor de señal y activador de transcripción; IRF4, factor regulador de interferón 4; CTLA4, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos. Tomado de Adamson, *et al* 2009 (40).

La diferenciación de linfocitos T CD4⁺ *naïve* en linajes con funciones efectoras distintas se había considerado un evento irreversible. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de cierta capacidad de estas células para adquirir un nuevo fenotipo estando previamente polarizadas hacia otro subtipo, a este fenómeno se le ha llamado plasticidad (41)

De acuerdo con DuPage *et al.*, la plasticidad se puede definir como la flexibilidad de un linfocito T CD4⁺ para adquirir características de otros subtipos de linfocitos T

simultáneamente o durante algún punto de su ciclo celular, esto puede ocurrir por transiciones inducidas o reprogramación entre subtipos (40) (**Figura 6**).

Existe evidencia que indica que la flexibilidad en la expresión de factores de transcripción maestros y citocinas es relativamente común (36). Los subtipos Th1 y Th2 están regulados por factores de transcripción y citocinas que se suprimen y refuerzan mutuamente (T-bet e IFN- γ para Th1 y GATA -3 e IL-4 para Th2) y su regulación cruzada durante la diferenciación se ha demostrado en numerosos estudios (41) (42). Los linfocitos Th2 pueden re-expresar IL-12R β 2 y producir IFN- γ junto con IL-4 en respuesta a infecciones virales (43). Los linfocitos Th17 pueden experimentar una transición dependiente de IL-12 hacia linfocitos Th1 en ratones y seres humanos. El receptor de IL-12, por tanto, es importante en las transiciones descritas y la respuesta proinflamatoria (42). También se ha demostrado que los linfocitos Th2 se diferencian a Th9 en respuesta a TGF- β (40). El subtipo Th17, además de la conversión al fenotipo Th1, también puede adquirir el fenotipo Th2 que expresa IL-4, como se demuestra en un modelo de infección helmíntica (44). Se ha demostrado en ratones la posibilidad de transición de Treg a un fenotipo similar a Th1 que co-expresa FoxP3 y T-bet (42). La inducción de T-bet en células Treg se ha observado en modelos de infección y colitis (45). Estudios detallados demostraron la presencia de Tregs capaces de inducir la expresión de T-bet e IFN- γ dando como resultado un fenotipo similar a Th1. Tal plasticidad de Treg-Th1 depende *in vitro* de IL-12 e IL-2 y podría desempeñar un papel en las enfermedades autoinmunes (46).

Se ha demostrado que el microambiente tisular es importante, por ejemplo, los linfocitos Tfh de las placas de Peyer (PP, por sus siglas en inglés) se pueden desarrollar a partir de linfocitos Th17 y éstos además pueden transdiferenciarse en Tregs para resolver procesos inflamatorios. Por lo tanto, la plasticidad de los linfocitos T CD4⁺ puede desempeñar un papel fundamental en la homeostasis (34).

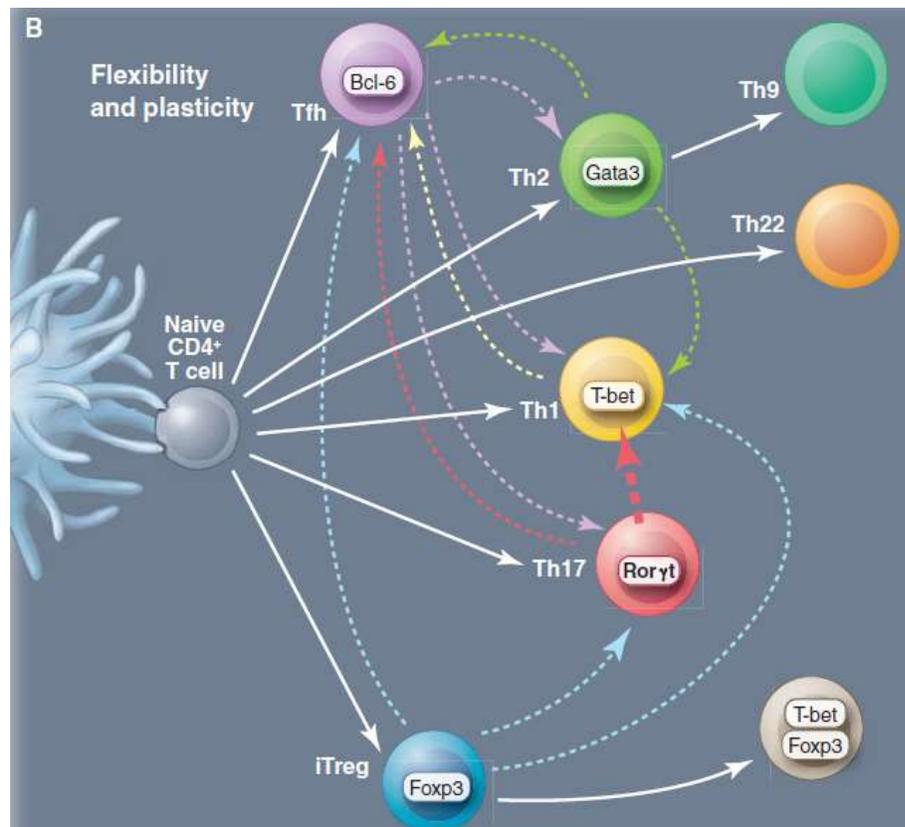


Figura 6. Flexibilidad y plasticidad de linfocitos T CD4⁺. Los linfocitos T CD4⁺ pueden cambiar su perfil de producción de citocinas de acuerdo con la expresión transitoria de más de un regulador maestro o cuando los linfocitos expresan más de un regulador maestro. Tomado de O'Shea, 2010 (36).

2.3. Modelos murinos para evaluar la diferenciación de linfocitos T

El ratón se ha convertido en el modelo de referencia en el laboratorio para estudiar el sistema inmunológico de los mamíferos (47). Se ha utilizado para evaluar la respuesta inmune humoral y celular, el inicio y la duración de la inmunidad, la inmunidad sistémica *versus* la inmunidad mucosal y la protección contra la infección por desafío, entre otras, además ha permitido el desarrollo de terapias y vacunas (48) (49).

Los ratones tienen la ventaja de estar disponibles a bajo costo, son fáciles de manejar, tienen antecedentes genéticos definidos y sus funciones inmunológicas están bien caracterizadas. Además, existe una gran cantidad de reactivos inmunológicos para ratones que permiten un análisis muy detallado de la respuesta inmune (49) (50).

El trabajo con ratones principalmente se basa en el uso de cepas específicas o transgénicas (49). Los animales transgénicos se crean insertando deliberadamente un gen exógeno (ajeno) en el genoma de un animal, en este caso, en un ratón (51). La introducción de ADN exógeno en la línea germinal del ratón se considera un avance técnico importante en los campos de la biología y la genética del desarrollo, por lo que ha proporcionado nuevos enfoques genéticos para modelar muchas enfermedades humanas en un contexto del animal completo (52). Existen ratones transgénicos para estudiar obesidad, enfermedades cardíacas, diabetes, artritis, abuso de sustancias, ansiedad, envejecimiento, y enfermedades como Alzheimer y Parkinson (53). También se usan exhaustivamente en el estudio de la inmunología,

por lo que han ayudado a comprender el papel de genes específicos del huésped en el reconocimiento de patógenos, así como la inducción de la inmunidad innata o adquirida (54).

Las ventajas de los ratones transgénicos en el área de la inmunología incluyen evaluar rápidamente la respuesta inmune a un determinado antígeno, determinar la respuesta inmune en pruebas de detección a gran escala de adyuvantes, realizar formulaciones de vacunas y la evaluación de la mejor ruta de inmunización (49).

2.3.1. Modelos de inmunización para evaluar respuesta antígeno específica *in vivo*

Durante los últimos años, los modelos animales han desempeñado un papel crucial en la investigación (54). A pesar de promover el reemplazo y la reducción de los experimentos con animales para la investigación tanto como sea posible, actualmente, no hay otro método disponible para probar la inducción de respuestas inmunes a la vacunación, por lo que el uso de ratones sigue siendo crítico en el desarrollo de vacunas (49).

Identificar los mecanismos de protección inmunológica, determinar la vía y formulación óptimas de vacunas, establecer la duración y el inicio de la inmunidad, así como la seguridad y eficacia de las nuevas vacunas, deben realizarse en un sistema vivo (55), es por ello por lo que existen muchos modelos de ratón disponibles para evaluar varios aspectos de la respuesta inmune (49) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Ejemplos de algunos modelos murinos transgénicos que se usan para diversas vacunas, así como sus características.

Cepa de ratón	Vacuna para la que se usa	Características
b12HL	VIH	Esta cepa expresa el anticuerpo b12 que provoca una respuesta inmune neutralizante para el virus (56).
NZBWF1	Hepatitis-B	Los ratones de este cruce híbrido desarrollan una enfermedad autoinmune que se asemeja al lupus eritematoso sistémico humano (57).
TgPVR1	Poliomavirus humano	Estos ratones expresan los niveles más altos del transgén que codifica el PVR humano y por lo tanto mayor sensibilidad al poliomavirus (58).
A/J	Antrax (<i>B. anthracis</i>)	Los ratones son deficientes en el componente del complemento C5, lo que los vuelve altamente susceptibles a la cepa vacunal con esporas vivas atenuadas (59)
K18-hACE2	SARS-CoV-2	Estos ratones expresan ACE2 humano, el receptor utilizado por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) para entrar en la célula (60).

Las vacunas son una parte esencial de la mayoría de los programas de salud pública en todo el mundo y son necesarias para el control de muchas enfermedades emergentes o reemergentes (55), por lo que los modelos animales son herramientas indispensables para evaluar las vacunas candidatas, y los datos preclínicos de seguridad, inmunogenicidad y eficacia de los animales son un requisito previo para las agencias reguladoras como la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) antes de emprender ensayos clínicos en etapa temprana (61).

2.3.2. Modelos transgénicos para evaluar la respuesta péptido-específica

La unión de péptidos antigénicos al MHC es un paso fundamental en la respuesta inmune adaptativa (62). Después de la unión péptido-MHC, ocurre la presentación de una APC hacia un linfocito a través del TCR, por lo que se inicia el reconocimiento de péptidos ajenos y la subsiguiente respuesta inmune. La identificación precisa de qué péptidos pueden unirse a moléculas específicas de MHC es de gran importancia para comprender el mecanismo de la respuesta inmune, así como para mejorar el descubrimiento de epítomos inmunogénicos (63).

Los péptidos han generado un interés considerable gracias a su accesibilidad general y facilidad de manipulación (64), es por ello por lo que actualmente se utilizan para evaluar la respuesta inmune resultado de la unión péptido-específica en diferentes modelos murinos transgénicos.

Los modelos de ratón transgénico (Tg, por sus siglas en inglés) del TCR se han utilizado para estudiar el desarrollo de las células T, la tolerancia inmunológica y diversos trastornos autoinmunitarios (65). Por tanto, los modelos de ratón tg se han convertido en herramientas valiosas porque proporcionan antígenos afines y específicos, por ejemplo, linfocitos T bien caracterizados con un TCR que reconoce estos antígenos. El uso de linfocitos T TCR tg puede superar el desafío de utilizar linfocitos T específicos de péptidos de baja frecuencia en animales normales y así realizar la evaluación de sus respuestas a antígenos *in vitro* e *in vivo* (66).

2.3.2.1. Modelo murino OT-I

Los ratones transgénicos OT-I contienen insertos para los genes Tcra-V2 y Tcrb-V5 del TCR. El TCR transgénico de este ratón está diseñado para reconocer el péptido de ovoalbúmina 257-264 (pOVA 257-264) en el contexto de CD8⁺ con el MHC de clase I, dando como resultado linfocitos T CD8⁺ (células OT-I) restringidas por MHC de clase I específicas de OVA (67) (68).

Este modelo animal transgénico se ha utilizado para estudiar enfermedades autoinmunes (69), diabetes (70) y la respuesta inmune contra ciertos virus (68).

2.3.2.2. Modelo murino OT-II

Los ratones OT-II tienen un TCR transgénico específico para el péptido de la ovoalbúmina de pollo (pOVA 323-339) en el contexto de CD4⁺ con el MHC de clase II, dando como resultado linfocitos T CD4⁺ (células OT-II) restringidas por MHC de clase II específicas de OVA (65).

Este modelo ha sido utilizado para diferenciación de linfocitos T CD4⁺ *in vitro*, demostrando que la capacidad de los linfocitos T para comprometerse a cierto linaje está restringido por el antígeno peptídico, en este caso pOVA, presente en el microambiente, por lo que altas dosis de antígeno promueven la diferenciación hacia Th1 y Th17, mientras que no hubo condiciones de polarización para Th2 (71). En ensayos *in vivo*, se han utilizado células T CD4⁺ naïve de ratones transgénicos OT-II para analizar su activación, diferenciación y proliferación (72).

Se ha demostrado que el uso de adyuvantes aumenta la respuesta inmune, por lo que se ha administrado el antígeno OVA junto con un adyuvante, como toxina del cólera (CT, por sus siglas en inglés), encontrando que el conjugado CT-OVA es altamente efectivo para estimular y potenciar la proliferación de células OT-II y por consiguiente la activación de STATs y citocinas que promueven la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17 (65) (73).

2.3.2.3. Modelo murino 2D2 MOG

La Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE, por sus siglas en inglés) es un modelo animal útil para el estudio de Esclerosis Múltiple (MS, por sus siglas en inglés). Este modelo se caracteriza por utilizar el péptido 35-55 de la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG, por sus siglas en inglés) (74) (75), que se ha descrito como un antígeno diana para la respuesta de desmielinización autoinmune inducida (76). Se ha utilizado la cepa C57BL/6J, ya que es susceptible a la inducción de EAE por inmunización con pMOG 35-55 (77). Sin embargo, existe un modelo murino llamado 2D2, que tiene el TCR transgénico para los genes V α 3.2 y V β 11 y que es específico para el pMOG 35-55 sobre el fondo C57BL/ 6J (78).

Para provocar la EAE de manera activa se necesita un adyuvante, el más utilizado es el adyuvante completo de Freud (CFA, por sus siglas en inglés), el cual produce una lenta liberación del antígeno, además de utilizar alguna bacteria, normalmente *Bordetella pertussis*, la cual provoca una expansión clonal de linfocitos T autorreactivos, potenciando de esta manera las manifestaciones típicas de EM al favorecer la respuesta inmune humoral (79).

2.3.3. Modelos de direccionamiento a células dendríticas

Las DC son las APCs más importantes del sistema inmunológico, capaces de inducir respuestas de linfocitos T y B específicos de antígeno debido a que tienen una amplia gama de receptores que facilitan la captación de patógenos, incluidos los denominados “receptores de lectina tipo C”, como DEC-205 o CD205 y Langerin o DEC-207 (80) (81). Es por ello por lo que se han realizado modelos que se basan en la administración *in situ* de antígeno a través de anticuerpos específicos para los receptores endocíticos expresados en la superficie de las DC (82).

2.3.3.1. Receptor DEC-205

DEC-205 es una proteína de membrana integral de tipo I homóloga a la familia de lectinas de tipo C, está expresada principalmente en DCs y células epiteliales tímicas. Dentro de sus funciones está mediar una serie de funciones biológicas, como la unión e internalización de ligandos para el procesamiento y presentación de antígenos por parte de las DC. Debido a las propiedades endocíticas de DEC205, es un receptor importante para la administración de antígenos para vacunas e inmunoterapias dirigidas (83).

DEC-205 se ha utilizado incorporando OVA a un anticuerpo monoclonal para el receptor DEC-205 para así evaluar el potencial de los antígenos dirigidos a las DC (84) (**Figura 7**). En ensayos *in vivo* con ratones OT-II la administración intradérmica de 1 µg OVA acoplada con anti-DEC-205 y en combinación con 10 µg de CT como adyuvante, tiene el potencial de activar la respuesta de linfocitos T CD4⁺, incluida la activación de Th1 y Th17. También se ha observado que promueve la expansión, diferenciación e infiltración de los linfocitos T CD4⁺ a los tejidos periféricos no linfoides, como piel, pulmones e intestino (85).

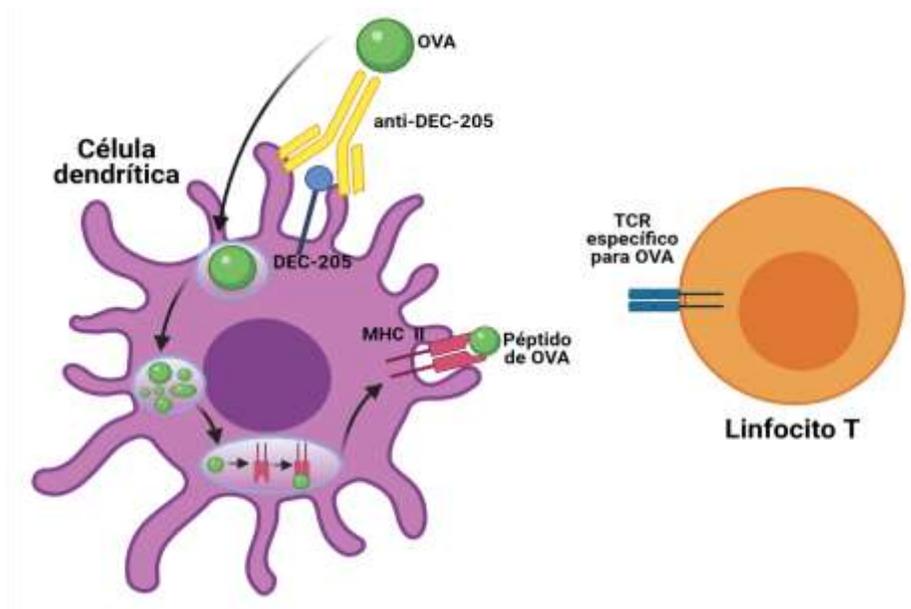


Figura 7. Principio del antígeno dirigido. El anticuerpo monoclonal anti-DEC-205 acoplado con OVA se une con el receptor DEC-205 en la superficie celular de la DC, posteriormente la OVA se procesará y se presentará mediante un MHC clase II al TCR específico de OVA de un linfocito T. MHC, complejo principal de histocompatibilidad; OVA, ovoalbúmina; TCR, receptor de linfocito T.

2.3.3.2. Receptor DEC-207

DEC 207 o Langerina es un receptor de superficie celular transmembranal de tipo II de la familia de las lectinas de tipo C, está altamente expresado en células de Langerhans y DC (83). Este receptor se internaliza para el procesamiento y la presentación de antígenos y, por lo tanto, puede usarse para administrar específicamente antígenos conjugados con glucanos o con el anticuerpo anti-DEC-207. Se ha observado que su internalización conlleva a la mejora de la respuesta de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de antígeno (86).

Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal anti-DEC-205 es captado por las DC positivas a Langerina, lo que sugiere que existe una interferencia entre los receptores DEC-205 y Langerina (83). Debido a lo anterior, se ha estudiado la función de DEC-207 *in vivo* administrando OVA acoplada a un anticuerpo monoclonal anti-DEC-207 que se une al receptor e inicia la absorción, el procesamiento y la presentación del antígeno a través del MHC. Para rastrear la expresión y unión del anticuerpo anti-DEC-207 se utiliza una secuencia enlazadora entre el extremo C de la cadena H del anticuerpo y la OVA, denominada OLLAS, que se reconoce por un anticuerpo monoclonal anti-OLLAS. Dependiente del estado de maduración de las DCs diana, el direccionamiento mediado por el receptor mejora o inhibe la respuesta inmune de los linfocitos T. Por lo tanto, el receptor DEC-207 funciona como mediador en la presentación de antígenos *in vivo* dirigiendo selectivamente el anticuerpo al dominio extracelular de Langerina y presentando efectivamente el antígeno a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ durante varios días (87).

2.4. Aplicación de un modelo murino con antígeno dirigido en ensayos preclínicos.

El sistema antígeno dirigido ha sido ampliamente utilizado en la realización de ensayos preclínicos para vacunas veterinarias (88). La vacunación ha sido la invención de mayor éxito en la historia de la medicina, ya que ayudó a controlar la morbilidad y la mortalidad relacionadas con enfermedades infecciosas. (89) (90). Dentro de los animales utilizados para la realización de ensayos preclínicos están los ratones de laboratorio, ya que son a menudo el primer organismo modelo para la evaluación de nuevas modalidades de vacunas. Estos animales tienen una serie de ventajas que incluyen el costo, la gran cantidad de herramientas disponibles para la evaluación, la consanguinidad genética y entornos de alojamiento libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés) para aumentar la reproducibilidad. Los modelos de vacunas preclínicas dependen de muchas variables, como la patogénesis específica de la especie, la disponibilidad de reactivos para evaluar las respuestas inmunitarias y el establecimiento de mecanismos de protección. La realización de vacunas en organismos vivos sigue siendo una ciencia empírica y no existe un organismo modelo universal perfecto. Los candidatos a vacunas a menudo se prueban primero en ratones y luego se examinan a través de especies que incurren en mayores costos de material y logística que restringen el tamaño de los grupos y el número de condiciones experimentales. Por lo tanto, los modelos animales son esenciales en el desarrollo de vacunas para evaluar la seguridad e inmunogenicidad, así como comprender los mecanismos de protección (91).

3. ANTECEDENTES

Los linfocitos T CD4⁺ cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) desempeñan un papel crucial en la respuesta inmune adaptativa (92). Es por ello que se han empleado modelos para su activación mediante la administración de un antígeno acoplado a un anticuerpo y dirigido a receptores específicos de DC en combinación con adyuvantes.

Se ha utilizado la proteína OVA acoplada químicamente al anticuerpo monoclonal anti-DEC-205, que es abundante en DC de tejidos linfoides, para demostrar que la presentación antígeno dirigida a los receptores DEC-205 es al menos 400 veces más eficiente que la OVA no conjugada. Al inmunizar con anti-DEC-205-OVA por vía subcutánea, se ha identificado que la proteína OVA persiste durante un período de 4-48 h en las DC principalmente en los linfonodos que drenan el lugar de la inyección. Además, se ha demostrado que DEC-205 se asocia con un procesamiento y presentación de antígenos mucho más eficiente a través de la vía del MHC de clase II (93).

El sistema de antígeno específico dirigido, anti-DEC-205-OVA, ha sido utilizado en conjunto con la toxina del cólera (CT), una exotoxina producida por *Vibrio cholerae* y que es responsable de la diarrea del cólera, sin embargo, tiene fuertes propiedades inmunomoduladoras tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que se utiliza como un potente adyuvante de vacunas en mucosas de animales de experimentación (94) (95). Se ha demostrado que la administración intradérmica de antígenos solubles en combinación con CTB promueve la activación de linfocitos T CD4⁺ y la diferenciación de las células Th1 y Th17 (96). Por lo tanto, la inmunización

dirigida a DCs sirve como estrategia para promover respuestas protectoras de linfocitos T CD4⁺.

Se está investigando el papel de las inhibinas y su par molecular, el betaglicano, en la activación y diferenciación de linfocitos T CD4⁺, utilizando ratones transgénicos como modelo de estudio.

En un trabajo previo en el laboratorio realizado por la Dra. Marisol de la Fuente (97), se llevó a cabo la diferenciación *in vivo* de linfocitos T hacia el fenotipo regulador FoxP3⁺ utilizando ratones deficientes en la subunidad α de inhibina (inhibina $\alpha^{-/-}$), modelo diseñado y descrito por Matzuk en 1992. Estos ratones desarrollan tumores de estroma ovárico y testicular debido a su deficiencia en la subunidad alfa de inhibina (94), y si se gonadectomizan antes de la tumorigénesis gonadal desarrollan tumores suprarrenales (99).

Para la inducción de linfocitos T reguladores *in vivo*, se obtuvieron mediante FACS linfocitos T *naïve* CD4⁺ CD25⁻ a partir de bazo y linfonodos periféricos de ratones OT-II x CD45.1, posteriormente se transfirieron 3×10^6 de linfocitos *naïve* por vía intravenosa a ratones CD45.2 $Inh\alpha^{+/+}$ o $Inh\alpha^{-/-}$. Después de 24 horas de la transferencia de células se utilizó un modelo de direccionamiento del antígeno, por lo que los ratones fueron inmunizados por vía intradérmica en las orejas con anti-DEC-205-OVA, anti-DEC-205-OVA + CT, OVA en presencia o ausencia de CT como adyuvante. Después de 7 días de inmunización se analizó la inducción de pTregs en suspensiones celulares obtenidas a partir de los linfonodos drenantes del área inmunizada, por lo que se evaluó la expresión de CD25 y FoxP3 de la población

de células OT-II transferidas ($CD4^+CD45.1^+V\beta5^+$) y se observó que en comparación con ratones silvestres hay un menor porcentaje y número de linfocitos T $CD4^+$ OVA específicos en la inmunización con OVA-CT en los ratones deficientes de inhibina, lo que sugiere que las inhibinas pueden funcionar regulando la expansión de linfocitos T $CD4^+$, ya sea por la modulación del MHC de tipo II y la participación de moléculas co-estimuladoras y co-inhibitorias, o por migración de los linfocitos T $CD4^+$ hacia el sitio de inflamación. En el caso de los ratones $Inh\alpha^{-/-}$ inmunizados con anti-DEC-205-OVA, comparados con ratones silvestres, se observó mayor número de linfocitos pTreg; mientras que para los ratones $Inh\alpha^{-/-}$, comparados con $Inh\alpha^{+/+}$, inmunizados con anti-DEC-205-OVA-CT se observó incremento de linfocitos pTregs. Los datos anteriores indican que las células dendríticas deficientes de inhibinas son más propensas a inducir respuestas tolerogénicas *in vivo* al emplear un modelo de direccionamiento de antígeno (OVA) a través de anti-DEC205 en ratones con células T $CD4^+$ $CD25^-$ de ratones OT-II en conjunto con un adyuvante (CT).

4. JUSTIFICACIÓN

Grandes avances en la ciencia básica y la investigación médica han sido posibles gracias a las observaciones y las pruebas en modelos animales. Particularmente, se ha demostrado que el uso de ratones como modelo experimental para evaluar procesos *in vivo* es de suma importancia debido a que existen notables similitudes anatómicas y fisiológicas entre humanos y ratones, lo que facilita investigar una amplia gama de mecanismos, así como la evaluación de terapias y vacunas en estos animales antes de aplicarlo en humanos. Por ello que es necesario realizar la estandarización de un modelo murino *in vivo* con un sistema antígeno específico dirigido que permita obtener las condiciones ideales para la diferenciación de linfocitos T efectores Th1 y Th17 para posteriormente realizar los experimentos con ratones transgénicos con un gen *deletado* (borrado o eliminado) como los ratones deficientes en la subunidad α de inhibina (inhibina $\alpha^{-/-}$) y ratones condicionales de betaglicano (dLCKCre/Flox).

5. HIPÓTESIS

Si se logran establecer las condiciones óptimas para diferenciar linfocitos Th1 y Th17 en un modelo murino *in vivo* se podrá evaluar la respuesta antígeno específica y aplicarlo a futuros proyectos con ratones transgénicos con un gen *deletado* como los ratones deficientes en la subunidad α de inhibina (inhibina $\alpha^{-/-}$) y ratones condicionales de betaglicano (dLCKCre/Flox).

6. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar y estandarizar un modelo murino *in vivo* para la evaluación de linfocitos Th1 y Th17 antígenos específicos.

Objetivos particulares

1. Realizar la fenotipificación de los modelos murinos a utilizar.
2. Estandarizar el protocolo de inmunización y detección de linfocitos T efectores Th1 y Th17 *in vivo*.
3. Estandarizar las condiciones de reestímulo *in vitro* para evaluar linfocitos Th1 y Th17.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Modelos murinos transgénicos

7.1.1. Modelo murino OT-II

Estos ratones expresan el receptor de células T (TCR) de cadena α y cadena β específico para el péptido ovoalbúmina (OVA) 323-339 en el contexto de la interacción I-Ab (coreceptor CD4⁺ con MHC clase II). Esto da como resultado células T CD4⁺ que reconocen principalmente los residuos de péptidos de ovoalbúmina 323-339 cuando son presentados por la molécula MHC clase II. El modelo OT-II se utilizó para producir una reacción inmune dirigida antígeno-específica con OVA. Estos ratones fueron obtenidos del laboratorio Jackson (B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J, Stock No: 004194) (100).

7.1.2. Modelo murino CD45.1

Estos ratones están en el fondo genético C57BL/6. El CD45 es un receptor de proteína tirosina fosfatasa expresado en todas las células hematopoyéticas, excepto en los eritrocitos maduros y las plaquetas, y está codificada por el gen *PTPRC*. Los ratones C57BL/6 de tipo silvestre normalmente expresan el alelo *PTPRCB* (CD45.2); mientras que la otra cepa (congénica) expresa el alelo *PTPRCA* (CD45.1). Este modelo fue utilizado como la cepa receptora para realizar la transferencia de células T *naïve* CD25⁻ y CD4⁺ de ratones OT-II y así rastrearlas mediante citometría de flujo. Estos ratones fueron obtenidos del laboratorio Jackson (CByJ.SJL(B6)-*Ptprca*/J, Stock No: 006584) (101).

7.2. Manejo, mantenimiento y toma de muestras de ratones de cepas transgénicas OT-II y CD45.1

7.2.1. Marcaje de nacimientos

Esta actividad se realizó observando la presencia de ratones neonatos y así llevar un control físico y en línea sobre los nacimientos que hubo cada semana de cada cepa anteriormente mencionada.

7.2.2. Identificación de ratones

Esta actividad se realizó mediante muescas en ambas orejas, con numeración de decenas para la oreja derecha y unidades para la oreja izquierda. Se realizó para todas las cepas a las 2 semanas de edad y el registro se anotó en la tarjeta e inventarios correspondientes.



Figura 8. Identificación de ratones por muesca en las orejas. Observado desde una vista dorsal del ratón, del lado derecho se marcan las decenas en la parte radial 10, 20 y 40, y del lado izquierdo las unidades 1, 2 y 4. Se deben hacer las combinaciones pertinentes de doble muesca para obtener el número deseado.

7.2.3. Sexado

La determinación del sexo de los ratones se realizó por simple observación de la zona perianal a las 3 semanas. Para dicho propósito se evalúa la distancia entre la

papila genital y la apertura anal, la cual es mayor en los machos. El tamaño de la papila genital es también notoriamente mayor en los machos. Como una alternativa, es posible observar la parte ventral de las crías y distinguir a las hembras por la falta de pelo alrededor de los pezones.



Figura 9. Sexado de ratones por observación de la zona perianal. En las ratonas la distancia ano-genital es pequeña, mientras que en los machos es aproximadamente el doble que en las hembras. Además, la papila urogenital es más prominente en los machos, lo que facilita el sexado.

7.2.4. Destete

Se realizó a las 4 semanas de nacidos en todas las cepas anteriormente mencionadas, haciendo la separación entre hembras y machos, y colocando un máximo de 7 ratones por caja.

7.2.5. Sacrificio

Se realizó dislocación cervical manual de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1992. La justificación más usual para mandar ratones a sacrificio fue debido a la edad. También se mandaron a sacrificio ratones rojo (de todas las cepas) debido a mala oclusión dental y dermatitis ulcerativa.

7.2.6. Toma de muestra de sangre de la vena mandibular

La toma de muestras se realizó en ratones de 3 semanas de edad para las cepas transgénicas OT-II y CD45.1 para su fenotipificación. El procedimiento comienza con el manejo del ratón tomándolo por la piel laxa de la región dorso cervical para inmovilizarlo, posteriormente se introduce el bisel de una aguja en la mandíbula inferior y a la altura de la oreja, y se colectan 3 gotas de sangre en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 5 µl de heparina para evitar la coagulación de la sangre.

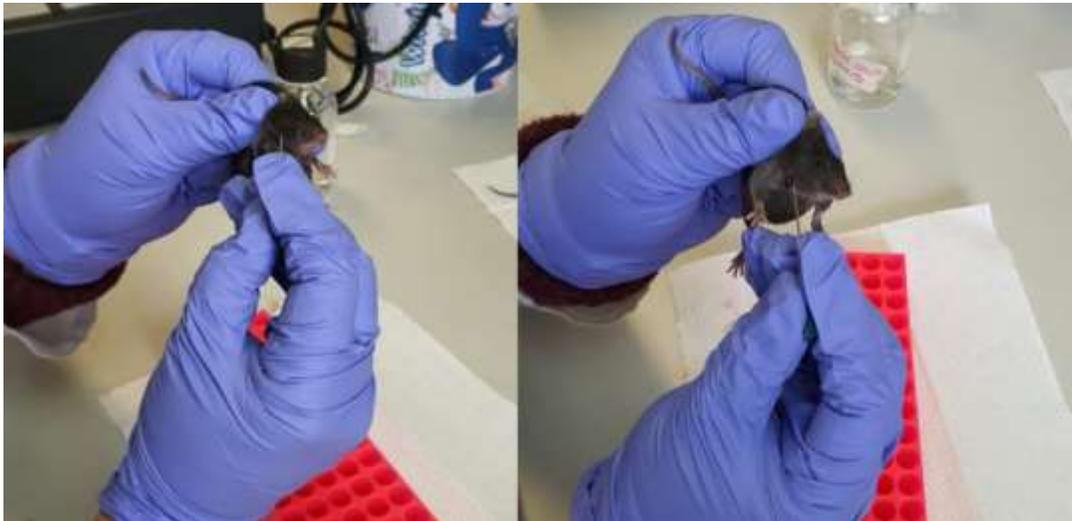


Figura 10. Toma de muestra de sangre de ratón de vena mandibular. Para la toma de muestra de sangre de ratones se inmovilizan gentilmente por la región dorsocervical y retrayendo la piel del cuello para posteriormente introducir el bisel de una aguja en la mandíbula inferior y recolectar las gotas de sangre necesarias en un tubo eppendorf con heparina.

El uso y manipulación de los ratones OT-II y ratones CD45.1 fue aprobado por la Comisión para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM, dentro del proyecto de investigación "Papel de las inhibinas y el betaglicano en la diferenciación funcional de linfocitos T" con número de folio ID:176.

7.3. Fenotipificación de los modelos murinos

7.3.1. Ratones OT-II

Para la fenotipificación se tomó una muestra de sangre desde el seno retro-orbital de cada uno de los ratones, posteriormente en cada una de las muestras se colocaron 30 μ l del mix de tinción preparado con α CD4 APC (Cat. 100412, Biolegend) y V β 5 Bn (Cat. 553188, BD Biosciences), y 20 μ l de sangre en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Para los controles de compensación se utilizaron 20 μ l de sangre y 30 μ l de la dilución del anticuerpo correspondiente, α CD4 APC y α CD3 PE (Cat. 100206, Biolegend). Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 400 μ l de buffer de lisis ACK a muestras y controles y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con 600 μ l de PBS (1X), se centrifugaron a 336 x g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 30 μ l de Estreptavidina PE (Cat. 554061, BD Biosciences) a las muestras y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavaron muestras y controles dos veces con 600 μ l de PBS, se centrifugaron a 336 x g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Muestras y controles se fijaron con 200 μ l de paraformaldehído al 4% (PAF) y se incubaron durante 5 minutos. Se lavaron con 600 μ l de PBS (1X), se centrifugaron a 336 x g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Finalmente, muestras y controles se resuspendieron en 1 ml de PBS (1X). La adquisición de las muestras se realizó en el equipo Attune Nxt (Thermo Scientific) utilizando el canal RL1 para el fluorocromo APC y el canal YL1 para el fluorocromo PE.

La tinción superficial se realizó con el anticuerpo V β 5 reconoce específicamente los receptores de linfocitos T V β 5.1 y V β 5.2 de la cadena β del TCR, y está acoplado a una molécula de biotina. Para su detección por citometría de flujo se utilizó estreptavidina acoplada a ficoeritrina (PE) que reconoce y tiene gran afinidad por la biotina. La detección del fluorocromo PE por citometría de flujo permite la detección de la cantidad de anticuerpo V β 5 específico presente en la muestra y determinando si el ratón es OT-II.

7.3.2. Ratones CD45.1

Para la fenotipificación de estos ratones se tomó una muestra de sangre desde el seno retro-orbital de cada uno de ellos, posteriormente a cada una de las muestras se colocaron 30 μ l del mix de tinción preparado con α CD4 APC y α CD45.1 AF700 (Cat. 110724, Biolegend), y 20 μ l de sangre en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Para los controles se agregaron 20 μ l de sangre y 30 μ l de la dilución del anticuerpo correspondiente, α CD4 APC y α CD45.1 AF700. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 400 μ l de buffer de lisis ACK a muestras y controles y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con 600 μ l de PBS (1X), se centrifugaron a 336 x g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se volvieron a lavar las células. Se fijaron con 200 μ l de paraformaldehído al 4% a muestras y controles y se incubaron durante 5 minutos. Se lavaron con 600 μ l de PBS (1X), se centrifugaron a 336 x g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Finalmente, muestras y controles se resuspendieron en 1ml de PBS (1X). La adquisición de las muestras se realizó en el equipo Attune Nxt (Thermo Scientific) utilizando el canal

VL2 para el fluorocromo BV510 y el canal RL2 para el fluorocromo AF700, esperando que el anticuerpo se una específicamente a CD45.1, que es un antígeno común de leucocitos, en los ratones que expresan el aloantígeno CD45.1.

