



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Generación de un modelo *in vivo* de agotamiento de
células T en ratones CD1 usando un pellet**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

PRESENTA:

CESCIDD REYES ANTONIO

DIRECTOR: M. en C. Rosalva Rangel Corona.

ASESOR: Dr. Leonardo Trujillo Cirilo.

ASESOR: M. en C. Reynalda Roldán Pérez.



CIUDAD DE MÉXICO

31 DE JULIO DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

Agradezco mis docentes que han sido parte de mi camino al largo de mi carrera, que me han enseñado todo lo que conozco. Agradezco a M. en C. Carlos Adrián Vargas Ángeles, quién hizo posible que esta tesis se lograra, por su dedicación y su paciencia. A la M. en C. Guadalupe Gómez García por ayudarme con toda su paciencia y por sus consejos para sacar adelante los resultados de este trabajo. Al Dr. Leonardo Trujillo, por su tiempo y guía para corregirme para poder mejorar. Agradezco a la Dra. Rosalva Rangel Corona por permitirme entrar al laboratorio de Oncología celular y cáncer, mi segundo hogar.

Agradezco a mis compañeros y amigos que me han mostrado la felicidad de seguir en la carrera y el apoyo para terminar esta tesis. A Nancy, Jesús, María Guadalupe, Isaac, Carlos Adán, Miguel, Ana, Amaury, Zulema por permitirlos conocer en la carrera, darme consejos y ánimos para titularme. A Andrea Daniela por todos estos años, donde jamás pensamos volver a vernos en la misma clase.

Agradezco a mi madre y hermanos por darme fuerzas para seguir adelante. A mi gato Coco, por su peluda existencia.

Agradezco a la universidad que me ha exigido dar lo mejor de mi y el haberme permitido obtener toda la experiencia obtenida en mi trayecto académico.

Dedicatoria.

A Sara, por el sueño de las dos. "Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora." Eclesiastés 3:1-8.

Índice

Resumen.....	6
Introducción.....	7
Marco teórico.....	8
Inmunología e inflamación.....	8
Linfocitos T.....	9
Citocinas en la inflamación.....	11
Inflamación aguda y crónica.....	16
Estudio del agotamiento de células T.....	18
Pellet de algodón como inductor de inflamación crónica... 22	
Planteamiento del problema y pregunta de investigación.....	25
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	26
Material y método	26
Diseño de estudio.....	26
Variables.....	26
Metodología.....	27
Resultados.....	29
Determinación indirecta de linfocitos infiltrados en los pellets después del proceso de inflamación.....	29
Células T positivas a CD8 (cuantificación por citómetro de flujo).....	30
Citocinas pro y antiinflamatorias (cuantificación por citómetro de flujo).....	32

Discusión de resultados.....	39
Conclusiones.....	42
Perspectivas.....	42
Financiamiento.....	42
Bibliografía.....	43

Resumen: La inflamación es una respuesta de los organismos a diferentes agresiones, tanto endógenas como exógenas, y según el tiempo de evolución, puede ser aguda o crónica. La inflamación crónica ocurre cuando no se ha eliminado el agente patógeno del organismo después de un periodo de tiempo prolongado, ocasionando un síndrome de disminución de células T $CD8^+$. Durante años, para entender este fenómeno, se han publicado una serie de trabajos sobre el estudio del síndrome de agotamiento de células T $CD8^+$ *in vitro*, por lo que el propósito de este trabajo fue analizar la expresión del receptor $CD8^+$ en linfocitos de sangre periférica y citocinas pro y antiinflamatorias para generar un modelo de agotamiento *in vivo* de linfocitos T en ratones CD1 usando pellet de algodón. Se indujo coloco un pellet de algodón de 10 mg de peso en diferentes grupos para inducir inflamación (5, 10, 15, 20 y 30 días). Posteriormente se sacrificaron, se separaron los linfocitos y se procedió a marcar con anticuerpo conjugado con CD8. Del plasma obtenido se marcaron con anticuerpos para citocinas pro y antiinflamatorias mediante el *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit*. Los resultados de infiltración y conteo de células T positivas a CD8 aparentemente se comportan con lo establecido en agotamiento, sin embargo, en la cuantificación de citocinas pro y antiinflamatorias no se encontró similitudes con el fenómeno de agotamiento. Entre los grupos experimentales no hubo diferencia estadística entre sí, por lo que consideramos que el modelo de inflamación por pellet de algodón no es un modelo de inflamación crónica, sino aguda, por el comportamiento de las citocinas reportadas en diferentes estudios de agotamiento de células T.

1. Introducción.

Una vez que un patógeno ingresa a una célula, éste se torna inaccesible para los anticuerpos y otras proteínas del sistema inmunológico. Una de las formas en que se pueden eliminar es mediante la función de los linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos), que pueden destruir células que han sido afectadas intracelularmente. No sólo eliminan las células infectadas sino también contribuyen a la respuesta inmunitaria secretando diversas citocinas, como el IFN- γ , que inhibe la replicación viral en células infectadas y aumenta el procesamiento y la presentación de antígenos virales. Además de favorecer la activación de macrófagos que se encuentran en la vecindad de linfocitos T citotóxicos. Estos eliminarán las células infectadas moribundas, proporcionando mayor eficiencia en la función de linfocitos T para ayudar a curar y regenerar el tejido dañado (Parham, 2006).

La inflamación es una respuesta de los organismos a diferentes agresiones, tanto endógenas como exógenas, y según el tiempo de evolución, puede ser aguda o crónica (Arts, et al., 2018). La inflamación crónica ocurre en días, semanas y hasta meses cuando no se ha eliminado el agente patógeno del organismo (Khawar, et al., 2016), en ocasiones puede ser nociva (González-Costa y Padrón, 2019).

Las células T del sistema inmunológico generan respuestas antivirales que se necesitan para combatir al agente patógeno, pero si la respuesta falla, puede desarrollarse una infección crónica, y durante ésta, los linfocitos T CD8⁺ pueden sufrir un tipo de agotamiento caracterizado por una menor síntesis de citocinas, una pobre función efectora y una pérdida de potencial de membrana (Ma y Tangye, 2016). Durante años, para entender este fenómeno, se han publicado una serie de trabajos sobre el estudio del síndrome de agotamiento de células T CD8⁺.

El propósito de este trabajo es analizar la expresión del receptor CD8⁺, y la secreción IL-10 y TNF- α por linfocitos de sangre periférica para generar un modelo de agotamiento de linfocitos T en ratones CD1 usando pellet de algodón.

2. Marco teórico.

2.1. Inmunología e inflamación.

La inmunidad se refiere a los mecanismos de defensa del cuerpo que trabajan para mantener un estado de homeostasis, la eliminación de microorganismos o materiales exógenos que ingresan al cuerpo y elementos endógenos anormales, productos de desecho o células enfermas (Kotas y Medzhitov, 2015). Para esto se requiere una función inmunológica adecuada, sin exceso ni deficiencia, para poder mantener la homeostasis y prevenir diversas enfermedades (Katsuhiko, 2019). De acuerdo con Bordoni y colaboradores (2015), la inmunidad es un proceso importante que regula la interacción de los organismos con el medio ambiente, dado que proporciona un mecanismo por el cual los agentes externos son rechazados (por ejemplo, la fagocitosis) o internalizados (por ejemplo, tolerancia oral a los alimentos ingeridos) por el organismo.

El sistema inmunitario consta de la inmunidad adaptativa, que se adquiere tras la estimulación con un antígeno para posteriormente generar respuestas específicas al mismo antígeno, y la inmunidad innata (Takeuchi y Akira, 2010). Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (adquirida) intervienen en este proceso y sus efectos son locales y sistémicos. Según el tiempo en que la inflamación persiste y evoluciona, puede ser aguda o crónica y también depende del tipo de estímulo y la efectividad de la respuesta inicial para eliminarlo (Arts, et al., 2018). La inflamación se caracteriza por cinco signos clínicos: rubor, calor, dolor, tumor e impotencia funcional. Manifestaciones causadas por la acumulación de leucocitos, diferentes proteínas plasmáticas y derivados de la sangre que migran hacia sitios de tejidos extravasculares (Balasu, et al., 2016).

La inflamación consiste en la participación de varios fenómenos fisiológicos que involucran la disminución de la proliferación, maduración de células inmunes, la inducción de apoptosis y fagocitosis de leucocitos activos, así como la inhibición de la secreción de mediadores inflamatorios y la depuración de éstos (Nathan, 2002). Procesos regulados cuidadosamente por moléculas efectoras y la interacción

celular para evitar el daño en el tejido, erradicar el agente patogénico y permitir la regeneración tisular (Janssen y Henson, 2012). Hay diferentes mecanismos que participan en la resolución de inflamación, entre éstos están la resolución local por derivados del ácido araquidónico, la resolución por las descargas del sistema nervioso autónomo, la resolución por citocinas antiinflamatorias y la resolución por la inducción de apoptosis de células inmunes activas a través de receptores de muerte (Cervantes-Villanegra, et al., 2014).