7.4. Ensayos *in vivo* para la diferenciación de linfocitos T efectores Th1 y Th17 antígeno dirigidos

- a) Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 48 horas con el péptido de OVA y un doble reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA y además 6 horas con PMA-Ionomicina, inmunizando con PBS, OVA y OVA-CT.**

Aislamiento de células por *sorting* y transferencia de células

Día 1: se realizó el aislamiento de células T *naïve* extrayendo los linfonodos y los bazo de tres ratonas OT-II para disgregarlos mecánicamente con ayuda de un émbolo de jeringa en una placa de cultivo celular y así obtener las células en una suspensión de medio. Las células obtenidas se tiñeron con α CD4 FITC (Cat. 100406, Biolegend) y α CD25 PEcy5 (Cat. 102010, Biolegend) durante 15 min a 4°C y posteriormente se aislaron linfocitos T *naïve* (CD4⁺ CD25⁻) por *sorting* utilizando el equipo MoFlow (Beckman Coulter). Las células obtenidas se centrifugaron y se resuspendieron en medio fresco. Después, se contaron las células y se comprobó su viabilidad mediante tinción de exclusión con azul de tripano en cámara de Neubauer. Finalmente se ajustó la concentración de las células resuspendiendo 3×10^6 de células T *naïve* CD4⁺ y CD25⁻ de cada una de las tres ratonas OT-II en 100 μ l de PBS (1X) para posteriormente transferirlas a tres ratonas CD45.1 de 4

semanas de edad por vía intravenosa a través del seno retro-orbital con sedación previa con isoflurano inhalado (Isoflurano 100%, PISA Agropecuaria) (**Figura 11**).

Inmunización

Día 2: después de 24 horas de la transferencia de células se inmunizaron las tres ratonas CD45.1 por vía intradérmica en las orejas; la primera ratona con PBS (1X), la segunda ratona con el antígeno específico OVA (10 µg/ml) (donado por la Dra. Laura Bonifaz), y la tercera ratona con OVA y CT (toxina del cólera 1 mg/ml). La preparación de la inmunización se realizó en un volumen total de 30µl de PBS (1X), inoculando un volumen total de 15µl por oreja (0.5 mg/ml) para así producir una reacción inmune antígeno-específica dirigida (**Figura 11**).

La reacción inmune dirigida antígeno específica se realizó con el modelo αDEC 205-OVA, donde la proteína OVA está acoplada químicamente al anticuerpo monoclonal αDEC 205, por lo que una vez inoculado se dirige hacia los receptores DEC 205 que se encuentran en la superficie de las células dendríticas. El antígeno fagocitado a través de DEC 205 ingresa a la vía de presentación de antígeno MHC clase II y posteriormente se presenta a los linfocitos T CD4⁺.

Colección y procesamiento de linfonodos mandibulares y reestímulo con el péptido de OVA y PMA-Ionomicina

Día 9: después de 7 días desde la inmunización se sacrificaron las tres ratonas CD45.1 por dislocación cervical y mediante disección se colectaron los linfonodos mandibulares por separado de cada ratona, después se disgregaron mecánicamente y se contaron las células para cultivar en una placa de 96 pozos de

fondo plano. Se cultivaron dos pozos con 3×10^6 células en 200 μ l de medio RPMI 10% SBF (Suero Bovino Fetal) (GIBCO, Cat. 31800-022) de cada ratona CD45.1 sacrificada (6 pozos en total), posteriormente se reestimularon con el péptido de OVA (2 μ g/ml) durante 48 horas a 37 °C y adicionalmente un pozo con células de cada ratona se reestimuló con PMA (400 ng/ml) Ionomicina (40 ng/ml) y se incubó durante 6 horas a 37 °C (**Figura 11**).

Inhibición del transporte de proteínas, tinción superficial e intracelular

Día 11: se realizó la inhibición del transporte de proteínas usando Brefeldina A (Cat.51-2301KZ, BD Biosciences) (1 μ l por 6×10^6 de células) durante 5 horas a 37 °C para favorecer la acumulación intracelular de citocinas. Después de bloquear el tráfico vesicular, las células se pasaron a una placa de tinción fondo U, se lavaron y se realizó una tinción superficial con α CD4 APC (Cat. 100412, Biolegend), α CD45.1 AF700 (Cat. 110724, Biolegend), α V β 5 Bn (Cat. 553188, BD Biosciences) y Zombie Nir (Cat. 423106, Biolegend) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con 200 μ l de buffer de FACS y se realizó la fijación-impermeabilización con Fix Perm 1X (Cat. TNB1022-I160, Tonbo Biosciences) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con 100 μ l de Perm Buffer 10X (Cat. TNB12-L150, Tonbo Biosciences) y realizó un bloqueo de sitios inespecíficos con Fc Block (α CD16/CD32) (Cat. 101302, Biolegend) durante 20 minutos a 4 °C. Pasado el bloqueo de sitios Fc, las células se lavaron con Perm Buffer 10X, se realizó una tinción intracelular con un mix de α IL-17 PE (Cat. 506904, Biolegend), IFN- γ BV510 (Cat. 505841, Biolegend) y α V β 5 BV605 (Cat. 563260, BD Biosciences) durante 20 minutos a 4 °C. Para finalizar, las células se lavaron con

100 µl de Perm Buffer 10X, se resuspendieron en 200 µl de FACS y se trasladaron a tubos eppendorf de 1.5 ml y se mantuvieron a 4 °C hasta su lectura en el citómetro (**Figura 11**).

Citometría de flujo

Durante los experimentos se utilizaron anticuerpos acoplados a fluorocromos (**Tabla 3**), tanto para las muestras como para los controles de compensación, además del marcador de viabilidad Zombie Nir (Cat. 423106, Biolegend), que es un reactivo fluorescente permeable en células con la membrana comprometida.

Todos los *sortings* y adquisiciones de las muestras se realizaron en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo. Los *sortings* se realizaron en el equipo de Mo Flow (Beckman Coulter) y todas las muestras se procesaron en el citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo Scientific). El análisis de datos se realizó con el programa FlowJo 10.7.1.

b) Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 6 horas con PMA-Isonomicina y un reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT.

Aislamiento de células por *sorting* y transferencia de células

Día 1: se realizó el aislamiento de células T *naïve* y la transferencia de células siguiendo la misma metodología que en el inciso a) (**Figura 12**).

Inmunización

Día 2: después de 24 horas de la transferencia de células se inmunizaron las tres ratonas CD45.1 por vía intradérmica en las orejas; la primera ratona con OVA (10 µg/ml) y CT (toxina del cólera 1 mg/ml), la segunda ratona con anti-DEC-OVA (3.36 µg/µl) (donado por la Dra. Juliana Idoyaga) y la tercera ratona con anti-DEC-OVA con CT. La preparación del volumen de la inmunización se realizó siguiendo la misma metodología que en el inciso a) (**Figura 12**).

Colección y procesamiento de linfonodos mandibulares y reestímulo con el péptido de OVA y PMA-Ionomicina

Día 9: se realizó la colección y procesamiento de linfonodos mandibulares siguiendo la misma metodología que en el inciso a). Se cultivaron dos pozos con 3×10^6 células en 200 µl de medio RPMI 10% SBF de cada ratona CD45.1 sacrificada (6 pozos en total), posteriormente se reestimuló un pozo con células de cada ratona CD45.1 con el péptido de OVA (2 µg/ml) durante 48 horas a 37 °C y el pozo con células restante se reestimuló con PMA (400 ng/ml) Ionomicina (40 ng/ml) y se incubó durante 6 horas a 37 °C (**Figura 12**).

Inhibición del transporte de proteínas, tinción superficial e intracelular

Finalizado el reestímulo de 6 horas con PMA-Ionomicina (día 9) y el reestímulo de 48 horas (día 11) con el péptido de OVA se realizó la inhibición del transporte de proteínas, tinción superficial e intracelular siguiendo la misma metodología que en el inciso a) (**Figura 12**).

Citometría de flujo

Se realizó la adquisición de las muestras por citometría de flujo siguiendo la misma metodología que en el inciso a).

c) Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 48 horas con el péptido de OVA inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA-CT.

Aislamiento de células por *sorting* y transferencia de células

Día 1: se realizó el aislamiento de células T *naïve* y la transferencia de células siguiendo la misma metodología que en el inciso a) (**Figura 13**).

Inmunización

Día 2: después de 24 horas de la transferencia de células se inmunizaron las tres ratonas CD45.1 por vía intradérmica en las orejas; la primera ratona con OVA (10 µg/ml) y CT (toxina del cólera 1 mg/ml), la segunda ratona con anti-DEC-OVA (3.36 µg/µl) y la tercer ratona con anti-DEC-OVA con CT. La preparación del volumen de la inmunización se realizó siguiendo la misma metodología que en el inciso a) (**Figura 13**).

Colección y procesamiento de linfonodos mandibulares y reestímulo con el péptido de OVA y PMA-Ionomicina

Día 9: se realizó la colección y procesamiento de linfonodos mandibulares siguiendo la misma metodología que en el inciso a). Los pozos con células de cada ratona CD45.1 se reestimularon con el péptido de OVA (2 µg/ml) durante 48 horas a 37 °C (**Figura 13**).

Inhibición del transporte de proteínas, tinción superficial e intracelular

Día 11: finalizado el reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA se realizó la inhibición del transporte de proteínas, tinción superficial e intracelular siguiendo la misma metodología que en el inciso a) (**Figura 13**).

Citometría de flujo

Se realizó la adquisición de las muestras por citometría de flujo siguiendo la misma metodología que en el inciso a).

d) Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 6 horas con PMA-Ionomicina, y 24 y 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT.

Aislamiento de células por *sorting* y transferencia de células

Día 1: se realizó el aislamiento de células T *naïve* y la transferencia de células siguiendo la misma metodología que en el inciso a) con la diferencia de que se utilizaron dos ratonas OT-II y dos ratonas CD45.1 (**Figura 14**).

Inmunización

Día 2: después de 24 horas de la transferencia de células se inmunizaron las dos ratonas CD45.1 por vía intradérmica en las orejas; ambas con OVA (10 µg/ml) y CT (toxina del cólera 1 mg/ml). La preparación del volumen de la inmunización se realizó siguiendo la misma metodología que en el inciso a) (**Figura 14**).

Colección y procesamiento de linfonodos mandibulares y reestímulo con el péptido de OVA y PMA-Ionomicina

Día 9: se realizó la colección y procesamiento de linfonodos mandibulares siguiendo la misma metodología que en el inciso a). Se realizó un *pool* de células de ambas ratonas y se cultivaron seis pozos con 3×10^6 células en 200 μ l de medio RPMI 10% SBF, posteriormente dos pozos se reestimularon con PMA (400 ng/ml) Ionomicina (40 ng/ml) durante 6 horas a 37 °C, dos pozos se reestimularon con el péptido de OVA (2 μ g/ml) durante 24 horas a 37 °C y los dos pozos restantes se reestimularon con el péptido de OVA (2 μ g/ml) durante 48 horas a 37 °C (**Figura 14**).

Inhibición del transporte de proteínas, tinción superficial e intracelular

Finalizado el reestímulo de 6 horas con PMA-Ionomicina (día 9) y de los reestímulos de 24 (día 10) y 48 horas (día 11) con el péptido de OVA se realizó la inhibición del transporte de proteínas, tinción superficial e intracelular siguiendo la misma metodología que en el inciso a) (**Figura 14**).

Citometría de flujo

Se realizó la adquisición de las muestras por citometría de flujo siguiendo la misma metodología que en el inciso a).

Tabla 3. Anticuerpos acoplados a fluorocromos utilizados durante los experimentos.

Molécula blanco	Fluorocromo	Clona	Fabricante
CD4	APC	GK1.5	Biologend
CD4	FITC	GK1.5	Biologend
CD4	Vβ510	RM4-5	Biologend
CD25	PECy5	PC61	Biologend
CD45.1	AF700	A20	Biologend
Vβ5 biotinilado	-----	MR9-4	BD Biosciences
Vβ5	BV605	MR9-4	BD Biosciences
Estreptavidina	BV605	M229	Biologend
Estreptavidina	PE	MR9-4	BD Biosciences
IL-17	PE	TC11-18H10.1	Biologend
IFN-γ	BV510	XMG1.2	Biologend
CD3	PE	17A2	Biologend
CD3	Bn	145-2C11	Biologend

8. METODOLOGÍA

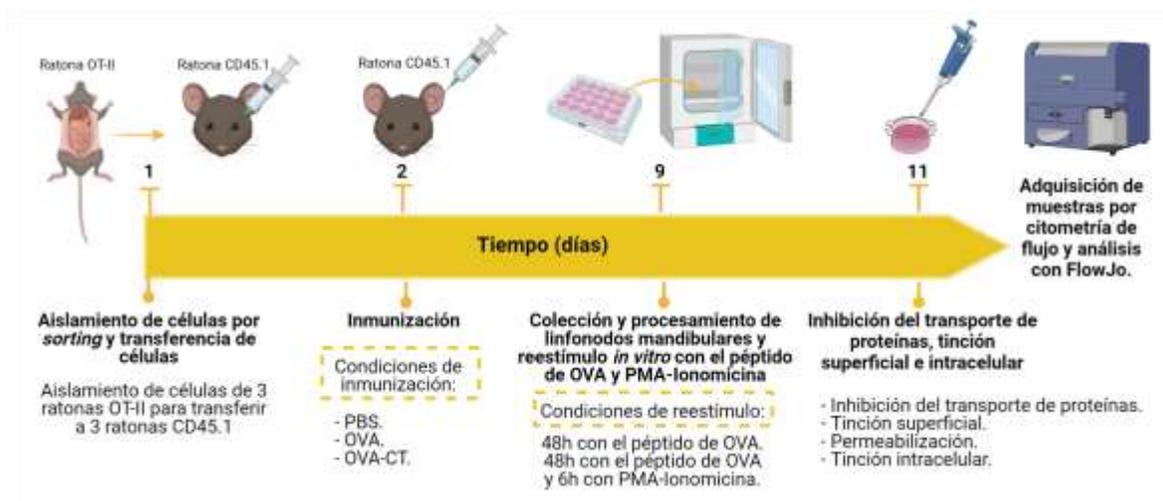


Figura 11. Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 48 horas con el péptido de OVA y un doble reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA y además 6 horas con PMA-Ionomicina, inmunizando con PBS, OVA y OVA-CT.

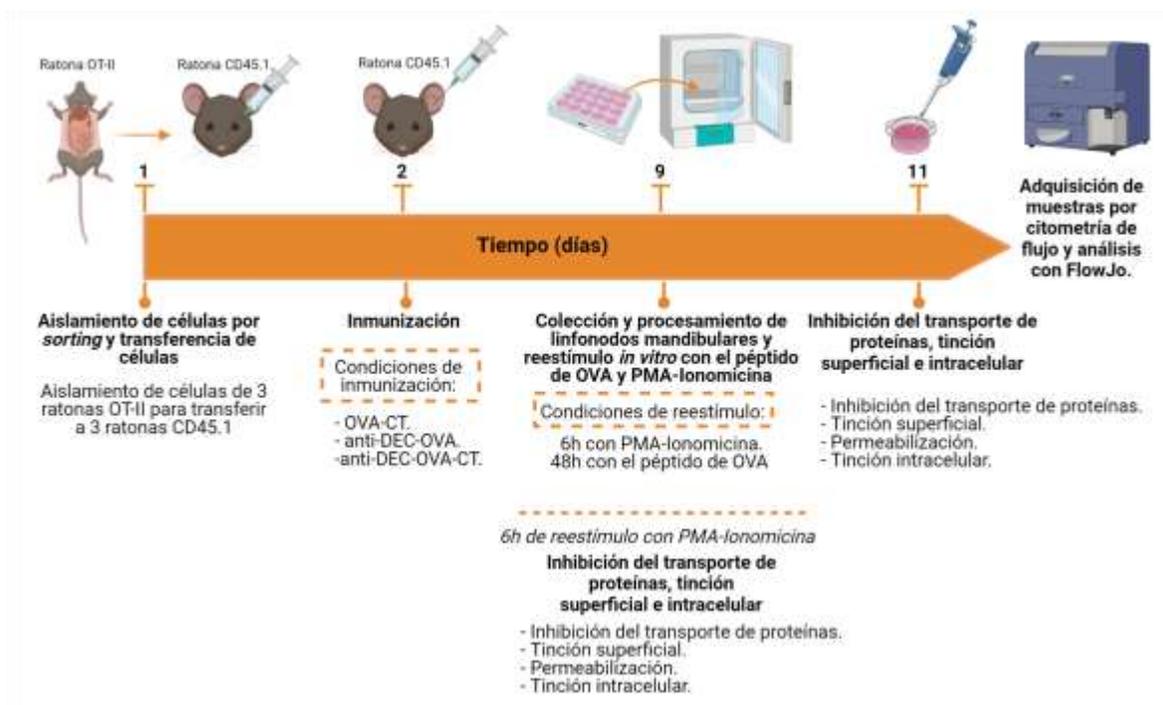


Figura 12. Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 6 horas con PMA-Ionomicina y un reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT.

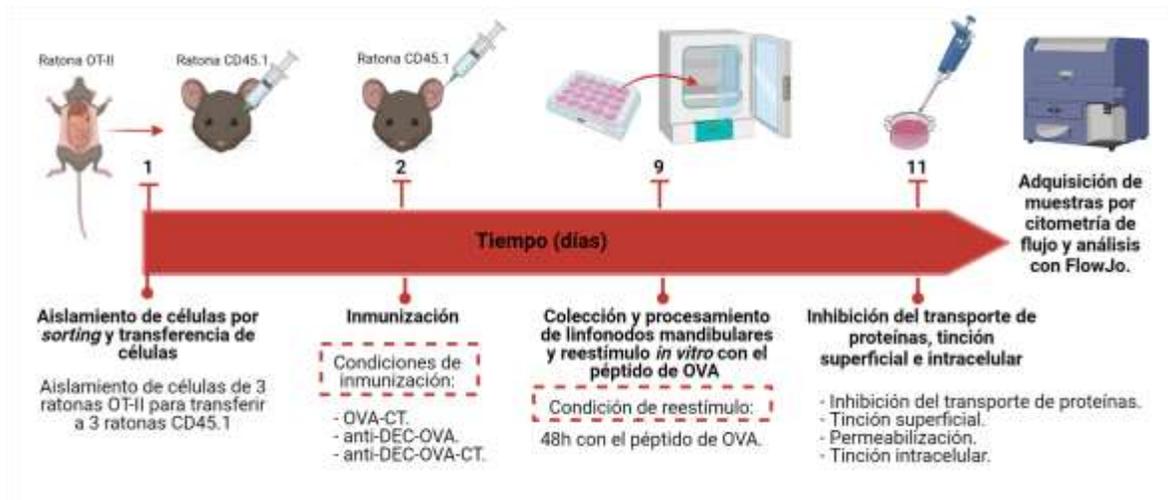


Figura 13. Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 48 horas con el péptido de OVA inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA-CT.

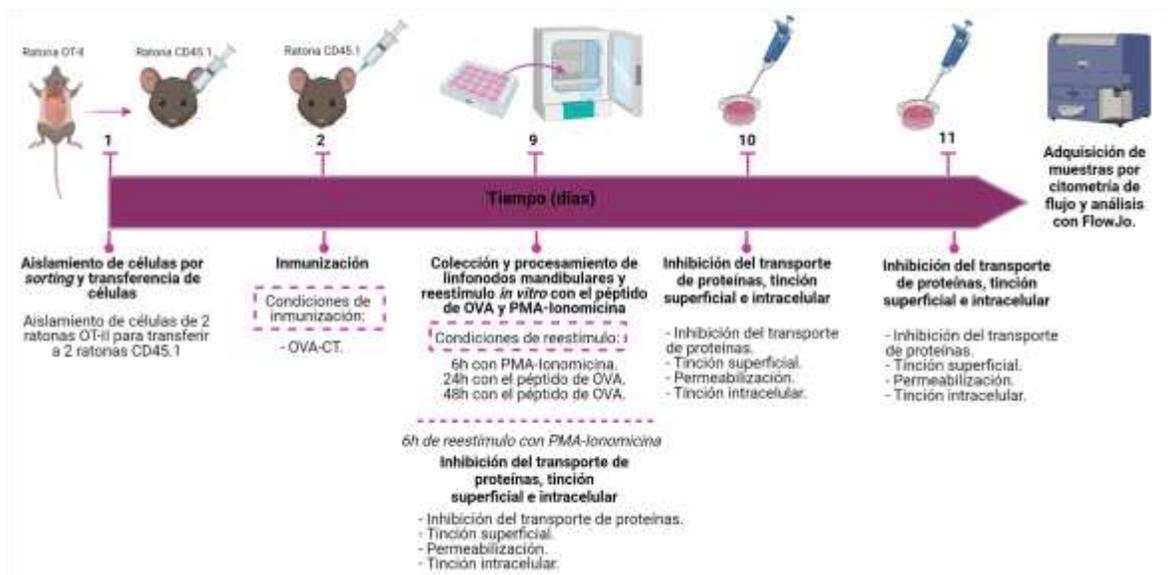


Figura 14. Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 6 horas con PMA-Ionomicina, y 24 y 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT.

9. RESULTADOS

9.1. Fenotipificación de los modelos murinos OT-II y CD45.1

9.1.1. Fenotipificación del modelo murino OT-II

El fenotipo de los ratones OT-II se determinó realizando una tinción superficial de células de sangre periférica. Después de la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo, los datos obtenidos se analizaron en el software FlowJo X siguiendo la estrategia de análisis que se esquematiza en la **Figura 15**.

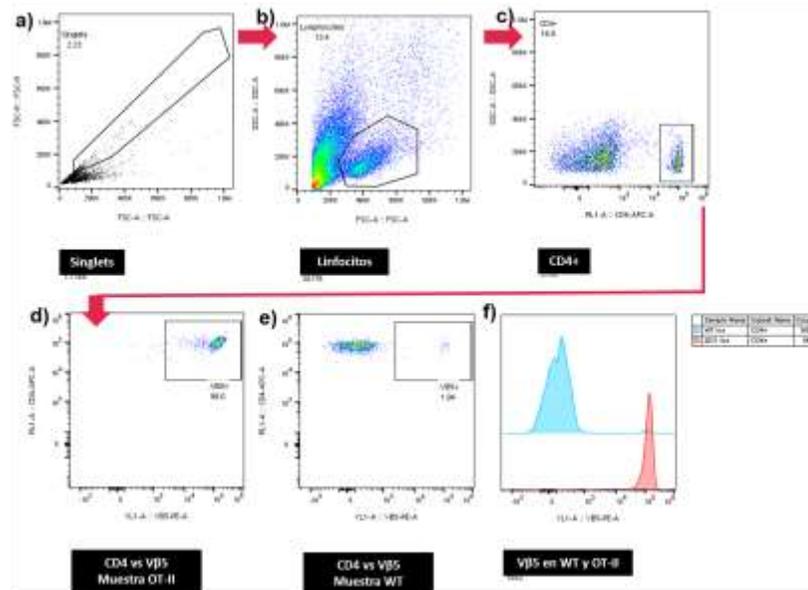


Figura 15. Análisis para la fenotipificación del modelo murino OT-II. Para la fenotipificación de los ratones OT-II se siguió la siguiente estrategia: en el primer *gate* (a) se limitan los "Singlets" para tomar los eventos individuales y descartar los debrís; después se limitó la población de "Linfocitos" (b); dentro de esta región se tomaron las células "CD4 positivas" (c); posteriormente, a partir de éstas, se utilizó un *dot plot* de "CD4 vs Vβ5" para evaluar el porcentaje de células Vβ5 de OT-II (d) o de WT (e). Finalmente se muestra un ejemplo de histograma de una muestra WT (azul) y una OT-II (rojo) al mismo tiempo (*half offset*) para evaluar los niveles de expresión de "Vβ5" (f).

En la **Figura 15** se observan dos histogramas comparativos de expresión de Vβ5 el primero de un ratón de tipo silvestre o *wild type* WT (azul) con niveles de expresión

bajos de Vβ5 indica que el ratón es de tipo *wild type*, mientras que el segundo (rojo) indica que el ratón es OT-II. Todos los ratones usados en este trabajo fueron fenotipificados así.

9.1.2. Fenotipificación del modelo murino CD45.1

El fenotipo de los ratones CD45.1 se determinó realizando una tinción superficial de células. Los datos se analizaron siguiendo la misma estrategia de análisis que en el punto 9.1.1. (**Figura 16**).

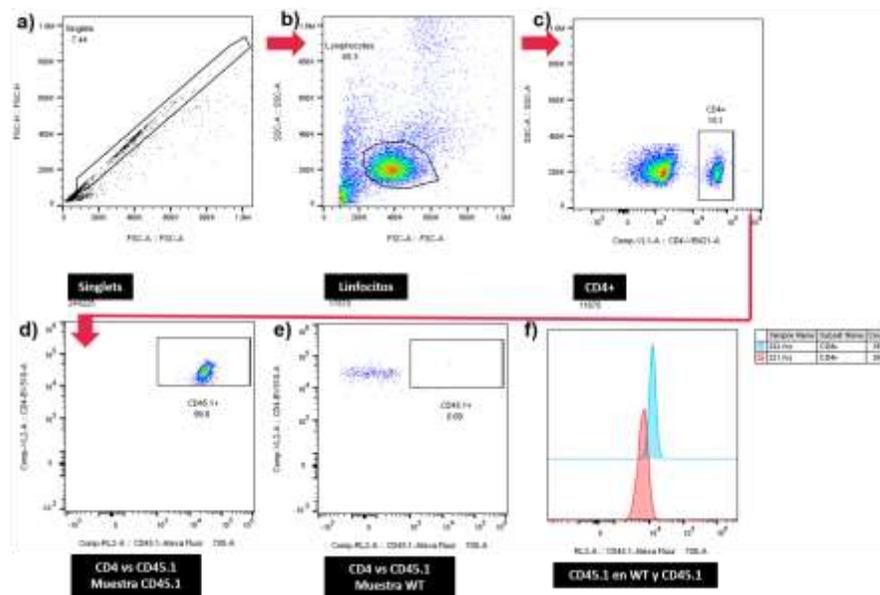


Figura 16. Análisis para la fenotipificación del modelo murino CD45.1. Para la fenotipificación de ratones CD45.1 se siguió la siguiente estrategia de análisis: en el primer gate se limitan los “Singlets” (a) para tomar los eventos individuales y descartar sin debris; después se limitó la población de “Linfocitos” (b); dentro de esta región se tomaron las células “CD4 positivas” (c); posteriormente, a partir de éstas un *dot plot* de “CD4 vs CD45.1” para evaluar el porcentaje de células que expresan CD45.1 en un ratón CD45.1 (d) y uno WT (e); para finalizar se utilizó el histograma de una muestra WT (azul) y una CD45.1 (rojo) al mismo tiempo (half offset) para evaluar los niveles de expresión de “CD45.1” (f).

En la **Figura 16** se observan dos histogramas comparativos de los niveles de expresión de CD45.1, el primer histograma de un ratón de tipo silvestre sin

expresión de CD45.1 lo que indica que el ratón es WT, mientras que el segundo histograma con niveles de expresión alto CD45.1 indica que el ratón es CD45.1 positivo. Todos los ratones usados en este trabajo fueron previamente fenotipificados así.

9.2. Protocolo de inmunización y condiciones de reestímulo *in vitro* para la evaluación de linfocitos T efectores Th1 y Th17 *in vivo*.

a) Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 48 horas con el péptido de OVA y un doble reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA y además 6 horas con PMA-Ionomicina, inmunizando con PBS, OVA y OVA-CT.

La diferenciación de linfocitos T *in vivo* estuvo basada en las condiciones reportadas por Laura Antonio, *et al.* (85), después de la transferencia de células antígeno específicas (V β 5) a ratones congénicos (CD45.1), se utilizó la proteína de OVA completa y como adyuvante la toxina del cólera (CT) para inmunizar. Para la detección de células Th1 y Th17 que se diferenciaron *in vivo*, se requirió reestimar las células *in vitro*, promoviendo la secreción de las citocinas específicas de cada linaje y su posible detección por citometría de flujo. Se probó el estímulo usado en el trabajo anteriormente citado, con un cultivo de células totales de linfonodo en presencia del péptido de OVA durante 48 horas. Además, se usó la combinación del péptido de OVA + PMA-Ionomicina (PMA-IONO) para comparar un solo reestímulo *in vitro* con el péptido de OVA durante 48 horas o dos reestímulos con el péptido de OVA durante 48 horas y PMA-Ionomicina durante 6 horas para detectar mejor las citocinas intracelulares IFN- γ e IL-17.

Para evaluar la población de linfocitos efectores de los linajes Th1 y Th17 diferenciados en este ensayo se siguió la estrategia de análisis que se esquematiza en la **Figura 17**, se eligieron los “*singlets*”, después las “células sin debris”, las “células vivas”, después las “células CD4 positivas” y a partir de esta región las células productoras de “IFN- γ y las productoras de IL-17”.

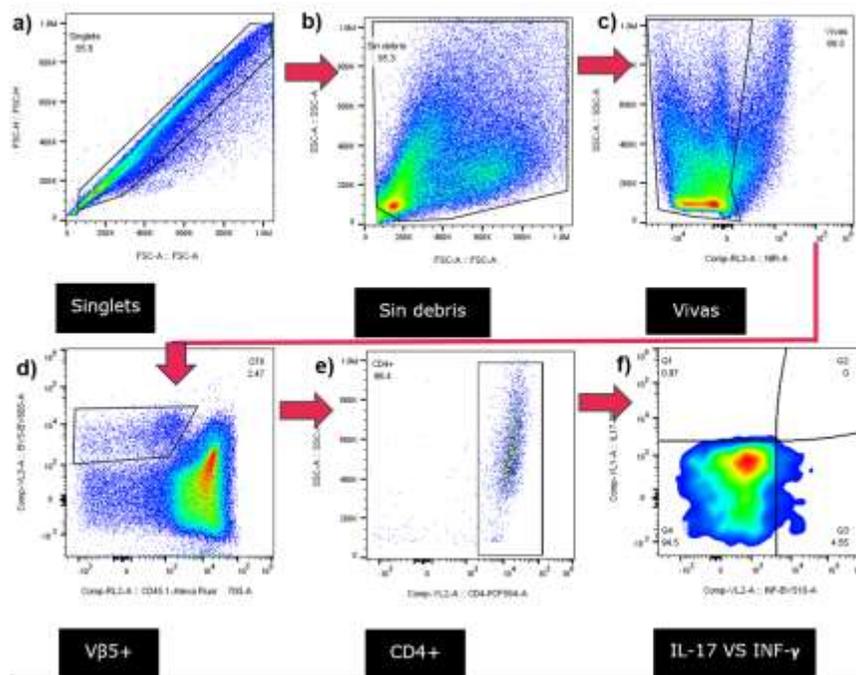


Figura 17. Análisis de la diferenciación *in vivo* para determinar la población Th1 y Th17. Se evaluó la diferenciación hacia los linajes efectores Th1 y Th17, por lo que se siguió la siguiente estrategia, primero se determinaron los “*singlets*” (a), después las “células sin debris” (b), seguido de las “células vivas” (c), después las células “Vβ5 positivas” (d), después las células “CD4 positivas” (e) y por último un gate de “IFN- γ contra IL-17” (f).

Al analizar la viabilidad se observan 108,013 eventos con la condición de OVA-CT con reestímulo pOVA y 107,557 eventos con la condición OVA con reestímulo pOVA+PMA-IONO (doble reestímulo), en comparación con la condición de PBS donde solo se observan 56,316 eventos (**Figura 18a**), sin embargo, todas las condiciones se mantienen por encima del 80% (**Figura 18b**). En la condición de

doble reestímulo y adyuvante, OVA-CT pOVA+PMA-IONO el número de células vivas cambia ya que se observan 79,552 eventos en comparación con la que solo tiene el reestímulo con pOVA donde se observan 108,013 eventos (**Figura 18a**), esto se reflejó en el número de células $V\beta5^+$ y $CD4^+$ que se encontraron posteriormente.

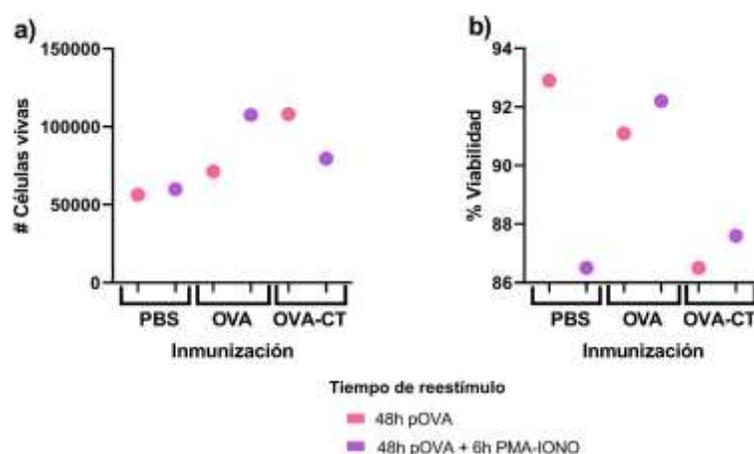


Figura 18. Viabilidad celular después del reestímulo *in vitro*. Gráficas de viabilidad del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con PBS, OVA y OVA-CT y el reestímulo *in vitro* se realizó con el péptido de OVA durante 48 horas y después un doble reestímulo con PMA-Ionomicina. **a)** Número de células vivas. **b)** Porcentaje de viabilidad.

Respecto a la cantidad de células antígeno específicas (**Figura 19cd**) se observaron 2,667 eventos para $V\beta5^+$ y 2,570 eventos para $CD4^+$ con la condición de OVA-CT con reestímulo pOVA, mientras que en la condición donde se realizó un doble reestímulo se observaron 775 eventos para $V\beta5^+$ y 673 eventos para $CD4^+$, lo cual indica que realizar un doble reestímulo reduce el número de células $V\beta5^+$. El número de células antígeno específicas encontradas es menor a 1,000 eventos en las condiciones en las que se usa pOVA+PMA-IONO en comparación con las que solo

se usa pOVA (**Figura 19cd**), lo cual complicó la evaluación de las células Th1 y Th17.

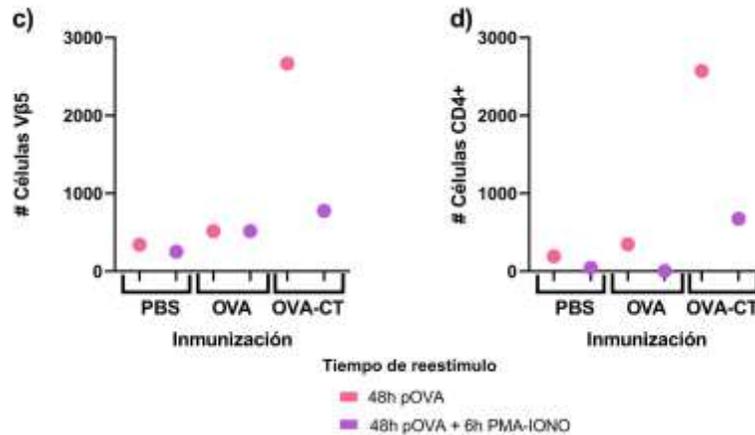


Figura 19. Número de células antígeno específicas Vβ5⁺ y CD4⁺ después del reestímulo *in vitro*. Gráficas del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con PBS, OVA y OVA-CT y el reestímulo *in vitro* se realizó con el péptido de OVA durante 48 horas y después un doble reestímulo con PMA-Ionomicina. **a)** Gráfica de número de células Vβ5. **b)** Gráfica de número de células CD4⁺.

A partir de las células vivas Vβ5⁺CD4⁺ se evaluó el porcentaje de células que expresaban IL-17 e IFN-γ a las 48 horas con pOVA y a las 48 horas con pOVA + 6 horas con PMA-IONO con cada condición de inmunización. En la **Figura 20** se muestran los *Dot plots* representativos donde se observó en el cuartil 1 (Q1) el porcentaje de células IL-17⁺ que corresponden a los linfocitos Th17, mientras que en el cuartil 3 (Q3) el porcentaje de células IFN-γ⁺ que corresponden a los linfocitos Th1.

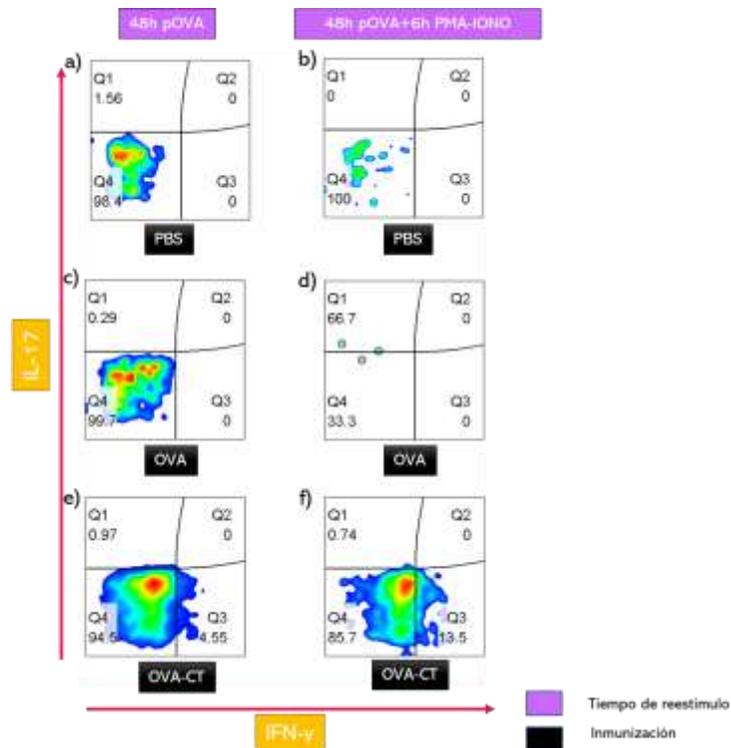


Figura 20. Evaluación de la expresión de IL-17 e IFN- γ en linfocitos murinos. Se muestran los *dot plots* representativos de IL-17 (eje de la y) contra IFN- γ (eje de la x) de células CD4⁺V β 5⁺CD45.1⁺ con las condiciones de inmunización de PBS, OVA y OVA-CT a las 48 horas de reestímulo con el péptido de OVA y 48 horas de reestímulo con el péptido de OVA + 6 horas de reestímulo con PMA-IONO. El cuartil 1 (Q1) corresponde al porcentaje de IL-17, mientras que el cuartil 3 (Q3) al porcentaje de IFN- γ .