2.2. Linfocitos T.

Los linfocitos T son células fundamentales del sistema inmune adaptativo y principales elementos que coordinan la respuesta de célula a célula en el contexto de las infecciones intracelulares (Pérez-Antón, et al., 2019). Las células T pueden diferenciarse mediante diferentes receptores de antígenos, y el marcador característico de éste es el receptor de antígenos de células T (TCR). Existen dos tipos de TCR, uno de ellos es un heterodímero compuesto por dos polipéptidos (alfa y beta) unidos por enlaces disulfuro, y el otro es un heterodímero que se compone de polipéptido gamma y delta, ambos receptores se asocian con un conjunto de cinco polipéptidos (complejo CD3) para formar el complejo TCR-CD3. Aproximadamente el 90-95% de células T son del tipo alfa-beta, mientras que el 5-10% gamma-delta (Male, et al., 2007; Chávez-Sánchez, et al., 2017).

Los linfocitos T alfa-beta se subdividen en dos poblaciones diferentes que no se superponen, una población posee el marcador CD4, cuya función es “colaborar” o también “inductora” de la respuesta inmunitaria (Th o células T helper). La otra subpoblación posee el marcador CD8 son células que ejercen una función predominantemente citotóxica (Tc). Las células T CD4 reconocen a sus antígenos específicos asociados con moléculas MHC de clase II, mientras que las células T CD8 reconocen antígenos asociados con moléculas MHC de clase I, de forma que la presencia de CD4 o CD8 restringe los tipos de células con los que pueden interactuar las células T (Male, et al., 2007; Chávez-Sánchez, et al., 2017)

Las células T CD4 pueden clasificarse en subconjuntos funcionales basados en el espectro de las citocinas que producen. Las células T_{H1} secretan IL-2 e INF- γ , y las células T_{H2} secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Las células T_{H1} llevan a cabo diversas funciones relacionadas con la citotoxicidad y reacciones inflamatorias locales, por ello, son importantes en la defensa contra los patógenos intracelulares (virus, bacterias y parásitos) ya que interactúan con los fagocitos mononucleares para ayudar a combatirlos. Las células T_{H2} estimulan con mayor efectividad a las células B para que proliferen y produzcan anticuerpos (Male, et al., 2007; Chávez-Sánchez, et al., 2017).

Los linfocitos T CD8 cumplen una función central, en particular contra células infectadas por virus, bacterias y protozoos (Harty, et al., 2000). Además, se han relacionado con la eliminación de células tumorales y células con MHC I incompatible en trasplantes (Kägi, et al., 1996; Hernández-Ruiz y Becker, 2006). Llevan a cabo su función a través de dos mecanismos básicos, citotoxicidad y liberación de citocinas. Para efectuar su función citotóxica emplean dos mecanismos complementarios, uno mediado por la exocitosis de gránulos líticos que contiene perforina, que es capaz de insertarse en la membrana lipídica y formar poros, resultando en el colapso del potencial de membrana, y el otro es servir de paso a otras moléculas de gránulos líticos de la familia de catepsinas como la granzima B, la cual activa directamente la cascada de señalización de apoptosis mediada por caspasas (Trapani y Smyth, 2002). Aunque en menor magnitud a comparación de los linfocitos T CD4, los linfocitos T CD8 participan en la liberación de citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL10, y el patrón de secreción de estas citocinas y las diferencias en la capacidad migratoria, han dado paso a la existencia de dos tipos de linfocitos T CD8, los T_{C1} y T_{C2} (como el caso de linfocitos T CD4). Además se reconoce también la existencia de linfocitos T CD8 supresores que intervienen en la regulación de la reacción inmunitaria (Wooland y Dutton, 2003; Cerwenka, et al., 1998; Jiang y Chess, 2004).

2.3. Citocinas en la inflamación.

El estudio de las citocinas inicio hace más de 40 años con el descubrimiento por parte de Isaac y Lindermann de la actividad del interferón. En 1974, Cohen y su equipo propuso utilizar el nombre de citocinas para referirse en general a esta amplia serie de mediadores celulares originados por diversos tipos celulares, por ejemplo, las interleucinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN), GM-CSF, G-CSF, M-CSF, las quimiocinas (Filella, et al., 2002) y los factores de crecimiento mesenquimal (Barros, et al., 2011). Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas extracelulares, hidrosolubles, entre 8 y 30 kDa que son generadas por diferentes tipos celulares en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico que actúan fundamentalmente como reguladores de la respuesta inmunitaria, que intervienen como factores de crecimiento de distintas células (siendo el caso de las células hematopoyéticas). Las citocinas actúan especialmente por mecanismos paracrinos (en células vecinas) y autocrinos (en las propias células productoras). Por otro lado, ya que diferentes tipos celulares segregan la misma citocina, y una sola citocina afecta a diversos tipos celulares, se dice que tienen pleiotropía, pues las citocinas tienen acciones similares que pueden ser desencadenadas por diferentes citocinas. A menudo forman una cascada de señalización (una citocina estimula sus células blanco para que se produzcan más citocinas) que activan mensajeros intracelulares que regulan la transcripción génica, por ello, las citocinas influyen en la actividad, diferenciación, proliferación y supervivencia de células inmunológicas. Regulan la producción de otras citocinas que pueden aumentar (proinflamatorias/Th1) o atenuar (antiinflamatoria/Th2) la respuesta inflamatoria, dependiendo del microambiente en que se encuentren (Filella, et al., 2002; Barros, et al., 2011).

Las citocinas desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio que es definido por el balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Entre las citocinas que promueven la inflamación se destacan las quimiocinas de bajo peso molecular que oscilan entre 8 y 10 kDa, con una homología entre el 20 y 50% en su secuencia

de aminoácidos, y su principal función es la quimiotáctica, producidas por una amplia variedad de células en respuesta a estímulos irritantes y a una serie de mediadores (IL-1, TNF o IFN- γ). Se clasifican en cuatro subfamilias llamadas α -quimiocinas o CXC (como IL-8), β -quimiocinas o CC, γ -quimiocinas o C, y δ -quimiocinas o CX₃C. Por ejemplo, IL-8 está implicada en la quimiotaxis y en la activación de los distintos tipos celulares que participan en la inflamación. IL-1 y TNF- α tienen un efecto sinérgico sobre la inflamación, promovida por IFN- γ a través del aumento de TNF- α . Entre las numerosas citocinas antiinflamatorias, se pueden destacar IL-10, IL-1ra (receptor del antagonista de la IL-1) y los receptores solubles de IL-1 (p68) y TNF (p55 y p75). También se encuentra el caso de IL-6, cuyas propiedades la hacen una citocina proinflamatoria (se encuentra entre los principales inductores de proteínas de fase aguda) y antiinflamatoria, ya que es capaz de promover la síntesis de IL-1ra y de los receptores de TNF (Filella, et al., 2002).

Tabla 1. Principales citocinas involucradas en la inflamación y sus funciones.

CITOCINA	FUNCIÓN
INTERLEUCINA-1 (IL-1)	Producida principalmente por macrófagos activados; se obtiene como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés, mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasiona fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda.
INTERLEUCINA-2 (IL-2)	Proteína componente de citocinas del sistema inmune; actúa como factor de crecimiento de linfocitos T, induce todos los tipos de subpoblaciones de linfocitos y activa la proliferación de linfocitos B.
INTERLEUCINA-3 (IL-3)	Interleucina que puede mejorar la respuesta natural del organismo a una enfermedad como parte del sistema inmune.
INTERLEUCINA-4 (IL-4)	Citocina producida por células T del tipo 2, basófilos, mastocitos y eosinófilos activados. Actúa como antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF- α , IL-6 y la proteína del macrófago.

INTERLEUCINA-6 (IL-6)	Secretada por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos; su liberación está inducida por IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF- α , con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria.
INTERLEUCINA-8 (IL-8)	Citocina proinflamatoria; su síntesis se da por fibroblastos, células endoteliales (almacenadas en los cuerpos de Weibel-Palade), monocitos, macrófagos y células dendríticas. Potente factor quimiotáctico de neutrófilos regula la producción de moléculas de adhesión, la formación de lípidos bioactivos, a su vez, también amplifica la inflamación local y estimula la angiogénesis.
INTERLEUCINA-10 (IL-10)	Conocida como factor de inhibición de la síntesis de citocinas, es una citocina antiinflamatoria, capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias por linfocitos T y macrófagos.
INTERLEUCINA-12 (IL-12)	Citocina proinflamatoria producida en macrófagos, monocitos y otras células presentadoras de antígenos; tiene un efecto sinérgico con el factor de necrosis tumoral alfa en la inducción de cantidades de interferón gamma.
INTERFERONES	Proteínas conocidas como citocinas que activan células del sistema inmune (NK y macrófagos), incrementan las defensas del hospedador al regular el incremento en la presentación de antígeno a través del aumento en la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad. Se distinguen en tres grandes grupos, la familia IFN- α está constituida por 14 proteínas que mantienen una elevada homología entre sí, son producidas por macrófagos y linfocitos B; el IFN- β mantiene una cierta homología con el grupo anterior (30%), son producidas por fibroblastos y células epiteliales. El IFN- γ tiene sólo 10% de homología con los IFN de tipo 1, actuando sobre un receptor distinto, es también denominado tipo 2, es producido por linfocitos T activados y por células NK, inhibe la proliferación de células Th2, induce la expresión de antígenos HLA de clase I y II, y aumenta la actividad citolítica de células LAK y células T citotóxicas, incrementando la expresión de la subunidad α (p55) del receptor para la IL-2.