En cuanto a las células Th1 el número y porcentaje de diferenciación hacia este linaje se determinó por las células CD4⁺ productoras de IFN- γ , de este modo, se destacan 121 células con la condición de OVA-CT con reestímulo de pOVA (**Figura 21a**). En cuanto al porcentaje de células, este fue de 13.5% de diferenciación con la inmunización de OVA-CT y el doble reestímulo con pOVA+PMA-IONO (**Figura 21b**), sin embargo, el número de eventos que corresponden a este porcentaje es de 91 eventos, por lo que a pesar de porcentaje de células es de 13.5% en la condición con doble reestímulo, el número de células no es tan satisfactorio.

En cuanto a las células Th17 el número de éstas y el porcentaje de diferenciación se determinó por las células CD4⁺ productoras de IL-17, se destacan 25 células con la condición de OVA-CT con el reestímulo de pOVA (**Figura 21c**). El porcentaje de células positivas fue de 66.7% de diferenciación para la combinación de OVA con el doble reestímulo de pOVA+PMA-IONO (**Figura 21d**), sin embargo, el número de eventos que corresponden a este porcentaje es de 2, lo cual impide asegurar que este porcentaje de diferenciación sea representativo. Nuevamente se observó que a mayor reestímulo hubo menor cantidad de células.

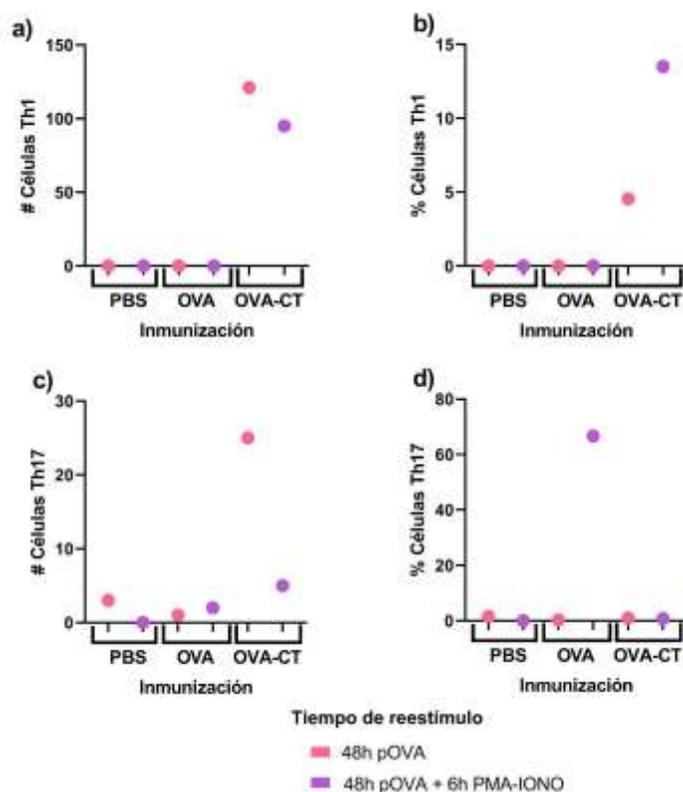


Figura 21. Número de células y porcentaje de linfocitos Th1 y Th17 diferenciados en un modelo murino *in vivo*. Gráficas representativas del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con PBS, OVA y OVA-CT y el reestímulo *in vitro* se realizó con el péptido de OVA durante 48 horas y después un doble reestímulo con PMA-Ionomicina. **a)** Número de células Th1. **b)** Porcentaje de células Th1. **c)** Número de células Th17. **d)** Porcentaje de células Th17.

b) Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 6 horas con PMA-Ionomicina y un reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT.

Con base en el experimento anterior, se decidió evaluar la detección de citocinas utilizando un sólo reestímulo, ya sea de 6 horas con PMA-Ionomicina o de 48 horas con el péptido de OVA.

Se decidió probar también el principio de *targeting* dirigido con anti-DEC-OVA hacia las células dendríticas con base en el trabajo de la Dra Juliana Idoyaga (87), en el cual se observó diferenciación Th1 y Th17 antígeno específica. Se realizaron dos condiciones de reestímulo, uno de 6 horas con PMA-IONO y otro de 48 horas con pOVA. Se inmunizó con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT.

Para evaluar la población de linfocitos efectores de los linajes Th1 y Th17 diferenciados en este ensayo se siguió la misma estrategia de análisis que se utilizó en la **Figura 17**.

Al analizar la viabilidad con la condición de OVA-CT se observaron 71,721 eventos y con anti-DEC-OVA-CT 64,888 eventos a las 48 horas de reestímulo con pOVA (**Figura 22a**), estas fueron células preactivadas que al ser reestimuladas proliferaron, por lo que se enriquecieron las células antígeno específicas. En comparación con las demás condiciones, se observaron menos de 20,000 eventos en el *gate* de células vivas. En cuanto a porcentaje de células vivas, éste se observa arriba del 80% en los diferentes tipos de inmunización con 6 horas de reestímulo

con PMA-IONO, mientras que a las 48 horas de reestímulo con OVAp, está por debajo del 60% en todas las inmunizaciones. (**Figura 22b**).

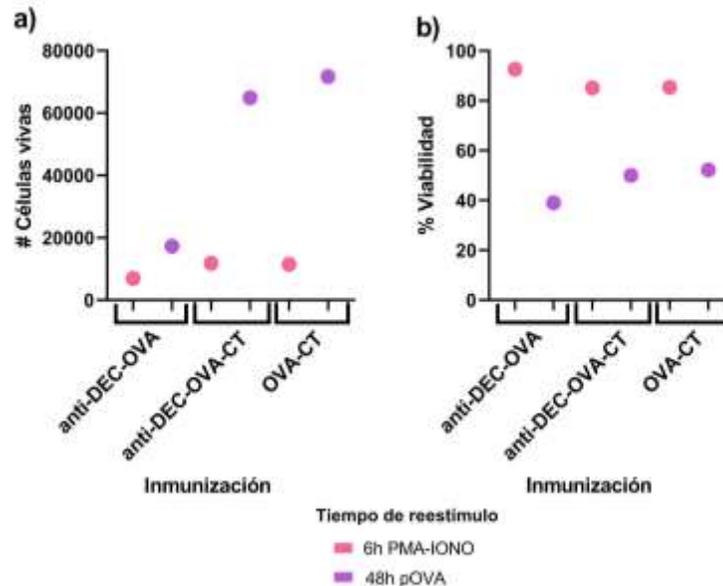


Figura 22. Viabilidad celular después del reestímulo *in vitro*. Gráficas representativas del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT y el reestímulo *in vitro* a las 6 horas con PMA-Ionomicina y a las 48 horas con el péptido de OVA. **a)** Número de células vivas. **b)** Porcentaje de viabilidad.

Respecto a la cantidad de células $V\beta 5^+$ y $CD4^+$ (**Figura 23ab**) se observan 857 eventos para $V\beta 5^+$ y 558 eventos para $CD4^+$ a las 48 horas con la inmunización OVA-CT, y 840 eventos para $V\beta 5^+$ y 408 eventos para $CD4^+$ con la inmunización con anti-DEC-OVA-CT, mientras que con la inmunización solo con el antígeno dirigido sin adyuvante (anti-DEC-OVA) se observaron 249 eventos para $V\beta 5^+$ y 111 eventos para $CD4^+$ a las 48 horas de reestímulo con el pOVA. Se observó que el uso de adyuvante durante la inmunización incrementa el número de células antígeno específicas encontradas, sin embargo, con un reestímulo de 6 horas, la cantidad de células antígeno específicas encontradas corresponde a 175 eventos

para $V\beta 5^+$ y 48 eventos para $CD4^+$ para la condición con OVA-CT y 219 eventos para $V\beta 5^+$ y 68 eventos para $CD4^+$ para la inmunización con anti-DEC-OVA-CT.

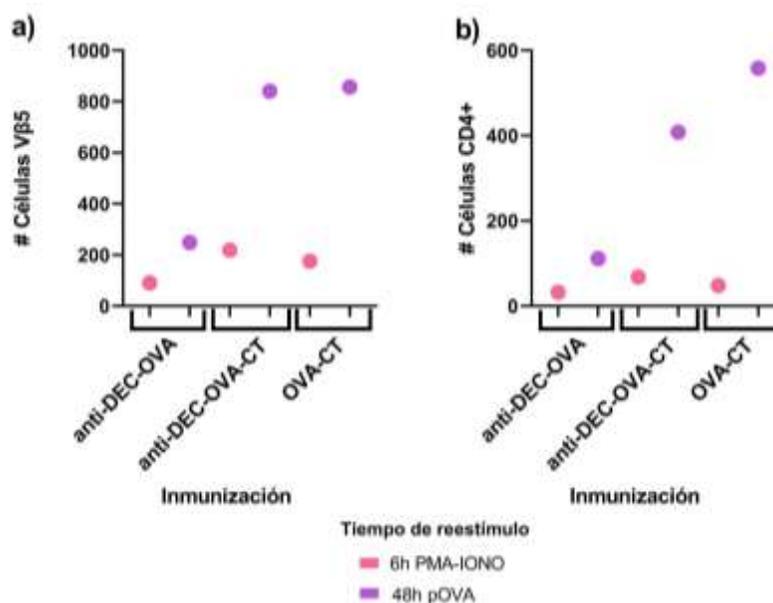


Figura 23. Número de células antígeno específicas $V\beta 5^+$ y $CD4^+$ después del reestímulo *in vitro*. Gráficas del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT y el reestímulo *in vitro* a las 6 horas con PMA-Ionomicina y a las 48 horas con el péptido de OVA. **a)** Número de células $V\beta 5^+$. **b)** Número de células $CD4^+$.

A partir de las células vivas $V\beta 5^+CD4^+$ se evaluó el porcentaje de células que expresaban IL-17 e IFN- γ a las 6 horas con PMA-IONO y a las 48 horas con pOVA con cada condición de inmunización. En la **Figura 24** se muestran los *Dot plots* representativos donde se observó en el cuartil 5 (Q5) el porcentaje de células IL-17 $^+$ que corresponden a los linfocitos Th17, mientras que en el cuartil 7 (Q7) el porcentaje de células IFN- γ^+ que corresponden a los linfocitos Th1.

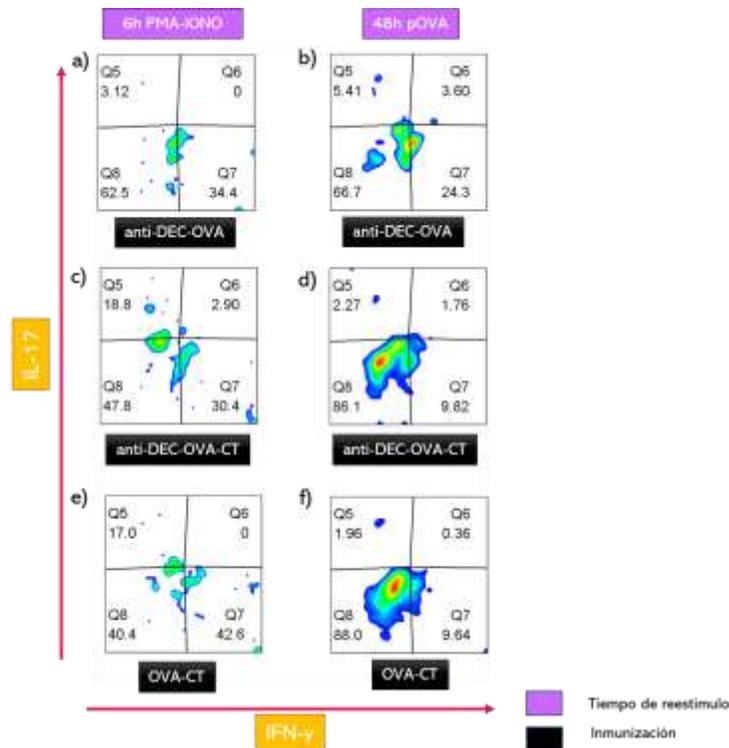


Figura 24. Evaluación de la expresión de IL-17 e IFN- γ en linfocitos murinos. Se muestran los *dot plots* representativos de IL-17 (eje de la y) contra IFN- γ (eje de la x) de células CD4⁺V β 5⁺CD45.1⁺ con la inmunización de anti-DEC-OVA, anti-DEC-OVA-CT y OVA-CT a las 6 horas de reestímulo con PMA-IONO y 48 horas de reestímulo con el péptido de OVA. El cuartil 5 (Q5) corresponde al porcentaje de IL-17, mientras que el cuartil 7 (Q7) corresponde al porcentaje de IFN- γ .

En cuanto a las células Th1 el número de células y porcentaje de diferenciación hacia este linaje se determinó por las células CD4⁺ productoras de IFN- γ , de este modo, se observaron 55 células con las condiciones de OVA-CT y 38 células con anti-DEC-OVA-CT a las 48 horas reestimuladas con pOVA (**Figura 25a**). Además, aunque destaca un porcentaje de 43.8% de diferenciación Th1 con la inmunización con OVA-CT y el reestímulo de 6 horas con PMA-IONO, éste corresponde a 21 eventos (**Figura 25b**). El porcentaje de células Th1 es mayor al 20% a las 6 horas de reestímulo en todas las condiciones, sin embargo, el número de eventos por debajo de 30 células complica su determinación.

En cuanto a las células Th17 el número de células y el porcentaje (**Figura 25cd**) de diferenciación hacia este linaje se determinó por las células CD4⁺ productoras de IL-17, de acuerdo con esto, se observan 13 células y un porcentaje de 19.1% de diferenciación con la condición de anti-DEC-OVA CT a las 6 horas de reestímulo, en comparación con la condición de OVA-CT donde se observan 7 eventos correspondiente al 14.6% de las células CD4⁺ antígeno específicas con 6 horas de reestímulo. En todas las condiciones, el número de eventos IL-17⁺ es menor a 20, esto complica hacer un análisis adecuado de los datos. Para enriquecer el número de células a evaluar, se decide sólo realizar un reestímulo *in vitro* sin dividir las células obtenidas de los linfonodos de ratones en 2 condiciones de reestímulo.

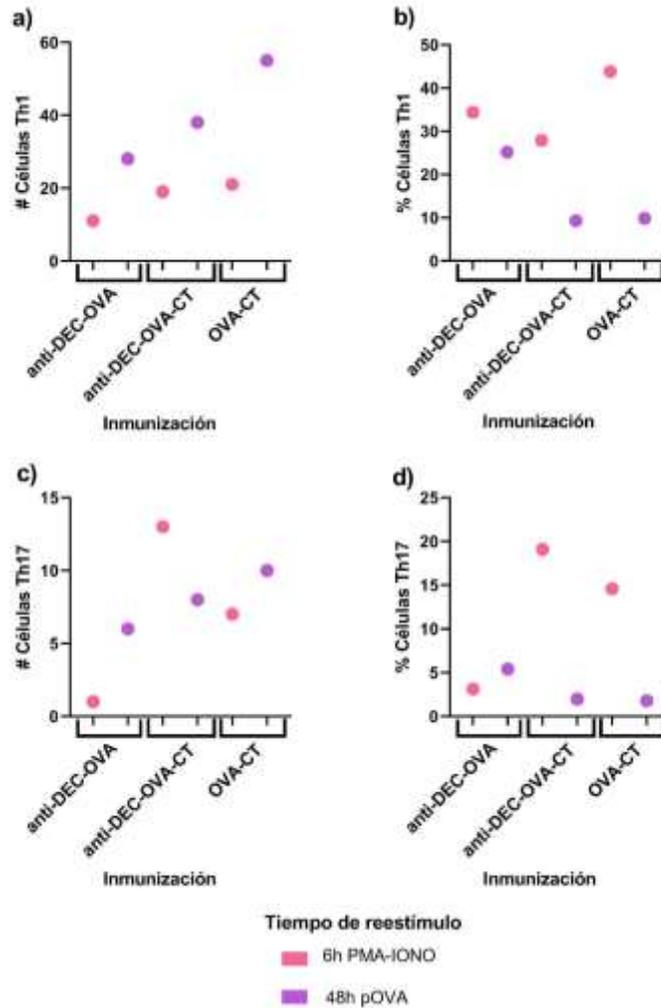


Figura 25. Número de células y porcentaje de linfocitos Th1 y Th17 diferenciados en un modelo murino *in vivo*. Gráficas representativas del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT y el reestímulo *in vitro* a las 6 horas con PMA-Ionomicina y a las 48 horas con el péptido de OVA. **a)** Número de células Th1. **b)** Porcentaje de células Th1. **c)** Número de células Th17. **d)** Porcentaje de células Th17.

c) Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 48 horas con el péptido de OVA inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA-CT.

De acuerdo con los resultados del ensayo anterior se observó un mayor número de células diferenciadas para Th1 y Th17 con el reestímulo *in vitro* a las 48 horas y

utilizando el péptido de OVA, de esta manera las células obtenidas de los linfonodos no se dividieron en 2 pozos de cultivo con condiciones distintas, lo cual permitió enriquecer la población antígeno específica, por lo que se realizó este ensayo para corroborar este resultado y nuevamente se realizó el reestímulo *in vitro* con el péptido de OVA durante 48 horas. Se probaron las combinaciones de inmunización con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT usadas en el ensayo anterior.

Para evaluar la población de linfocitos efectores de los linajes Th1 y Th17 diferenciados en este ensayo se siguió la misma estrategia de análisis que se utilizó en la **Figura 17**.

Al analizar la viabilidad se observaron 496,000 células vivas con la combinación OVA-CT (**Figura 26a**), sin embargo, destaca el porcentaje de diferenciación de 54.4% utilizando anti-DEC-OVA-CT corresponde a solo a 189,009 eventos (**Figura 26b**). A pesar de haber usado un sistema de direccionamiento del antígeno, el número de células vivas después del reestímulo *in vitro* fue de 302,121 eventos para anti-DEC-OVA y 189,099 eventos para anti-DEC-OVA-CT, más que en los ensayos previos en los cuales se observaron menos de 100,000 células vivas al finalizar el cultivo.