QUIMIOCINAS

Quimioquinas conocidas como citocinas quimiotácticas, son proteínas pertenecientes a la familia de las citocinas; su función es activar, atraer y dirigir diversas familias de leucocitos circulantes hacia los sitios dañados.

FUENTE: Filella, et al., 2002; Miranda-Pedroso, 2021.

Las citocinas son fundamentales para llevar a cabo la respuesta inflamatoria durante una infección o lesión, favoreciendo el proceso de cicatrización apropiada para la herida, pero la producción exagerada de citocinas proinflamatorias puede ocasionar una presión arterial anormal o disturbios metabólicos. Cuando ocurre lesiones o infecciones graves, la respuesta exacerbada y persistente de citocinas Th1 contribuye con lesiones en el órgano objetivo, puede producirse fallo multiorgánico y, por ende, se puede ocasionar la muerte. Las citocinas Th2 pueden minimizar algunos de esos efectos indeseados (Barros, et al., 2011), y para esto, es necesario revisar el concepto de “tormenta de citocinas”.

Una tormenta de citocinas (TC) está definida como una reacción inmunitaria defensiva, con un potencial mortal, ya que consiste en una retroalimentación positiva entre las citocinas y las células inmunitarias (leucocitos), con un elevado número de citocinas. Esta TC puede ser consecuencia de una infección o una enfermedad autoinmune entre otros factores. Es producto de una respuesta inflamatoria sistémica no controlada, que resulta de la liberación de grandes cantidades de citocinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , y TGF- β , entre otros) y quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 y CXCL10) por células inmunoefectoras (Parra-Izquierdo, et al., 2020; Miranda-Pedroso, 2021). La TC implica una respuesta inmune que causa daño colateral, que puede ser mayor que el beneficio inmediato de la respuesta inmune, ya que esta respuesta requiere un equilibrio entre la producción suficiente de citocinas para eliminar el patógeno y evitar una respuesta hiperinflamatoria en la que una sobreabundancia de citocinas causa daños colaterales clínicamente significativos. Las citocinas desempeñan un papel clave en la coordinación de las células efectoras antimicrobianas y en el suministro de señales reguladoras que dirigen, amplifican y resuelven la respuesta inmune, tienen vidas medias cortas, lo que normalmente

evita que tengan efectos fuera del tejido linfoide y los sitios de inflamación, pero la producción sostenida de citocinas que conduce a niveles circulantes elevados puede ser necesaria para controlar adecuadamente algunas infecciones diseminadas. A niveles más altos, las citocinas pueden tener efectos sistémicos y causar daños colaterales a los sistemas de órganos vitales y la hiperactivación inmune en la tormenta de citocinas puede ocurrir como resultado de los siguientes procesos (Fajgenbaum y June, 2020):

1. Con una respuesta iniciada en ausencia de un patógeno, por ejemplo, en trastornos genéticos que involucran activación inapropiada del inflammasoma o enfermedad de Castleman idiopática multicéntrica, esta última es un grupo de trastornos linfoproliferativos que se caracteriza por ganglios linfáticos con hiperplasia del centro germinal y aumento en la vascularidad (García-Arias, et al., 2018).
2. Una amplitud de respuesta inadecuada o ineficaz que implica una activación excesiva de las células inmunitarias efectoras, por ejemplo, en tormentas de citoquinas debido a la terapia con células T con CAR
3. Una gran carga patógena, por ejemplo, en la sepsis o infecciones no controladas
4. Activación inmunitaria prolongada, por ejemplo, en la linfohistiocitosis hemofagocítica asociada con el virus de Epstein-Barr (HLH-VEB)
5. Incapacidad para resolver la respuesta inmune y retorno a la homeostasis, por ejemplo, en la linfohistiocitosis hemofagocítica (LHH) primaria.

En cada uno de estos estados, hay una falla de los mecanismos cuya función es la de prevenir la hiperinflamación y la sobreproducción de citocinas inflamatorias y mediadores solubles, pero la producción excesiva de citocinas conduce a hiperinflamación y fallo multiorgánico. Los tipos de células reguladoras, los receptores para citocinas proinflamatorias como IL1RA y citocinas antiinflamatorias como la interleucina-10 son importantes para antagonizar a las poblaciones de

células inflamatorias y prevenir la hiperactividad inmune (Fajgenbaum y June, 2020).

2.4. Inflamación aguda y crónica.

La inflamación aguda se caracteriza fundamentalmente por la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas (edema), y la migración de leucocitos (Kumar, et al., 2007). Además, es crucial para la reparación del tejido, el aumento en el calibre vascular, el incremento de la permeabilidad para proteínas plasmáticas, así como la activación y migración de leucocitos al sitio de lesión, pero si el estímulo dañino persiste o no hay resolución satisfactoria de la inflamación, se convierte en inflamación crónica (Shik y Munitz, 2010). La inflamación aguda comienza en minutos u horas de la lesión o la infección, participan mecanismos de respuesta inmune innata que activan la adquirida, y la inflamación crónica ocurre en días, semanas y hasta meses después cuando no se ha eliminado el estímulo dañino (Janssen y Henson, 2012; González-Costa y Padrón, 2018).

La inflamación aguda ocurre en la microcirculación, dando paso a proteínas plasmáticas y leucocitos de la sangre a tejidos. Es regulado por diferentes sustancias (mediadores de la inflamación como la histamina, serotonina, fibrina y citocinas como la IL-1, IL-6, TNF, que son secretadas por mastocitos, basófilos, plaquetas, células fagocíticas y endoteliales), pero una vez en el sitio de inflamación, las células fagocíticas endocitan al antígeno, lo procesan y lo convierten en pequeños péptidos que pueden unirse al MHC. Al ser presentados a los linfocitos T se induce la respuesta inmune específica (facultativa) ante un agresor o causante de inflamación. Si la respuesta inflamatoria aguda (local) tiene éxito en eliminar al agente dañino, el daño no se extiende, no hay manifestaciones sistémicas, se inhibe la respuesta inmune de forma oportuna, finaliza en poco tiempo y el tejido es reparado. Pero si no se resuelve, el proceso de inflamación continua y se transforma en un proceso crónico o sistémico (Vega-Robledo, 2008).

Mientras que la inflamación aguda es de instalación inmediata y de corta duración, la inflamación crónica es de duración prolongada y está relacionada con la respuesta de los linfocitos y los macrófagos, con la proliferación de vasos sanguíneos, disfunción del endotelio, fibrosis y destrucción tisular (González-Chávez, et al., 2011). Aunque la inflamación es importante para inducir la reparación del tejido y erradicación de patógenos, la no resolución de la inflamación lleva a un proceso crónico y se convierte en un proceso que puede causar la muerte del huésped (Chen y Nuñez, 2010), por ejemplo, diversos estudios indican que los procesos inflamatorios crónicos están asociados con la aparición de enfermedades crónico-degenerativas (Cervantes-Villanegra, et al., 2014). De acuerdo con Roe (2020), la inflamación puede ser creada por varias causas diferentes (coágulo de sangre, trastorno del sistema inmune, cáncer, infección, exposición química, una lesión física o una afección neurológica como el Alzheimer o la depresión), por lo que describe un sistema de clasificación que utiliza siete parámetros de citocinas distintos para permitir la determinación de la causa de una inflamación. En consecuencia, se puede determinar si una inflamación es causada por una isquemia, un trastorno del sistema inmune, un cáncer, una infección, una sustancia química, una lesión física o una enfermedad neurológica.

Un caso actual de inflamación crónica está relacionado con el SARS-CoV-2. En marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud declaró una pandemia mundial, por la existencia de una enfermedad ocasionada por dicho coronavirus zoonótico (COVID-19), el cual comenzó en China en diciembre de 2019. La enfermedad provoca un gran espectro de signos y síntomas, donde predominan tos y fiebre, resultando en un desarrollo de síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), afectación pulmonar grave por el virus que puede ser causada también por hiperinflamación y un cuadro similar a la linfocitosis hemafagocítica (HLH); un síndrome clínico provocado por una respuesta inadecuada del sistema inmunológico a un desencadenante, que resulta en una reacción inflamatoria desproporcionada (Parra-Izquierdo, et al., 2020). La respuesta inflamatoria tiene valor defensivo, ya que promueve la salida de leucocitos de los vasos sanguíneos y su acumulación en los tejidos infectados, pero también ocasiona una agresión al

propio tejido, consecuencia de la liberación de radicales citotóxicos por las células inflamatorias, se produce una inflamación generalizada (SIRS), que aparece como consecuencia de una liberación masiva de citocinas proinflamatorias (IL-1, factor necrosante de tumores alfa, IL-6, IL-12, quimiocinas) conocida como “tormenta de citocinas” (Diao, et al., 2020).

2.5. Estudio del agotamiento de células T.

En los últimos años se ha llevado a cabo un sistema experimental para estudiar la infección viral crónica llevando a cabo la infección de ratones con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el cual causa un estado conocido como agotamiento inmunológico, en el que el ataque inmunológico a la infección se ve comprometido porque las células T CD8⁺ que se dirigen a las células infectadas por el virus de LCMV muestran un estado de agotamiento. En estos estudios se mostró una producción reducida de moléculas de señalización de citocinas inmunes, junto con una proliferación y citotoxicidad reducidas, relacionando una infección crónica con un agotamiento de linfocitos T (Kahan y Zajac, 2019; Blattman, et al., 2009).

La característica principal de las células T agotadas es la incapacidad de llevar a cabo funciones efectoras necesarias para contener la infección o el tumor subyacente, y esto quedó demostrado en estudios de LCMV. Durante la infección crónica causada por este virus se produjeron respuestas antivirales de células T CD8⁺ que persistieron durante periodos prolongados, perdiendo así toda su gama de funciones efectoras necesarias para resolver la infección, dando como resultado el desarrollo de agotamiento (Kahan y Zajac, 2019).

El virus de LCMV fue descubierto a mediados de 1930, un sistema experimental formador de paradigmas con un notable historial de contribución al descubrimiento de muchos de los conceptos de la inmunología moderna, pero su capacidad para establecer una infección crónica en ratones adultos inmunocompetentes fue fundamental para identificar el agotamiento de células T. Este sistema arrojó hallazgos relevantes para comprender por qué la respuesta de células T ineficaces

surgen comúnmente durante infecciones crónicas bajo enfermedades como el VIH o la enfermedad por el virus de la hepatitis C (VHC), así como en el desarrollo de un crecimiento tumoral. Se demostró que durante la infección crónica causada por LCMV, se generan respuestas antivirales de células T $CD8^+$ que persisten por periodos prolongados en huéspedes crónicamente infectados, pero pierden todas sus funciones efectoras necesarias para resolver la infección, desarrollando así el fenómeno de agotamiento (Kahan y Zajac, 2019).

El agotamiento de células T es un estado de disfunción de linfocitos T que surge durante muchas infecciones crónicas y el cáncer. Se caracterizan por una función efectora deficiente, expresión sostenida de receptores inhibitorios y un estado transcripcional distinto al de células T efectoras o de memoria funcionales, por ello, el agotamiento impide un control óptimo de infecciones y tumores (Ma y Tangye, 2016).

En el proceso de inflamación se favorece la diferenciación de linfocitos T en dos tipos de poblaciones celulares, los Th1 que son secretores de citocinas proinflamatorias y los Th2 que se encargan de producir citocinas antiinflamatorias. Ambos regulan el proceso, pues las células Th1 y Th2 amplifican y dirigen la respuesta inmune adaptativa que permite la adaptación del organismo durante la inflamación (Pérez y Vega, 2016; Lucke, et al., 2015).

De acuerdo con Wherry (2011), el agotamiento de células T es un estado de disfunción específicas de antígeno y la subsiguiente eliminación física. Durante el agotamiento, las células T $CD8^+$ regulan el alza de una serie de receptores inhibitorios, incluidos PD-1, LAG3, Tim3, CD160 y 2B4, y pierden progresivamente las funciones efectoras y la capacidad proliferativa. La pérdida de las funciones efectoras durante el agotamiento de células T $CD8$ ocurre de manera jerárquica:

1. Pérdida de la producción de IL-2, alta proliferación y la capacidad citotóxica.
2. Pérdida de la capacidad de producir factor de necrosis tumoral (etapa intermedia).
3. Pérdida parcial o completa de la capacidad de producir grandes cantidades de interferón-gama o beta-quimiocinas, o la capacidad de desgranular.

4. Eliminación física de las células T virales específicas (etapa final).

Durante las primeras etapas de la infección por LCMV, la diferenciación de células efectoras prototípicas se corrompe junto con la pérdida de la producción de IL-2 y la síntesis de IFN- α . La activación antigénica junto con un entorno de citocinas desfavorable y un soporte celular inferior resultan en un mayor deterioro del potencial funcional, manifestándose en la pérdida de la capacidad de producir IFN- γ , pero las actividades citolíticas son resistentes al agotamiento, por lo que ayuda al control viral (Puller, et al., 2004; Agnellini, et al., 2007; Graw, et al., 2011). Otra característica del agotamiento es donde las células T agotadas también pierden su capacidad de respuesta a las citocinas inflamatorias que generalmente inducen la activación y síntesis de citocinas efectoras hacia células efectoras y de memoria, propiciando un espectro de diferentes estados de agotamiento en proporción con la gravedad de la infección (Kahan y Zajac, 2019).

En cuanto a receptores que caracterizan al agotamiento de linfocitos T, la alta expresión de receptores inhibidores como PD-1, CTLA-4, LAG-3, Tim-3, 2B4, CD160 y TIGIT se ha dado en la infección crónica por LCMV. Estos receptores normalmente regulan la activación de células T CD8 después de una infección aguda, atenuando su activación de respuesta, pues una alta expresión es sostenida por estos receptores inhibidores, restringiendo las funciones de células T. Sin embargo, a medida que avanza el agotamiento de células T, el número y niveles de la expresión de receptores inhibidores aumenta y contribuye a la heterogeneidad de células T agotadas, que a su vez dependerán más de señales antigénicas que de citocinas para su persistencia. PD-1 es el más estudiado de todos, cuya expresión se da después de la activación de células T, influye en múltiples funciones de células T (señalización TCR, coestimulación, motilidad, proliferación y metabolismo), es un receptor que promueve el agotamiento a través de su capacidad para regular negativamente diversas actividades de células T (Kahan y Zajac, 2019; Blattman, et al., 2009).

Las células T CD4 juegan un papel clave en la preparación y preservación de la respuesta inmunitaria durante las infecciones. La ausencia de células T CD4 en el

inicio o desarrollo de la infección conduce a un agotamiento grave de células T CD8, ocasionando una inmunidad humoral deficiente y altos niveles de persistencia viral (Wiesel y Oxenius, 2012; Kahan y Zajac, 2019). Por lo tanto, se puede inferir que su papel radica en apoyar a la respuesta de células T CD8 y limitar la gravedad del agotamiento, papel que logran cumplir al proporcionar citocinas como IL-2 e IL-12, promoviendo la activación de células dendríticas a través de interacciones CD40:CD40L (Wiesel, et al., 2010; Kahan y Zajac, et al., 2019).

El factor de necrosis tumoral (TNF) es otra citocina proinflamatoria relacionada con el agotamiento inmunitario en determinadas condiciones, puesto que en un análisis de células T CD4 durante una infección por VIH-1, se observó que el TNF induce varias vías asociadas al agotamiento, y en el caso de LCMV, en una etapa temprana se elevan los niveles de TNF y se produce una infección crónica. Pero si en este mismo sistema se neutraliza a TNF, se restaura el número de células T específicas del virus, disminuyen los niveles de expresión de PD-1, aumenta la producción de citocinas y se reducen las cargas virales. Aun así, no en todas las infecciones agudas o crónicas permanecen estas características, por el contrario permanecen bajos si se neutraliza TNF (Kahan y Zajac, 2019).

Respecto a los niveles de IL-10, se ha observado que se elevan durante numerosas infecciones crónicas en el caso de LMCV. Las células dendríticas y macrófagos representan la mayor parte de la producción temprana de IL-10, las células T CD4 posteriormente, siendo entre todas las células las que contribuyen a facilitar el agotamiento de células T. Por ello, IL-10 tiene acciones inmunosupresoras que incluye la proliferación sofocante de células T, la producción de citocinas, la presentación de antígenos y la coestimulación por APC. El bloqueo de IL-10 en la infección crónica provocada por LCMV reduce el agotamiento y apoya al control viral (Kahan y Zajac, 2019).

2.6. Pellet de algodón como inductor de inflamación crónica.

De entre los trabajos reportados que han empleado el método del pellet de algodón se encuentran distintos autores. Matiz y colaboradores (2011), en su trabajo “Actividad antiinflamatoria de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* L. (Swartz)”, utilizaron como sujetos de experimentación a ratas Wistar machos. Reportan una administración oral de tratamiento 1 hora antes de la implantación del pellet, después fueron anestesiados por inyección, se *introdujo subcutáneamente el pellet (10 mg de peso) hasta el nivel escapular*, y durante los 6 días posteriores al implante, se administraron las mismas dosis de tratamiento. Se dejó el desarrollo de granulomas por un espacio de 7 días, y en el día 8 se sacrificaron los animales. Los granulomas fueron removidos, despojados de tejido suelto, secados por 48 horas a 40°C y pesados en balanza analítica. *La diferencia entre el peso del granuloma y el peso original del pellet (10 mg) se consideró como la cantidad de tejido granulomatoso formado*. Obtuvieron resultados favorables en disminuir el granuloma inducido por el pellet de algodón infiriendo actividad antiinflamatoria del extracto utilizado.