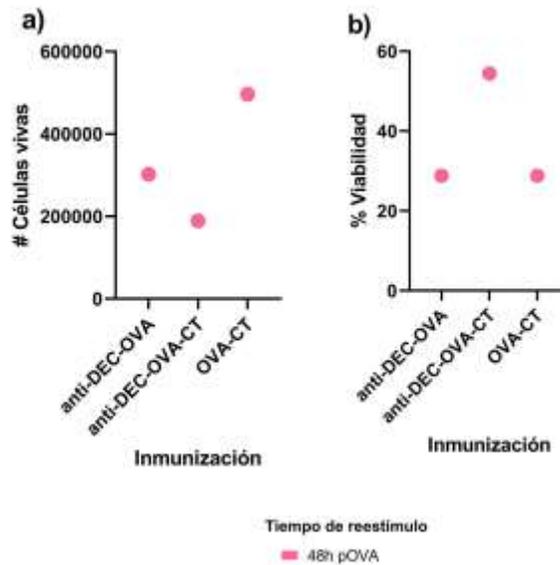


Figura 26. Viabilidad celular después del reestímulo *in vitro*. Gráficas de viabilidad del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT y el reestímulo *in vitro* con el péptido de OVA durante 48 horas. **a)** Número de células vivas. **b)** Porcentaje de viabilidad.

Respecto a la cantidad de células $V\beta5^+$ y $CD4^+$ se observaron 33,827 eventos para $V\beta5^+$ y 23,381 eventos para $CD4^+$ con la combinación de inmunización OVA-CT, en comparación con la inmunización con anti-DEC-OVA-CT donde se observaron 3,027 eventos para $V\beta5^+$ Y 1,013 para $CD4^+$ donde se usó el sistema antígeno específico dirigido (**Figura 27ab**), es decir, a pesar de que se pueden observar muchas células vivas no son las antígeno específicas que se pensaba que se encontrarían.

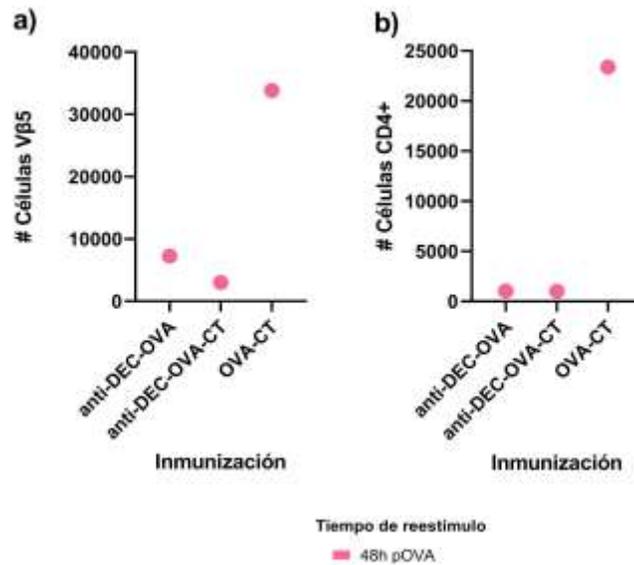


Figura 27. Número de células antígeno específicas Vβ5⁺ y CD4⁺ después del reestímulo *in vitro*. Gráficas del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT y el reestímulo *in vitro* con el péptido de OVA durante 48 horas. **a)** Número de células Vβ5. **b)** Número de células CD4⁺.

A partir de las células vivas Vβ5⁺CD4⁺ se evaluó el porcentaje de células que expresaban IL-17 e IFN-γ a las 48 horas con pOVA con cada condición de inmunización. En la **Figura 28** se muestran los *Dot plots* representativos donde se observó en el cuartil 1 (Q1) el porcentaje de células IL-17⁺ que corresponde a los linfocitos Th17, mientras que en el cuartil 3 (Q3) el porcentaje de células IFN-γ⁺ que corresponde a los linfocitos Th1.

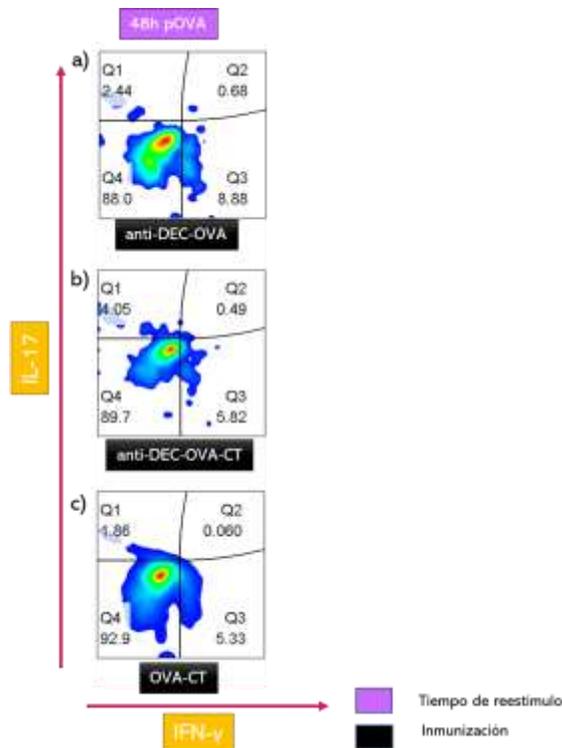


Figura 28. Evaluación de la expresión de IL-17 e IFN- γ en linfocitos murinos. Se muestran los *dot plots* representativos de IL-17 (eje de la y) contra IFN- γ (eje de la x) de células CD4⁺V β 5⁺CD45.1⁺ con las condiciones de inmunización de anti-DEC-OVA, anti-DEC-OVA-CT y OVA-CT a las 48 horas de reestímulo con el péptido de OVA. El cuartil 1 (Q1) corresponde al porcentaje de IL-17, mientras que el cuartil 3 (Q3) al porcentaje de IFN- γ .

El número de células Th1 y el porcentaje de diferenciación hacia este linaje se determinó por las células CD4⁺ productoras de IFN- γ , de este modo, se destacan 1,264 células Th1 con la inmunización con OVA-CT y solo 61 con la inmunización con anti-DEC-OVA-CT (**Figura 29a**). A pesar de que el porcentaje es similar en las condiciones de inmunización anti-DEC-OVA-CT (6.02%) y OVA-CT (5.41%) (**Figura 29b**), el número de células es muy bajo para anti-DEC-OVA-CT (61 eventos), la única condición que permite observar una buena cantidad de células (arriba de 100 eventos) en la condición de inmunización con OVA-CT.

El número de células y el porcentaje de diferenciación hacia Th17 se determinó por las células CD4⁺ productoras de IL-17, se observaron 430 células con la condición de inmunización con OVA-CT (**Figura 29c**), sin embargo, destaca un porcentaje de 3.95% de diferenciación de células Th17 con la condición de inmunización con anti-DEC-OVA-CT (**Figura 29d**), aunque el número de células para esta condición es solo de 40 eventos. Estos últimos datos sugieren que la inmunización con la proteína completa de ovoalbumina en combinación con la toxina del cólera como adyuvante (OVA-CT) es la mejor condición para evaluar las células Th1 y Th17 OVA-específicas.

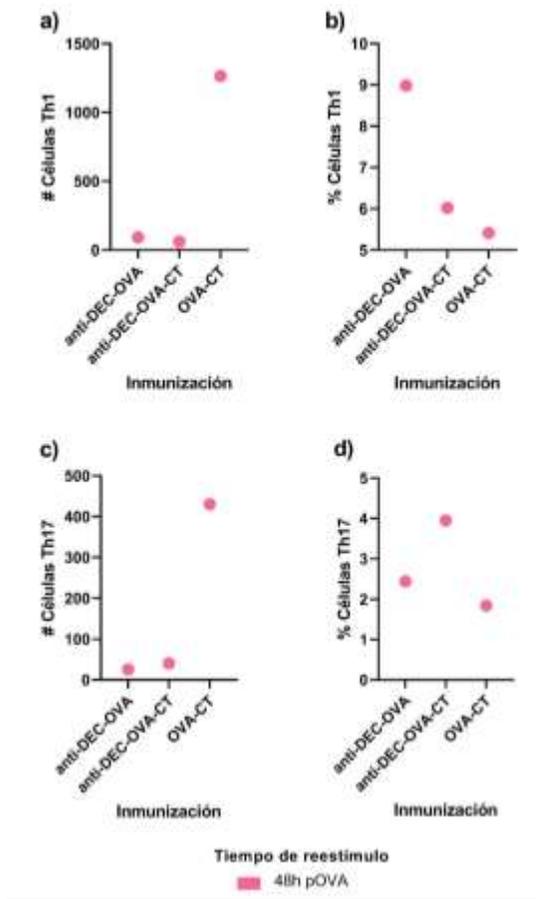


Figura 29. Número de células y porcentaje de linfocitos Th1 y Th17 diferenciados en un modelo murino *in vivo*. Gráficas representativas del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA CT y el reestímulo *in vitro* con el péptido de OVA durante 48 horas. **a)** Número de células Th1. **b)** Porcentaje de células Th1. **c)** Número de células Th17. **d)** Porcentaje de células Th17.

d) Comparación entre un reestímulo *in vitro* de 6 horas con PMA-Ionomicina, y 24 y 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT.

De acuerdo con los resultados del ensayo anterior, se decidió utilizar solo la inmunización con OVA-CT y debido a que se observó un porcentaje de diferenciación menor al 10% para ambos linajes (Th1 y Th17) con el adyuvante (CT)

a las 48 horas, se decidió probar diferentes tiempos de reestímulo para estandarizar las condiciones de reestimulación *in vitro*. Se comparó el reestímulo de 6 horas con PMA-IONO, contra 24 y 48 horas con el péptido de OVA. El reestímulo de PMA-Ionomicina se utilizó solo durante 6 horas ya que se ha observado en trabajos previos que la concentración usada (PMA (400 ng/ml) Ionomicina (40 ng/ml)) durante más de 16 horas promueve la muerte celular.

Para evaluar la población de linfocitos efectores de los linajes Th1 y Th17 diferenciados en este ensayo se siguió la misma estrategia de análisis que se muestra en la **Figura 17**.

Al analizar la viabilidad se observaron 200,224 eventos y un porcentaje de 58.5% con la condición de OVA-CT con el reestímulo de PMA-IONO a las 6 horas (**Figuras 30ab**). En las condiciones de 24 y 48 horas de reestímulo el número de células vivas corresponde a 110,000 y 165, 000 respectivamente, con un porcentaje de viabilidad alrededor del 20%.

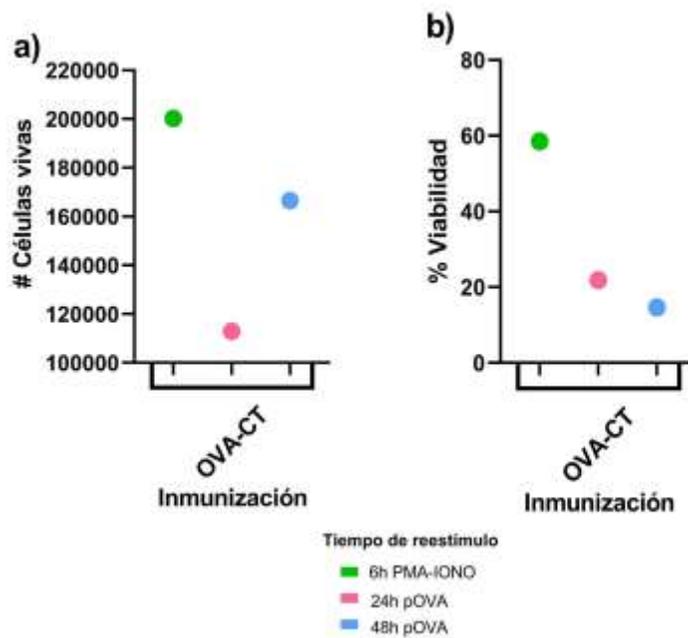


Figura 30. Viabilidad celular después del reestímulo *in vitro*. Gráficas de viabilidad del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con OVA-CT y el reestímulo *in vitro* se realizó en 3 tiempos (6, 24 y 48 horas) utilizando inicialmente a las 6 horas PMA-Ionomicina y a las 24 y 48 horas el péptido de OVA. **a)** Número de células vivas. **b)** Porcentaje de viabilidad.

Respecto a la cantidad de células $V\beta 5^+$ y $CD4^+$ se observaron 105,955 eventos para $V\beta 5^+$ y 52,864 eventos para $CD4^+$ con OVA-CT a las 48 horas reestimulando con pOVA (**Figura 31ab**). Las células OVA-específicas encontradas a 6 horas de reestímulo fueron 9,626 eventos, mientras que a las 24 horas se encontraron 6,148 eventos $V\beta 5^+$.

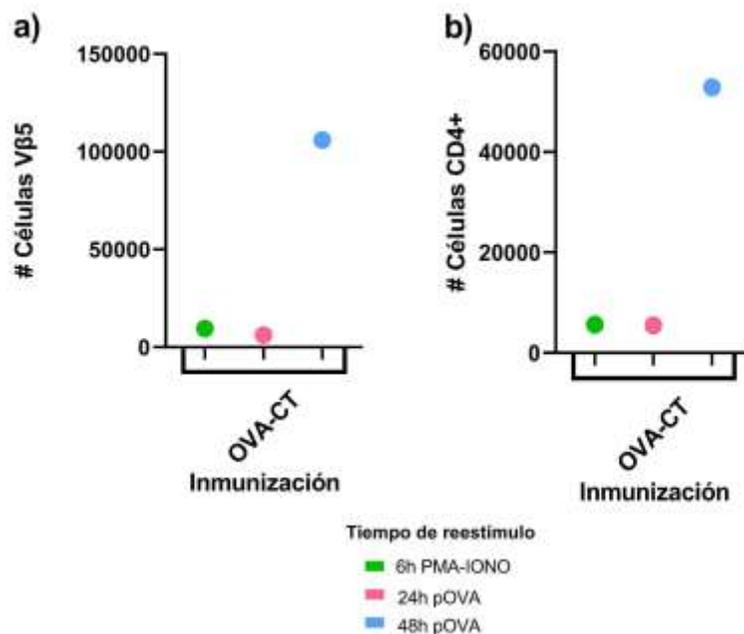


Figura 31. Número de células antígeno específicas Vβ5⁺ y CD4⁺ después del reestímulo *in vitro*. Gráficas del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con OVA-CT y el reestímulo *in vitro* se realizó en 3 tiempos (6, 24 y 48 horas) utilizando inicialmente a las 6 horas PMA-Ionomicina y a las 24 y 48 horas el péptido de OVA. **a)** Número de células Vβ5. **b)** Número de células CD4⁺.

A partir de las células vivas Vβ5⁺CD4⁺ se evaluó el porcentaje de células que expresaban IL-17 e IFN-γ a las 6 horas con PMA-IONO y a las 24 y 48 horas con pOVA con la inmunización con OVA-CT. En la **Figura 32** se muestran los *Dot plots* representativos donde se observó en el cuartil 1 (Q1) el porcentaje de células IL-17⁺ que corresponden a los linfocitos Th17, mientras que en el cuartil 3 (Q3) el porcentaje de células IFN-γ⁺ que corresponden a los linfocitos Th1.

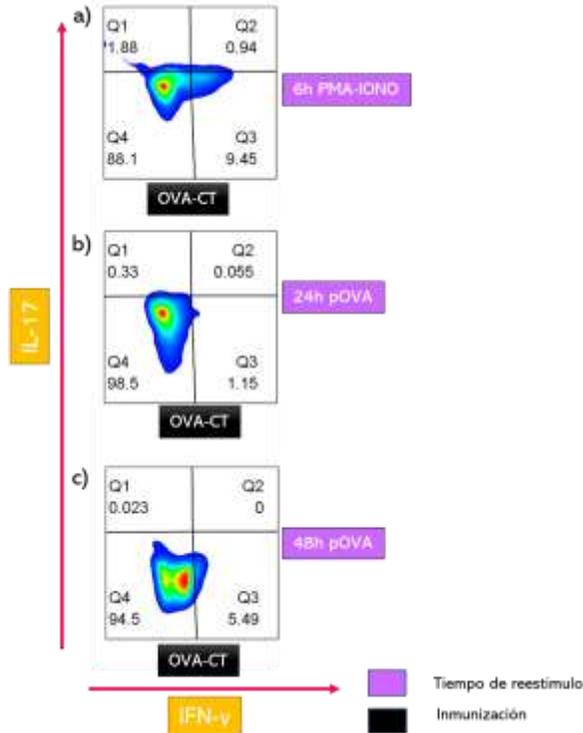


Figura 32. Evaluación de la expresión de IL-17 e IFN- γ en linfocitos murinos. Se muestran los *dot plots* representativos de IL-17 (eje de la y) contra IFN- γ (eje de la x) de células CD4⁺V β 5⁺CD45.1⁺ con la condición de inmunización de OVA-CT a las 6 horas de reestímulo con PMA-IONO y a las 24 y 48 horas de reestímulo con el péptido de OVA. El cuartil 1 (Q1) corresponde al porcentaje de IL-17, mientras que el cuartil 3 (Q3) al porcentaje de IFN- γ .

En cuanto a las células Th1 el número de células y porcentaje de diferenciación hacia este linaje se determinó por las células CD4⁺ productoras de IFN- γ , de este modo, se observaron 2,929 células para la combinación de inmunización OVA-CT a las 48 horas (**Figura 33a**). En cuanto al porcentaje de Th1 se observó 8.82% de diferenciación con la inmunización con OVA-CT a las 6 horas, el número de células obtenidas fue de 497 eventos, pero considerable para poder evaluar la diferenciación (**Figura 33b**). En las condiciones de reestímulo de 24 y 48 horas, el porcentaje de diferenciación es menor al 6%, a pesar de obtener un mayor número de eventos. En cuanto a las células Th17 el número de células y el porcentaje de

diferenciación hacia éstas se determinó por las células CD4⁺ productoras de IL-17, se observaron 122 eventos y 2.16% de diferenciación Th17 con el reestímulo de PMA-IONO a las 6 horas (**Figura 33cd**).

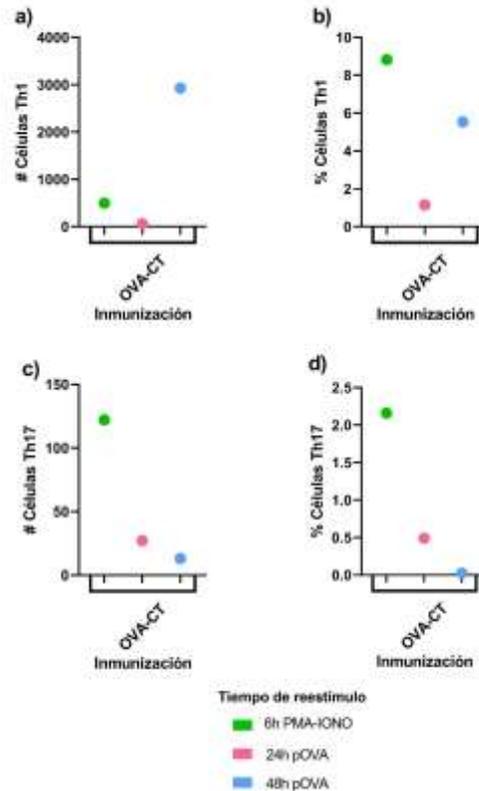


Figura 33. Número de células y porcentaje de linfocitos Th1 y Th17 diferenciados en un modelo murino *in vivo*. Gráficas representativas del ensayo de diferenciación en el que se inmunizó con OVA-CT y el reestímulo *in vitro* se realizó en 3 tiempos (6, 24 y 48 horas) utilizando inicialmente a las 6 horas PMA-Ionomicina y a las 24 y 48 horas el péptido de OVA. **a)** Número de células Th1. **b)** Porcentaje de células Th1. **c)** Número de células Th17. **d)** Porcentaje de células Th17.