Carbajal-Quintana y colaboradores (2013), publicaron “Efectos del policosanol en los modelos de pleuresía inducida por carragenina y granuloma por algodón”, en ratas, donde siguen el modelo de granuloma con un pellet de algodón. Utilizaron un peso aproximado de 50 mg de peso del pellet, suturando la herida, después de seis días de la implantación, se sacrificaron a las ratas y se extrajo el granuloma para la determinación de sus pesos húmedo y seco, dejando los granulomas a 60°C durante 24 h hasta alcanzar un peso constante, obteniendo una disminución en peso húmedo y peso seco. Los autores lo traducen como un efecto antiinflamatorio en ambos modelos utilizados en su trabajo (de pleuresía por carragenina y granuloma por algodón). En el mismo año, Carreón-Sánchez y colaboradores, en su artículo “Estudio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo), utilizaron ratones machos para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria”, reportaron ensayos para evaluar la actividad antiinflamatoria utilizando la metodología de Marroquín-Segura y colaboradores (2009), entre éstos,

el ensayo para generar inflamación crónica utilizando un pellet de algodón de 10 mg bajo la piel en la región escapular, donde los sujetos de experimentación recibieron el tratamiento por 7 días, se sacrificaron, se extrajeron los pellet, se dejaron secar a 37°C y se pesaron en una balanza analítica. En sus conclusiones mencionan que la dosis experimentada no tiene efecto anti-inflamatorio ya que en base en sus resultados no se encontró diferencia estadística entre los pesos del pellet de cada grupo de experimentación. Así mismo, Sánchez-Flores (2013), en su tesis “Evaluación del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo); para comprobar su actividad hipoglucemiante y antiinflamatoria” utiliza la misma metodología que la reportada por Carreón-Sánchez y colaboradores, pero en ratones CD1. Sin embargo, reportan que la hierba del sapo no mostró actividad antiinflamatoria a nivel agudo y crónico, donde el modelo de inflamación crónica se utilizó el granuloma de algodón.

Guerrero-Ríos (2013), bajo la asesoría del Dr. Rubén Marroquín Segura, en su tesis “Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria del Extracto Acuoso de *Sanvitalia procumbens* (Ojo de Gallo) en un Modelo de Ratones CD1” reporta el uso del pellet de algodón (10 mg de peso y esterilizados) implantado subcutáneamente en el dorso. Se realizó una administración del tratamiento durante 10 días, así como el sacrificio de los ratones al onceavo día y la extracción de los pellets de algodón, obteniendo peso húmedo y peso seco después de colocarlos en la estufa a 37°C durante una semana. Al analizar los datos de ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con algodón encontraron que no hay actividad antiinflamatoria al no encontrar diferencia estadística entre los grupos de peso húmedo y peso seco de los extractos de la planta contra el grupo control negativo.

Zamora-Rodríguez y colaboradores (2017) realizaron un estudio con diferentes modelos de inducción de inflamación, entre éstos, evaluaron los efectos del granuloma o pellet de algodón. Mencionan que la implantación de la bolita de algodón produjo la formación de un granuloma, que corrobora la validez del modelo experimental utilizado en condiciones de laboratorio, esto basándose sólo en peso

seco y peso húmedo del pellet, ya que el fluido absorbido por el pellet influye en el peso húmedo del granuloma mientras que el peso seco se correlaciona con la cantidad de tejido granulomatoso formado (Swingle y Shideman, 1972). Estos resultados los exploran en tres diferentes tiempos, fase transudativa, exudativa y proliferativa, donde la transudativa se expresa por el aumento del peso húmedo del pellet durante las primeras 3 horas tras implantar la mota de algodón, la exudativa ocurre entre las 3 y 72 horas, donde ocurre un aumento prolongado de la permeabilidad vascular, y la proliferativa que se caracteriza por el incremento del peso seco del granuloma que ocurre entre los 3 y 6 días posteriores a la implantación, tiempo que Zamora-Rodríguez mencionan como referencia para inducir inflamación crónica así como otros autores como Matiz y colaboradores (2011). El pellet de algodón ha sido usado en diferentes trabajos para inducir inflamación, tanto aguda como crónica, y en ambos casos no se especifica el método para emplearlo, así como el tiempo necesario para lograr la inducción de inflamación, No se ha reportado la variación en la población de linfocitos ni una cuantificación de citocinas inflamatorias. Además, es uno de los métodos más económicos y accesibles de los reportados en diferentes publicaciones. Ya que los procesos inflamatorios causan problemas y se agravan cuando la inflamación permanece por mucho tiempo, se han propuesto diferentes modelos para su estudio y mediante esto, buscar nuevas alternativas terapéuticas. Por ello se busca generar inflamación crónica en un modelo murino para el estudio de agotamiento de células T en ratones CD1 usando el pellet de algodón.

3. Planteamiento del problema y pregunta de investigación.

La inflamación crónica está muy relacionada con diferentes enfermedades crónico-degenerativas en donde se ha estudiado su desarrollo y características, como es el caso del cáncer, LCMV, y recientemente, el SARS-Cov-2 cuyos casos reportados en personas con la enfermedad de COVID-19 han redefinido su estudio. Se sabe que la inflamación crónica ocurre cuando no se ha eliminado al agente patógeno después de un periodo prolongado, provocando daño tisular, falta de respuesta por parte del sistema inmunológico, y en este último, un agotamiento de células T $CD8^+$ junto con una tormenta de citocinas que puede provocar incluso la muerte del huésped. Este problema actualmente afecta a más de un millón de personas al año debido a que estas enfermedades están relacionadas con la inflamación crónica y sus efectos secundarios. Además, los tratamientos son escasos o no lo suficientemente efectivos para ayudar al organismo a superar esta condición. Por ello se necesita de estudios en modelos *in vivo* para buscar nuevas alternativas terapéuticas, entonces, ¿Cómo obtener linfocitos T agotados, usando un modelo de inflamación crónica en ratones CD1?

4. Hipótesis.

La inflamación es un proceso fisiológico normal que media la eliminación de agentes extraños mediante la activación de células inmunes (T $CD8^+$) y secreción de citocinas. Por su parte, la inflamación crónica es un estado de infección persistente y prolongado que favorece la presencia de citocinas proinflamatorias y el agotamiento de células T $CD8^+$. Por lo cual, si se coloca un pellet en ratones CD1 por un tiempo prolongado se generará un estado de inflamación crónica y se podrá obtener linfocitos T $CD8^+$ agotados.

5. Objetivos.

Objetivo general.

- Generar un modelo de agotamiento de células T CD8⁺ mediante el uso de pellet de algodón en ratones CD1.

Objetivos particulares.

- Determinar indirectamente la cantidad de células infiltradas en los pellets de algodón en peso húmedo y peso seco.
- Evaluar la población de linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica de ratones CD1 por citometría de flujo.
- Evaluar por citometría de flujo la cantidad de citocinas pro y antiinflamatorias (IL-6, IL-10, TNF, MCP-1, IFN- γ , IL-12p70) en plasma de ratones CD1.

6. Material y método.

6.1. Sujetos de investigación.

- Para este estudio se utilizaron ratones CD1 del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, campus II, UNAM. Los ratones se mantuvieron a libre demanda de alimento y agua, con periodos de luz controlada.

6.2. Diseño de estudio.

El diseño del estudio consta de 5 grupos, cada grupo incluye tres ratones CD1 a los cuales se les colocó el pellet de algodón durante un tiempo determinado. La nomenclatura de cada grupo es la siguiente:

- I. **Grupo control:** Sin pellet.
- II. **Grupo pellet (1):** Pellet por 5 días.
- III. **Grupo pellet (2):** Pellet por 10 días.
- IV. **Grupo pellet (3):** Pellet por 15 días.

- V. **Grupo pellet (4):** Pellet por 20 días.
- VI. **Grupo pellet (5):** Pellet por 30 días.

6.3. Metodología.

1) Colocación de pellet.

A cada ratón se le colocó un pellet de 10 mg (estéril) mediante un corte en la región escapular, se dejó el número de días establecidos por grupo (grupos con pellet).

2) Extracción de sangre de ratón y pellets.

Se anestesiaron a los ratones para obtener entre uno a dos mililitros de sangre en tubos de vidrio a temperatura fría, se sacrificaron por el método de dislocación y se procedió a la extracción de linfocitos. Los pellets fueron pesados una vez extraídos en una báscula analítica para obtener peso húmedo y se dejaron en estufa etiquetados durante 5 días a 37°C para posteriormente obtener su peso seco.

3) Separación y extracción de linfocitos.

Se agregó Ficol en relación 1:1 con la sangre a trabajar, se pasó a centrífuga a 400 G por 40 minutos, se realizó la extracción de las células mononucleadas (monocitos y linfocitos) con micropipeta, así como el plasma para la cuantificación de citocinas. Se centrifugó con PBS a 500 G por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de medio con SFB al 20%. Se cultivaron 24 horas en incubadora de CO₂ y a 37°C. Se obtuvo el botón celular de cada muestra y se procedió al marcaje de linfocitos positivos a CD8.

4) Marcaje de linfocitos T (CD8).

Se ocupó un anticuerpo conjugado (Ab) para el marcaje de linfocitos T CD8⁺, se agregó 1 microlitro del anticuerpo diluido, se pasó a vórtex, se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se lavó con 1 ml de PBS, se pasó a vórtex y se pasó a centrífuga a 500 G, se retiró el sobrenadante y se agregó 500 microlitros de PBS, se pasaron a tubos FACS para citómetro.

5) Marcaje de citocinas pro y antiinflamatorias.

Para el marcaje de citocinas se utilizó el *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit*. Se preparó la curva de citocinas con las concentraciones 1:2, 1:4,

1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256, se realizó la mezcla de perlas de captura con las citocinas pro y antiinflamatorias y se realizó el ensayo de las citocinas con las muestras de plasma de cada grupo de ratón para posteriormente leer en citómetro.

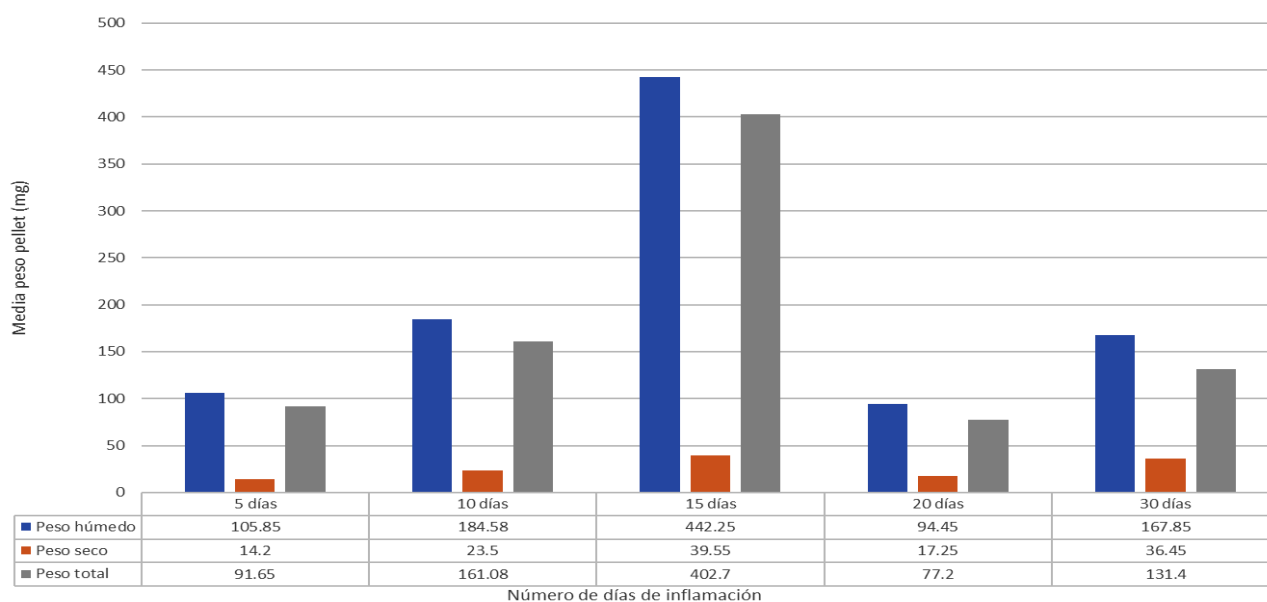
6) *Cuantificación por citometría de flujo.*

Se utilizó el citómetro BD FACSAria II del laboratorio 7 P2 de UMIEZ y su manipulación fue realizada por el técnico responsable de la FES Zaragoza, Campus II, y los resultados fueron pasados a un disco DVD-r para su análisis.

7. Resultados.

7.1. Determinación indirecta de linfocitos infiltrados en los pellets después del proceso de inflamación.

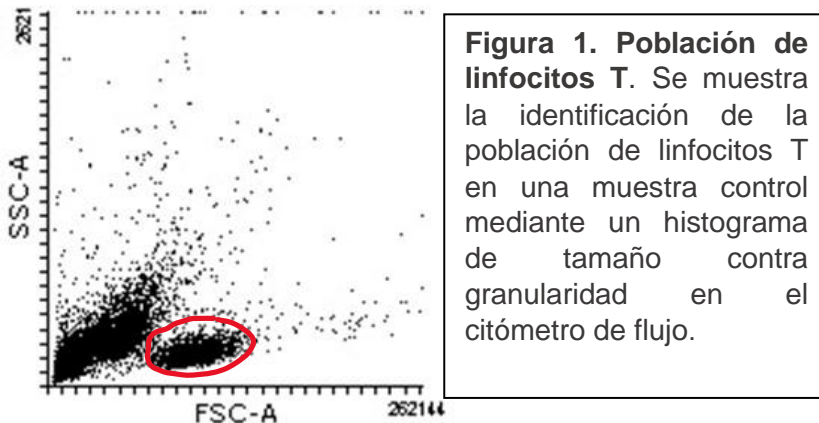
Una forma indirecta para determinar la infiltración de linfocitos durante el proceso inflamatorio es comparar el peso húmedo y seco de los pellets de algodón que se encontraban en los ratones (Swingle y Shideman, 1972). Un aumento del peso de los pellets se correlaciona con mayor inflamación. Los resultados de la **gráfica 1** muestran un aumento del peso del pellet hasta el día 15 mientras que el día 20 disminuye. Este resultado nos sugiere que desde el día 5 hasta el día 15 se generó un estado de inflamación que permitió la infiltración de linfocitos al pellet de algodón. Sin embargo, la inflamación no se mantuvo constante hasta el día 30 de estudio, se resolvió después del día 15. El peso total es la diferencia entre el peso húmedo y peso seco para inferir en la cantidad de fluido (células mononucleadas y linfocitos infiltrados) en los pellets.



Gráfica 1. Comparación de la media de peso húmedo contra peso seco de los pellets obtenidos de los grupos, para obtener la diferencia de ambos (peso total), resultando en datos de células infiltradas en el pellet.

7.2. Células T positivas a CD8 (cuantificación por citómetro de flujo).

Para el conteo de células T positivas a CD8 se realizó la cuantificación por citómetro de flujo, identificando la población de linfocitos T como se muestra en la **figura 1**. Se obtuvo la cuantificación de esta población de linfocitos T positivos a CD8 por grupo de experimentación como se observa en la **figura 2**. Como se muestra en la **gráfica 2**, en los primeros 5 días hay un aumento de linfocitos positivos a CD8 comparado con el grupo control, pero el porcentaje disminuye significativamente al día 10 y los siguientes grupos se observa una leve disminución en las células T positivas a CD8, siendo el grupo 30 días el de menor porcentaje a células T positivas a CD8. Comparando con el grupo control, el resultado del grupo de 5 días permite la interpretación de que es el tiempo en que ocurre el máximo punto de proliferación de linfocitos T citotóxicos, los cuales responden al estímulo del pellet como agente externo ante el organismo del ratón, pero esta respuesta va decayendo conforme a mayor tiempo de inflamación se induce con el pellet.