Tabla 4. Resumen de resultados: número y porcentaje de eventos de cada condición de inmunización y de tiempo de reestímulo *in vitro* de cada ensayo realizado.

a) Comparación entre un reestímulo <i>in vitro</i> de 48 horas con el péptido de OVA y un doble reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA y además 6 horas con PMA-Ionomicina, inmunizando con PBS, OVA y OVA-CT.								
Condiciones de inmunización y tiempo de reestímulo <i>in vitro</i>	Células vivas		Células Vβ5 ⁺	Células CD4 ⁺	Células Th1		Células Th17	
	Número	Porcentaje	Número	Número	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
PBS 48h pOVA	56,316	92.9%	342	192	0	0	3	1.56%
PBS 48h pOVA+6h PMA-IONO	59,942	86.5%	251	43	0	0	0	0
OVA 48h pOVA	71,371	91.1%	514	346	0	0	1	0.29%
OVA 48h pOVA+6h PMA-IONO	107,557	92.2%	517	3	0	0	2	66.7%
OVA-CT 48h pOVA	108,013	86.5%	2667	2,570	117	4.55%	25	0.97%
OVA-CT 48h pOVA+6h PMA-IONO	79,552	87.6%	775	673	91	13.5%	5	0.74%
b) Comparación entre un reestímulo <i>in vitro</i> de 6 horas con PMA-Ionomicina y un reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA-CT.								
Condiciones de inmunización y tiempo de reestímulo <i>in vitro</i>	Células vivas		Células Vβ5 ⁺	Células CD4 ⁺	Células Th1		Células Th17	
	Número	Porcentaje	Número	Número	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
OVA-CT 6h PMA-IONO	11,521	85.4%	175	48	21	43.8%	7	14.6%
OVA-CT 48h pOVA	71,721	52.2%	857	558	55	9.86%	10	1.79%
anti-DEC-OVA 6h PMA-IONO	6,977	92.6%	90	32	11	34.4%	1	3.12%
anti-DEC-OVA 48h pOVA	17,312	39%	249	111	28	25.2%	6	5.41%
anti-DEC-OVA-CT 6h PMA-IONO	11,801	85.1%	219	68	19	27.9%	13	19.1%
anti-DEC-OVA-CT 48h pOVA	64,888	50%	840	408	38	9.31%	8	1.96%
c) Comparación entre un reestímulo <i>in vitro</i> de 48 horas con el péptido de OVA inmunizando con OVA-CT, anti-DEC-OVA y anti-DEC-OVA-CT.								
Condiciones de inmunización y tiempo de reestímulo <i>in vitro</i>	Células vivas		Células Vβ5 ⁺	Células CD4 ⁺	Células Th1		Células Th17	
	Número	Porcentaje	Número	Número	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
OVA-CT 48h pOVA	496,000	46.7%	33,827	23,381	1,264	5.41%	430	1.84%
anti-DEC-OVA 48h pOVA	302,121	28.8%	7,241	1,025	92	8.98%	25	2.44%
anti-DEC-OVA-CT 48H pOVA	189,000	54.4%	3,027	1,013	61	6.02%	40	3.95%
d) Comparación entre un reestímulo <i>in vitro</i> de 6 horas con PMA-Ionomicina, y 24 y 48 horas con el péptido de OVA, inmunizando con OVA-CT.								
Condiciones de inmunización y tiempo de reestímulo <i>in vitro</i>	Células vivas		Células Vβ5 ⁺	Células CD4 ⁺	Células Th1		Células Th17	
	Número	Porcentaje	Número	Número	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
OVA-CT 6h PMA-IONO	200,224	58.5%	9,623	5,638	497	8.82%	122	2.16%
OVA-CT 24h pOVA	112,999	21.8%	6,148	5,456	63	1.15%	27	0.49%
OVA-CT 48h pOVA	166,533	14.6%	105,955	52,864	2,929	5.54%	13	0.025%

10. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones para evaluar la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17 específicos para un antígeno en un modelo murino *in vivo*, ya que se pretende a futuro evaluar la respuesta de células T antígeno específicas en diferentes modelos murinos transgénicos con un gen *deletado* y con los cuales se cuentan en el laboratorio: como los ratones deficientes en la subunidad α de inhibina (inhibina $\alpha^{-/-}$) y ratones condicionales del receptor tipo III del TGF- β o betaglicano (dLCKCre/Flox), ambas proteínas han sido identificadas como importantes reguladores de la activación y diferenciación de las células T, sin embargo, no se ha elucidado completamente su función. Se fueron diseñando y realizando los experimentos de acuerdo con los resultados que se iban obteniendo con la finalidad de observar células Th1 y Th17 en un buen porcentaje (entre 2 y 15%) y en un número de linfocitos (que permitiera analizar con confiabilidad la población de interés, mayor a 100 eventos) para cada linaje y así establecer las condiciones ideales para la diferenciación de Th1 y Th17.

Dado el antecedente de la Dra. Laura Antonio (85), quien realizó un ensayo de diferenciación *in vivo* hacia linfocitos Th1 y Th17, empleando el sistema de antígeno dirigido a células dendríticas y utilizando la toxina del cólera como adyuvante, se probaron las condiciones de reestímulo *in vitro* utilizadas en su trabajo, de manera que se realizó un reestímulo *in vitro* durante 48 horas con el péptido de OVA y además se comparó con un segundo reestímulo con PMA-IONO durante 6 horas con las condiciones de inmunización de PBS, OVA y OVA-CT.

Los resultados de la Dra. Antonio fueron 7% de diferenciación para Th1 y 1% de diferenciación para Th17 (85), los cuales son muy diferentes a los que se obtuvieron en este trabajo, sin embargo, esto se debe a la diferencia de las células evaluadas, ya que la Dra. Antonio utilizó células CD4⁺ totales (linfocitos T de memoria y *naïves*) y en este trabajo se utilizaron únicamente células CD4⁺ *naïves*, lo cual, aunque con un porcentaje menor al de la Dra. Antonio, permitió tener la certeza de que el total de las células T CD4⁺ *naïves* que se transfirieron tendrían el potencial para diferenciarse en células Th1 y Th17.

No fue favorable realizar un doble reestímulo *in vitro* (48 horas con pOVA + 6 horas con PMA-IONO), ya que se observó una considerable disminución y ausencia de células. Por lo anterior se consideró que las células se sobreestimularon con un doble reestímulo y probablemente las células antígeno específicas que estaban sobreactivadas murieron. Por el contrario, en aquellas células donde se realizó un único reestímulo *in vitro* con el péptido de OVA se observó mayor número de células. Se puede concluir que fue efectivo el uso del adyuvante CT porque no se observa diferenciación sin éste para el subtipo Th1.

Debido al hallazgo en el ensayo anterior donde se realizó un doble reestímulo *in vitro* (48 horas con pOVA + 6 horas con PMA-IONO) para la diferenciación hacia Th1 y Th17 donde se dificultó observar las células diferenciadas ya que probablemente murieron, se decidió emplear el modelo de direccionamiento específico y dirigido al antígeno revisado por la Dra. Juliana Idoyaga, el cual demuestra que la administración de antígenos dirigida a los receptores de células dendríticas realizado *in vivo* mejora la eficiencia de la presentación del antígeno al

linfocito T (87). De esta forma, se decidió utilizar el anticuerpo modificado anti-DEC-OVA dirigido hacia el receptor DEC-205 de las células dendríticas.

En trabajos previos de la Dra. Marisol de la Fuente (93), se realizó una diferenciación antígeno específica *in vivo* de linfocitos T hacia el fenotipo regulador FoxP3⁺ utilizando ratones inhibina $\alpha^{-/-}$ e inhibina $\alpha^{+/+}$ y empleando el sistema de direccionamiento del antígeno con anti-DEC-205-OVA en presencia o ausencia de CT como adyuvante. Aunque en este trabajo no se utilizó el modelo murino inhibina $\alpha^{-/-}$ y tampoco se realizó la diferenciación de linfocitos hacia el fenotipo regulador FoxP3⁺, este trabajo sirvió como base para la planeación y realización de los experimentos debido a las similitudes entre los estudios. En su trabajo, la Dra. de la Fuente encontró que transfiriendo 4×10^6 células CD4⁺CD25⁻V β 5.1⁺CD45.1⁺ (OVA-específicas) a un ratón WT, solo se pudieron detectar 15×10^5 células CD4⁺V β 5.1⁺ para la inmunización con OVA-CT, 1×10^4 células CD4⁺V β 5.1⁺ para la inmunización con anti-DEC-OVA y 6×10^4 células CD4⁺V β 5.1⁺ para la inmunización con anti-DEC-OVA-CT. Los resultados anteriores contrastan con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se detectó menor cantidad de células, esto se puede relacionar con la menor cantidad de células CD4⁺CD25⁻V β 5.1⁺CD45.1⁺ transferidas (4×10^6 vs 3×10^6) además de los pozos en los que se repartieron las células CD4⁺CD45.1⁺ de los ratones al realizar el reestímulo *in vitro*, por lo cual las células totales de cada ratón se dividieron en 2 pozos ya que se realizaron dos tiempos de reestímulo, uno durante 6 horas reestimulando con PMA-Ionomicina y otro durante 48 horas reestimulando con el péptido de OVA, esto propició que se haya encontrado una menor cantidad de células en comparación con las que reportó la Dra. de la Fuente.

Debido a que en los resultados anteriores se observó mayor diferenciación de células hacia Th1 y Th17 con el reestímulo *in vitro* del péptido de OVA durante 48 horas en las distintas condiciones de inmunización (OVA-CT, anti-DEC-OVA, anti-DEC-OVA-CT), se decidió continuar con esta condición de tiempo de reestímulo *in vitro* con la finalidad de corroborar el dato anteriormente mencionado y determinar si este reestímulo sería el ideal para observar la diferenciación de ambos linajes efectores. Por lo tanto, para este ensayo se utilizaron las mismas condiciones de inmunización que se utilizaron en el ensayo anterior y la condición de reestímulo *in vitro* de 48 horas con el péptido de OVA.

La diferencia de los resultados de este ensayo y de los anteriores se puede atribuir al hecho de que durante este ensayo no se dividieron las células en varios pozos ya que se realizó un único tiempo de reestímulo *in vitro* durante 48 horas con el péptido de OVA, lo que permitió observar más células vivas, más células OVA-específicas y por ende mayor cantidad de células Th1 y Th17 diferenciadas. Sin embargo, aunque se pudo observar mayor cantidad de células, los porcentajes que se obtuvieron no fueron los óptimos para ambos linajes Th1 y Th17 con el adyuvante (CT) a las 48 horas, lo que indicó que esta condición de tiempo de reestímulo *in vitro* no era la ideal para observar de forma óptima la diferenciación de ambos linajes Th1 y Th17. Se ha reportado la diferenciación *in vivo* de linfocitos hacia los linajes efectores Th1 y Th17 específicos de OVA donde se ha observado hasta un 9% de células CD4⁺T-bet⁺Th1⁺, y hasta un 6% de células CD4⁺RORγt⁺Th17⁺ en bazos de ratones inmunizados con OVA, los porcentajes corresponden a un ensayo donde

se utilizó un modelo de ratón inmunizado con OVA para evaluar los efectos del timol en la generación *in vivo* de Tregs en respuesta a un antígeno específico (98), lo cual sirvió de referencia para saber el porcentaje aproximado de diferenciación que se esperaba observar en estos ensayos.

De acuerdo con los resultados, la proteína completa de OVA en combinación con la toxina del cólera (OVA-CT) como adyuvante fue la mejor condición de inmunización para evaluar las células Th1 y Th17 OVA-específicas. No se observaron los resultados esperados con el empleo del sistema antígeno específico dirigido a través del anti-DEC-OVA. La Dra. Antonio (85) reportó 5×10^3 y 5% de células antígeno específicas IFN- γ^+ con la inmunización con anti-DEC-OVA-CTB y con un reestímulo de 48 horas con el péptido de OVA, resultados que son mucho mayores en comparación los que se obtuvieron en este trabajo. Además, la Dra. Antonio reportó 4×10^3 y 3% de células antígeno específicas IL-17 $^+$ con la inmunización con anti-DEC-OVA-CTB, resultados también mayores en comparación con los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, los ensayos de la Dra. Antonio difieren en el tipo de adyuvante utilizado, ya que ella utilizó la subunidad B de la toxina del cólera, y el tipo de células transferidas, ya que ella utilizó células CD4 totales, mientras que en este trabajo se utilizó la toxina del cólera completa y se transfirieron células T *naïve*.

Para el último ensayo se utilizó únicamente OVA-CT como condición de inmunización ya que en datos anteriores se observó abundancia de células OVA-específicas con OVA-CT que con las demás condiciones. Además, para el tiempo de reestímulo *in vitro* se decidió evaluar el reestímulo a las 6 horas con PMA-IONO

y a las 24 y 48 horas con el péptido de OVA para determinar las mejores condiciones. De acuerdo con los resultados, teniendo en cuenta que el objetivo de este trabajo siempre fue observar una buena cantidad y porcentaje de células, la inmunización con OVA-CT durante 6 horas de reestímulo *in vitro* con PMA-IONO permite obtener una considerable cantidad de células y un notable porcentaje para así poder evaluar la diferenciación de Th1 y Th17.

Por lo tanto, las mejores condiciones de este estudio para evaluar la diferenciación de células Th1 y Th17 OVA específicas fueron: inmunización con la proteína completa de OVA, utilizando como adyuvante la toxina completa del cólera, y evaluando la diferenciación en linfonodos de drenaje con un reestímulo *in vitro* 7 días después, usando PMA-Ionomicina durante 6 horas (**Figura 34**). Estas condiciones podrán ser utilizadas para poder elucidar el papel que tienen proteínas de la superfamilia del TGF- β en la diferenciación de células T efectoras. En trabajos anteriores de la Dra. Soldevila se demostró que las inhibinas y el betaglicano tienen un papel importante en la diferenciación hacia células T reguladoras (97) (104), y recientemente se ha demostrado *in vitro* que las inhibinas y el betaglicano regulan la diferenciación Th1/Th17, ya que aislando células T *naïve* deficientes de estas proteínas y cultivándolas bajo las condiciones polarizantes necesarias, se afecta la diferenciación. Sin embargo, es necesario evaluar qué ocurre en modelos *in vivo*, realizando transferencia adoptiva de células deficientes de inhibinas o de betaglicano, que además sean específicas para un antígeno (OT-II), a ratones congénicos (CD45.1) que permitan rastrear las células transferidas.

Este protocolo logró establecer las condiciones de diferenciación de células T OVA-específicas *in vivo* por transferencia adoptiva, a partir de células T *naïves*, a diferencia de otros trabajos donde las células T transferidas son células T totales (mezcla de varios subtipos de linfocitos T) que podrían enmascarar una diferenciación *de novo* (84) (85) (87). El modelo propuesto es de transferencia adoptiva, donde las únicas células que son antígeno específicas son las células T *naïve* transferidas, por lo tanto, el reconocimiento de la OVA lo realizarán solo estas células, esto permite estudiar de manera aislada a los linfocitos T, pero en un ambiente inflamatorio *in vivo*. La mayoría de los trabajos de respuesta antígeno específica se realizan en el ratón transgénico directamente, donde la modificación de los genes de las cadenas del TCR seguramente afectarán la respuesta general del ratón, y no sólo la respuesta de los linfocitos T (105). Para lograr rastrear las células transferidas es muy importante el uso de ratones congénicos, como los CD45.1, lo cual facilita el análisis de las células transferidas, a diferencia de ensayos donde las células transferidas se marcan con moléculas fluorescentes para poder rastrearlas o donde se usan células reporteras con genes de proteínas fluorescentes (GFP, RFP) que pueden perder la marca fluorescente durante los procedimientos (105) (106).

Otra novedad del modelo propuesto es el uso de la toxina del cólera completa como adyuvante, a diferencia de otros estudios, en los cuales se utiliza solo la subunidad no patógena (beta) de la toxina (85) (96). El uso de la proteína completa da la ventaja de promover una respuesta inmune más robusta y las dosis utilizadas por la vía de administración intradérmica no son tóxicas.

El establecimiento de modelos murinos que permitan evaluar la respuesta a un antígeno no solo es importante para entender el funcionamiento de proteínas clave de la respuesta inmune, sino también para entender la respuesta inmune hacia diferentes microorganismos y para el desarrollo de vacunas. En concreto, la reciente pandemia ha exigido el desarrollo rápido de nuevas vacunas que requieren ser evaluadas en ensayos preclínicos, la mayoría utilizando modelos murinos (107).

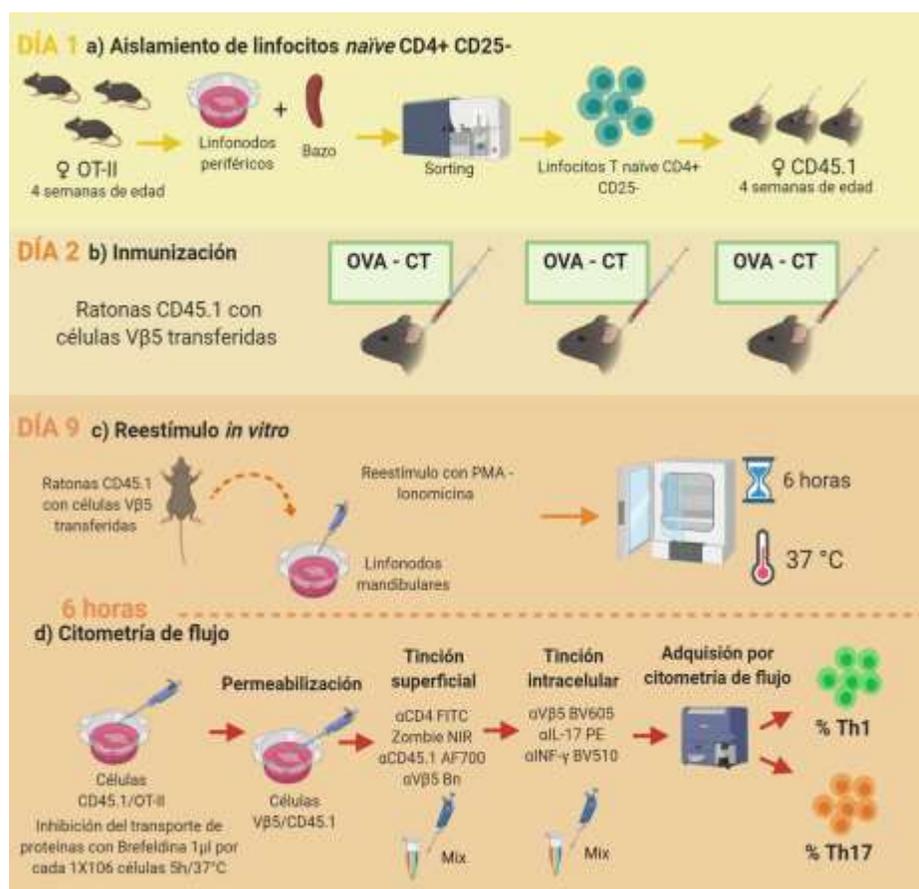


Figura 34. Resumen de resultados de un modelo murino *in vivo* para la evaluación de linfocitos T efectores Th1 y Th17 con un antígeno específico dirigido. En el esquema se muestran las condiciones de inmunización y reestímulo *in vitro* establecidas para realizar la diferenciación de linfocitos T efectores Th1 y Th17, esto es, inmunización con OVA-CT y 6 horas de reestímulo *in vitro* utilizando PMA-Ionomicina.

11. CONCLUSIONES

Conclusiones generales

- La mejor condición de inmunización que nos permitió observar un buen número de células OVA-específicas, así como porcentaje de diferenciación adecuado hacia ambos linajes de linfocitos efectores Th1 y Th17 fue el uso de la proteína completa de OVA y la toxina del cólera como adyuvante (OVA-CT).
- La mejor condición de reestímulo *in vitro* que nos permitió observar un buen número de células antígeno específicas, así como porcentaje de diferenciación óptimo hacia ambos linajes de linfocitos efectores Th1 y Th17 fue el estímulo de 6 horas con PMA-Ionomicina.

Conclusión final

Con base en nuestros resultados se propone que los experimentos de diferenciación de linfocitos Th1 y Th17 *in vivo* que se realizarán con ratones transgénicos con un gen *deletado* como los ratones deficientes en la subunidad α de inhibina (inhibina $\alpha^{-/-}$) y ratones condicionales de betaglicano (dLCKCre/Flox), se lleven a cabo con las siguientes condiciones: inmunización con OVA-CT y 6 horas de reestímulo *in vitro* con PMA-Ionomicina.

12. PERSPECTIVAS

1. Realizar la optimización de la diferenciación *in vivo* con el sistema antígeno específico dirigido anti-DEC-OVA.
2. Evaluar la diferenciación de linfocitos T efectores Th1 y Th17 *in vivo* en ratones deficientes en la subunidad α de inhibina (inhibina $\alpha^{-/-}$).
3. Evaluar la diferenciación de linfocitos T efectores Th1 y Th17 *in vivo* en ratones de delección condicional del receptor tipo III del TGF- β (betaglicano).

13. REFERENCIAS

1. Hedayat KM, Lapraz JC. Immunity. The Theory of Endobiogeny: Elsevier; 2019. p. 25-48.
2. Snyder PW. Diseases of Immunity. Pathologic Basis of Veterinary Disease 2017. p. 242-85. e5.
3. Chaplin DD. Overview of the human immune response. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(2 Suppl Mini-Primer): S430-5.
4. Medina KL. Overview of the immune system. Handb Clin Neurol. 2016; 133:61-76.
5. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy Asthma Clin Immunol. 2018;14(Suppl 2):49.
6. Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. Curr Opin Immunol. 2013;25(1):1-3.
7. Kaur BP, Secord E. Innate Immunity. Pediatr Clin North Am. 2019;66(5):905-11.
8. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. Cell Host Microbe. 2019;25(1):13-26.
9. Riera Romo M, Perez-Martinez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. Immunology. 2016;148(2):125-39.
10. Herwald H, Egesten A. On PAMPs and DAMPs. J Innate Immun. 2016;8(5):427-8.
11. Koenderman L, Buurman W, Daha MR. The innate immune response. Immunol Lett. 2014;162(2 Pt B):95-102.
12. Boehm T, Swann JB. Origin and evolution of adaptive immunity. Annu Rev Anim Biosci. 2014; 2:259-83.
13. Moran AE, Hogquist KA. T-cell receptor affinity in thymic development. Immunology. 2012;135(4):261-7.
14. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Berga-Bolanos R. Transcription factors and target genes of pre-TCR signaling. Cell Mol Life Sci. 2015;72(12):2305-21.

15. Rezzani R, Nardo L, Favero G, Peroni M, Rodella LF. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. *Age (Dordr)*. 2014;36(1):313-51.
16. Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):504-14.
17. Dzhagalov I, Phee H. How to find your way through the thymus: a practical guide for aspiring T cells. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(5):663-82.
18. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):309-22.
19. James KD, Jenkinson WE, Anderson G. T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go? *J Leukoc Biol*. 2018;104(2):275-84.
20. Koch U, Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011; 27:539-62.
21. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(9):721-5.
22. Heath RW, Carbone F. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature Reviews*. 2001; 1:126-35.
23. Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, Liese J, Blair DA, Waite J, *et al*. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28:79-105.
24. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(2):89-103.
25. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(12):823-36.
26. Turley SJ, Fletcher AL, Elpek KG. The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):813-25.
27. Guy CS, Vignali KM, Temirov J, Bettini ML, Overacre AE, Smeltzer M, *et al*. Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat Immunol*. 2013;14(3):262-70.

28. Love PE, Hayes SM. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(6):a002485.
29. Gaud G, Lesourne R, Love PE. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(8):485-97.
30. Macián FG, C. F. Hyeog, S. I. Horton, H. F. Byrne, M. C. Rao, A. Transcriptional Mechanisms Underlying Lymphocyte Tolerance. *Cell Press.* 2002; 109:719–31.
31. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity.* 2013;38(1):13-25.
32. Delves PJR. The Immune System. *The New England Journal of Medicine.* 2000; 343:108-17.
33. Li PS, R. Liao, W. Leonard, W. J. Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells. *Immunological Reviews.* 2014; 261:141-56.
34. Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(7):634-43.
35. Palmer DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol.* 2009;30(12):592-602.
36. O’Shea JJP. Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. *Science.* 2010; 327:1098-102.
37. DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(3):149-63.
38. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol.* 2010; 28:445-89.
39. Kane A, Deenick EK, Ma CS, Cook MC, Uzel G, Tangye SG. STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Curr Opin Immunol.* 2014; 28:49-57.
40. Adamson AS, Collins K, Laurence A, O’Shea JJ. The Current STATus of lymphocyte signaling: new roles for old players. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(2):161-6.

41. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646-55.
42. Ivanova EA, Orekhov AN. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:327470.
43. Hegazy AN, Peine M, Helmstetter C, Panse I, Frohlich A, Bergthaler A, *et al.* Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+) T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity*. 2010;32(1):116-28.
44. Agaloti T, Villablanca EJ, Huber S, Gagliani N. TH17 cell plasticity: The role of dendritic cells and molecular mechanisms. *J Autoimmun*. 2018; 87:50-60.
45. Hirahara K, Vahedi G, Ghoreschi K, Yang XP, Nakayama S, Kanno Y, *et al.* Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. *Immunology*. 2011;134(3):235-45.
46. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*. 2009;10(6):595-602.
47. Jameson SC, Masopust D. What Is the Predictive Value of Animal Models for Vaccine Efficacy in Humans? Reevaluating the Potential of Mouse Models for the Human Immune System. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4).
48. Tripp RA, Tompkins SM. Animal models for evaluation of influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009; 333:397-412.
49. Kiros TG, Levast B, Auray G, Strom S, van Kessel J, Gerdt V. The Importance of Animal Models in the Development of Vaccines. *Innovation in Vaccinology 2012*. p. 251-64.
50. Cardona PJ, Williams A. Experimental animal modelling for TB vaccine development. *Int J Infect Dis*. 2017; 56:268-73.
51. Shankar K, Mehendale HM. Transgenic Animals. *Encyclopedia of Toxicology 2014*. p. 802-3.

52. Kumar TR, Larson M, Wang H, McDermott J, Bronshteyn I. Transgenic mouse technology: principles and methods. *Methods Mol Biol.* 2009; 590:335-62.
53. Zuberi A, Lutz C. Mouse Models for Drug Discovery. Can New Tools and Technology Improve Translational Power? *ILAR J.* 2016;57(2):178-85.
54. Gerds VD, v. S. Hurk, v. L. Griebel, P. J. Babiuk, L. A. Use of animals models in the development of human vaccines. *Future Microbiol.* 2007; 2:667-75.
55. Gerds V, Wilson HL, Meurens F, van Drunen Littel-van den Hurk S, Wilson D, Walker S, *et al.* Large animal models for vaccine development and testing. *ILAR J.* 2015;56(1):53-62.
56. Ota T, Doyle-Cooper C, Cooper AB, Doores KJ, Aoki-Ota M, Le K, *et al.* B cells from knock-in mice expressing broadly neutralizing HIV antibody b12 carry an innocuous B cell receptor responsive to HIV vaccine candidates. *J Immunol.* 2013;191(6):3179-85.
57. Agmon-Levin N, Arango MT, Kivity S, Katzav A, Gilburd B, Blank M, *et al.* Immunization with hepatitis B vaccine accelerates SLE-like disease in a murine model. *J Autoimmun.* 2014; 54:21-32.
58. Dragunsky EN, T. Karpinski, K. Furesz, J. Wood, D. J. Perikov, Y. Abe, S. Kurata, T. Vanlooche, O. Karganova, G. Taffs, R. Heath, A. Ivshina, A. Levenbook, I. Transgenic mice as an alternative to monkeys for neurovirulence testing of live oral poliovirus vaccine: validation by a WHO collaborative study. *Bulletin of the World Health Organization.* 2003; 81:251-60.
59. Phaswana PH, Ndumnego OC, Koehler SM, Beyer W, Crafford JE, van Heerden H. Use of the mice passive protection test to evaluate the humoral response in goats vaccinated with Sterne 34F2 live spore vaccine. *Vet Res.* 2017;48(1):46.
60. Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, Nair S, McCune BT, Yu J, *et al.* SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1327-35.

61. Higginson EE, Simon R, Tennant SM. Animal Models for Salmonellosis: Applications in Vaccine Research. *Clin Vaccine Immunol.* 2016;23(9):746-56.
62. Zhang L, Udaka K, Mamitsuka H, Zhu S. Toward more accurate pan-specific MHC-peptide binding prediction: a review of current methods and tools. *Brief Bioinform.* 2012;13(3):350-64.
63. Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk HD, Volkmer-Engert R, *et al.* Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol.* 2004;65(5):523-36.
64. Gori A, Longhi R, Peri C, Colombo G. Peptides for immunological purposes: design, strategies and applications. *Amino Acids.* 2013;45(2):257-68.
65. Leung S, Smith D, Myc A, Morry J, Baker JR, Jr. OT-II TCR transgenic mice fail to produce anti-ovalbumin antibodies upon vaccination. *Cell Immunol.* 2013;282(2):79-84.
66. Miyagawa F, Gutermuth J, Zhang H, Katz SI. The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance. *J Autoimmun.* 2010;35(3):192-8.
67. Li Y, Frei AW, Yang EY, Labrada-Miravet I, Sun C, Rong Y, *et al.* In Vitro Platform Establishes Antigen-Specific CD8+ T Cell Cytotoxicity to Encapsulated Cells via Indirect Antigen Recognition. 2019.
68. Braaten DC, Sparks-Thissen RL, Kreher S, Speck SH, Virgin HWt. An optimized CD8+ T-cell response controls productive and latent gammaherpesvirus infection. *J Virol.* 2005;79(4):2573-83.
69. Derkow K, Loddenkemper C, Mintern J, Kruse N, Klugewitz K, Berg T, *et al.* Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. *Hepatology.* 2007;46(4):1155-65.
70. Papatriantafyllou M. T cells: TCR affinity goes asymmetric. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(12):809.
71. Shiner EK, Holbrook BC, Alexander-Miller MA. CD4+ T cell subset differentiation and avidity setpoint are dictated by the interplay of cytokine and antigen mediated signals. *PLoS One.* 2014;9(6):e100175.

- 72.** Toribio-Fernandez R, Zorita V, Herrero-Fernandez B, Gonzalez-Granado JM. An In Vivo Mouse Model to Measure Naive CD4 T Cell Activation, Proliferation and Th1 Differentiation Induced by Bone Marrow-derived Dendritic Cells. *J Vis Exp.* 2018(138).
- 73.** Mattsson J, Schon K, Ekman L, Fahlen-Yrlid L, Yrlid U, Lycke NY. Cholera toxin adjuvant promotes a balanced Th1/Th2/Th17 response independently of IL-12 and IL-17 by acting on G α in CD11b (+) DCs. *Mucosal Immunol.* 2015;8(4):815-27.
- 74.** Ben-Nun A, Kaushansky N, Kawakami N, Krishnamoorthy G, Berer K, Liblau R, *et al.* From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun.* 2014; 54:33-50.
- 75.** Croxford AL, Kurschus FC, Waisman A. Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(2):177-83.
- 76.** Delarasse C, Daubas P, Mars LT, Vizler C, Litzemberger T, Iglesias A, *et al.* Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2003;112(4):544-53.
- 77.** Marin N, Mecha M, Espejo C, Mestre L, Eixarch H, Montalban X, *et al.* Regulatory lymphocytes are key factors in MHC-independent resistance to EAE. *J Immunol Res.* 2014; 2014:156380.
- 78.** Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Lington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med.* 2003;197(9):1073-81.
- 79.** Torre-Fuentes L, Moreno-Jimenez L, Pytel V, Matias-Guiu JA, Gomez-Pinedo U, Matias-Guiu J. Experimental models of demyelination and remyelination. *Neurologia (Engl Ed).* 2020;35(1):32-9.
- 80.** Lesterhuis WJ, Aarntzen EH, De Vries IJ, Schuurhuis DH, Figdor CG, Adema GJ, *et al.* Dendritic cell vaccines in melanoma: from promise to proof? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;66(2):118-34.

81. Romani N, Flacher V, Tripp CH, Sparber F, Ebner S, Stoitzner P. Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012; 351:113-38.
82. Macri C, Dumont C, Johnston AP, Mintern JD. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin Transl Immunology.* 2016;5(3):e66.
83. Apostolopoulos V, Thalhammer T, Tzakos AG, Stojanovska L. Targeting antigens to dendritic cell receptors for vaccine development. *J Drug Deliv.* 2013; 2013:869718.
84. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, *et al.* *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med.* 2004;199(6):815-24.
85. Antonio-Herrera L, Badillo-Godinez O, Medina-Contreras O, Tepale-Segura A, Garcia-Lozano A, Gutierrez-Xicotencatl L, *et al.* The Nontoxic Cholera B Subunit Is a Potent Adjuvant for Intradermal DC-Targeted Vaccination. *Front Immunol.* 2018; 9:2212.
86. Fehres CM, Duinkerken S, Bruijns SC, Kalay H, van Vliet SJ, Ambrosini M, *et al.* Langerin-mediated internalization of a modified peptide routes antigens to early endosomes and enhances cross-presentation by human Langerhans cells. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(4):360-70.
87. Idoyaga J, Cheong C, Suda K, Suda N, Kim JY, Lee H, *et al.* Cutting edge: langerin/CD207 receptor on dendritic cells mediates efficient antigen presentation on MHC I and II products *in vivo*. *J Immunol.* 2008;180(6):3647-50.
88. Donnelly RF. Vaccine delivery systems. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(1):17-8.
89. Scherließ R. Delivery of antigens used for vaccination: recent advances and challenges. *Therapeutic Delivery.* 2011;2 (10):1351–68.
90. Wallis J, Shenton DP, Carlisle RC. Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies. *Clin Exp Immunol.* 2019;196(2):189-204.

91. Fiege J, Block K, Pierson M, Hamilton S, Masopust D, Langlois R. Mice with diverse microbial exposure histories as a model for preclinical vaccine testing. *Cell Press*. 2021:1-13.
92. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):121-33.
93. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2002;196(12):1627-38.
94. Datta SK, Sabet M, Nguyen KP, Valdez PA, Gonzalez-Navajas JM, Islam S, *et al*. Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(23):10638-43.
95. Eriksson K, Fredriksson M, Nordstrom I, Holmgren J. Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. *Infect Immun*. 2003;71(4):1740-7.
96. Meza-Sanchez D, Perez-Montesinos G, Sanchez-Garcia J, Moreno J, Bonifaz LC. Intradermal immunization in the ear with cholera toxin and its non-toxic beta subunit promotes efficient Th1 and Th17 differentiation dependent on migrating DCs. *Eur J Immunol*. 2011;41(10):2894-904.
97. de la Fuente-Granada M, Olguin-Alor R, Ortega-Francisco S, Bonifaz LC, Soldevila G. Inhibins regulate peripheral regulatory T cell induction through modulation of dendritic cell function. *FEBS Open Bio*. 2019;9(1):137-47.
98. Matzuk MM, *et al*. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature*. 1992:313-9.
99. Matzuk MM, *et al*. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:8817-21.
100. Robertson JM, Jensen PE, Evavold BD. DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol*. 2000;164(9):4706-12.

- 101.** Chisolm DA, Cheng W, Colburn SA, Silva-Sanchez A, Meza-Perez S, Randall TD, *et al.* Defining Genetic Variation in Widely Used Congenic and Backcrossed Mouse Models Reveals Varied Regulation of Genes Important for Immune Responses. *Immunity*. 2019;51(1):155-68 e5.
- 102.** Namdari H, Izad M, Rezaei F, Amirghofran Z. Thymol as a reciprocal regulator of T cell differentiation: Promotion of regulatory T cells and suppression of Th1/Th17 cells. *Int Immunopharmacol*. 2019; 67:417-26.
- 103.** Hawley TH, Hawley RG. *Flow Cytometry Protocols*. 3rd edition: Humana Press; 2011.
- 104.** Ortega-Francisco S, de la Fuente-Granada M, Alvarez Salazar EK, Bolanos-Castro LA, Fonseca-Camarillo G, Olguin-Alor R, *et al.* TbetaRIII is induced by TCR signaling and downregulated in FoxP3(+) regulatory T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;494(1-2):82-7.
- 105.** Ersek B, Lupsa N, Pocza P, Toth A, Horvath A, Molnar V, *et al.* Unique patterns of CD8+ T-cell-mediated organ damage in the Act-mOVA/OT-I model of acute graft-versus-host disease. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(20):3935-47.
- 106.** Loos J, Schmaul S, Noll TM, Paterka M, Schillner M, Loffel JT, *et al.* Functional characteristics of Th1, Th17, and ex-Th17 cells in EAE revealed by intravital two-photon microscopy. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):357.
- 107.** Kim E, Erdos G, Huang S, Kenniston TW, Balmert SC, Carey CD, *et al.* Microneedle array delivered recombinant coronavirus vaccines: Immunogenicity and rapid translational development. *EBioMedicine*. 2020; 55:102743.