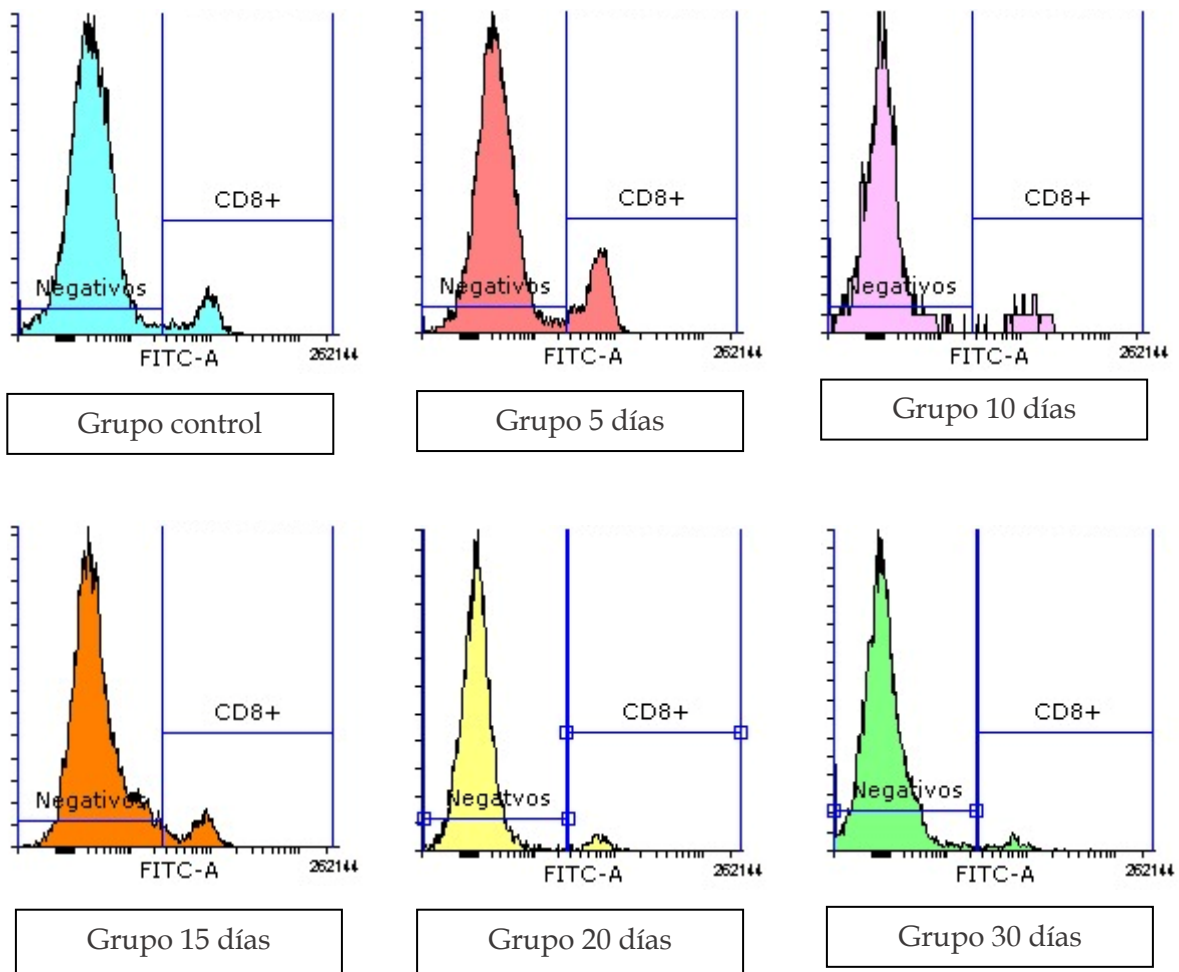
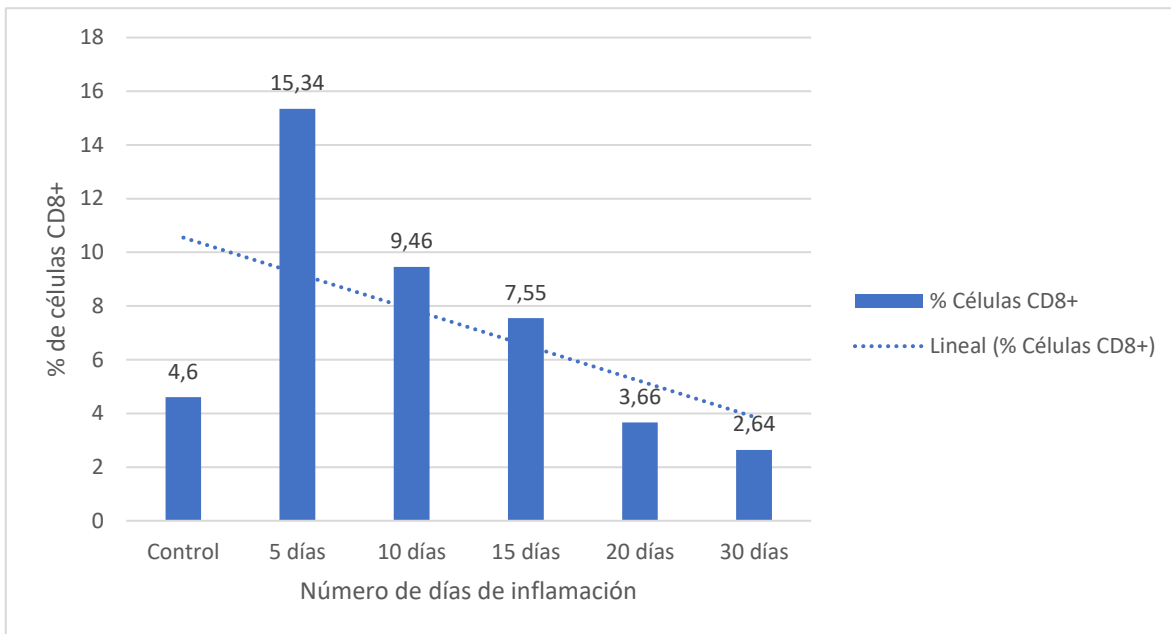


Figura 2. Histogramas de grupo control, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días y 30 días, generados mediante el uso de flowing software, a partir de los datos obtenidos del citómetro de flujo.

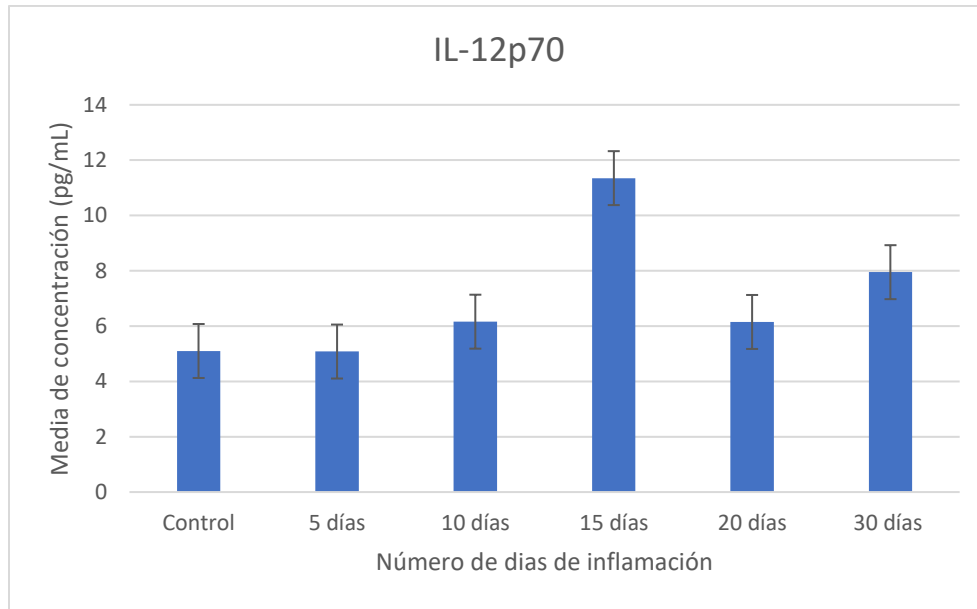


Gráfica 2. Porcentaje de células T positivas a CD8 por grupo de experimentación cuantificados por citometría de flujo.

7.3. Citocinas pro y antiinflamatorias (cuantificación por citómetro de flujo).

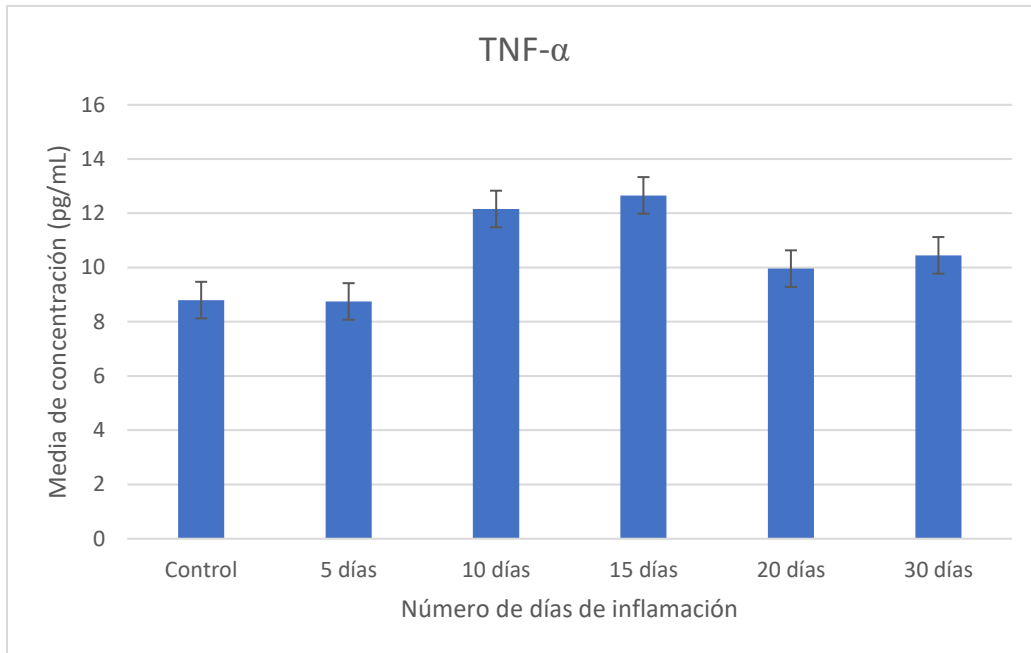
Mediante la curva que se preparó del kit de citocinas de inflamación de ratón, se obtuvieron las siguientes cantidades de citocinas pro y antiinflamatorias por grupo de experimentación.

Con los resultados de las concentraciones de citocinas se obtuvieron las **gráficas 3, 4, 5, 6, 7, 8**, para comparar la media de concentración en pg/mL por grupo de experimentación obtenida del análisis de datos de citometría de flujo de las citocinas correspondientes. Las concentraciones se obtuvieron mediante los estándares de la curva de citocinas de inflamación con perlas, datos analizados por el citómetro.



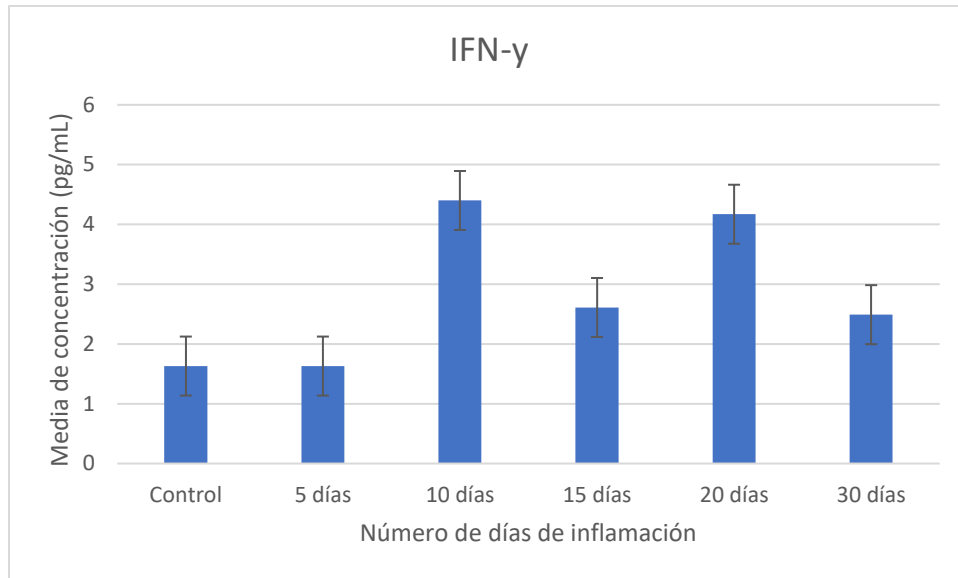
Gráfica 3. Media de concentraciones de IL-12p70 contra número de días de inflamación de grupo control, 5, 10, 15, 20 y 30 días.

En la **gráfica 3** se observa que las concentraciones de IL-12p70 aumentan entre los 10 y 15 días y se observa una disminución en los 20 días para aumentar en los 30 días; esta citocina es un heterodímero compuesto por p35 y p40, es considerada una citocina proinflamatoria que mejora las respuestas de células Th1, linfocitos T $CD8^+$ y NK al aumentar la producción de IFN- γ (Verma, et al., 2014). El resultado infiere que hay actividad inflamatoria como respuesta del organismo del ratón ante el pellet de algodón que prevalece en los primeros 15 días para resolverse después entre los 20 y 30 días.



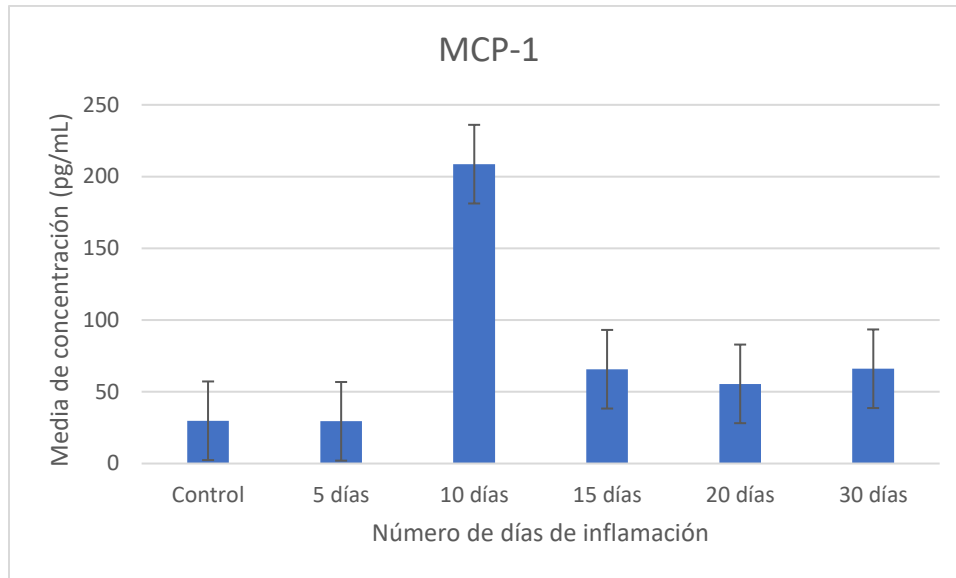
Gráfica 4. Media de concentraciones de TNF- α contra número de días de inflamación de grupo control, 5, 10, 15, 20 y 30 días.

La **gráfica 4** corresponde a las concentraciones de TNF-alfa donde no se observa una diferencia en los primeros 5 días y el grupo control, pero aumenta su concentración entre los 10 y 15 días con respecto al control, se disminuye su concentración después de los 20 días con respecto a los 15 días, aparentando una resolución de la inflamación después de este tiempo, tomando como el pico de 15 días como el máximo de la actividad proinflamatoria de TNF- α .



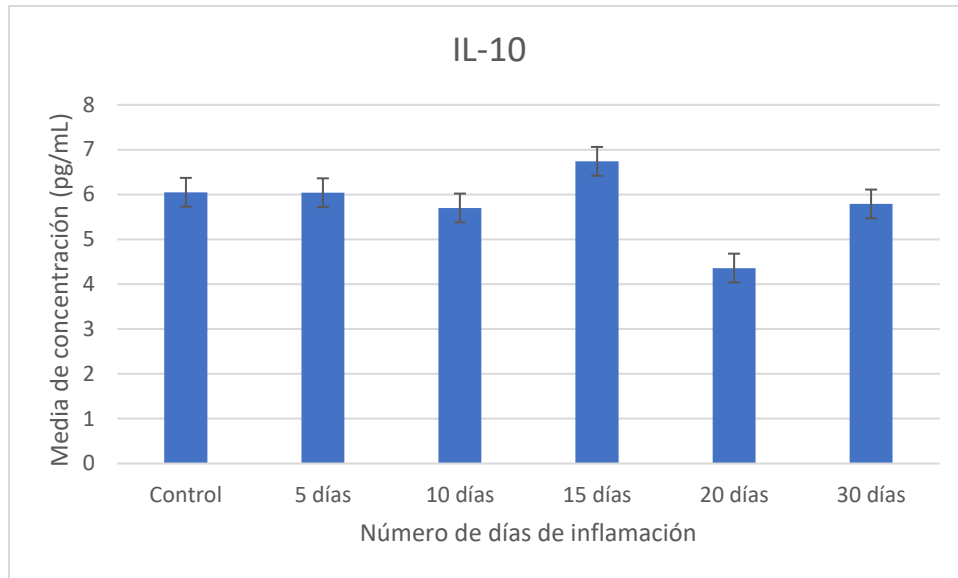
Gráfica 5. Media de concentraciones de IFN- γ contra número de días de inflamación de grupo control, 5, 10, 15, 20 y 30 días.

La **gráfica 5** representa las concentraciones de IFN- γ , donde no se observa un aumento en los primeros 5 días de inflamación en comparación con el grupo control, pero se obtiene una aparente concentración máxima en los 10 días comparándolo con el grupo control, disminuye en los 15 días y aumenta en los 20 días usando los 10 días como referencia de las caídas de concentración de la citocina para observar una caída de concentración en los 30 días. Al observar las medias de concentración, los 10 días se muestran como el pico máximo de concentración de IFN- γ como citocina proinflamatoria.



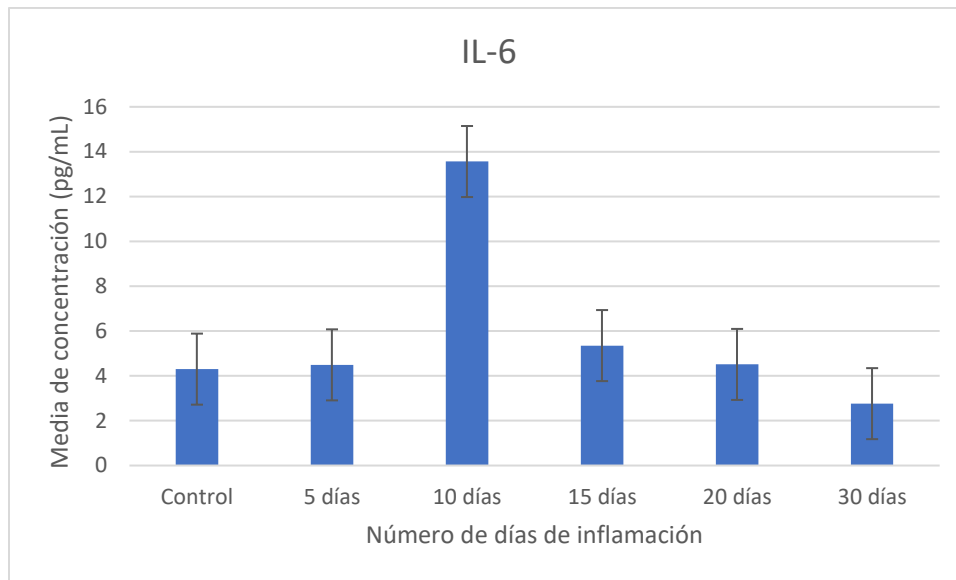
Gráfica 6. Media de concentraciones de MCP-1 contra número de días de inflamación de grupo control, 5, 10, 15, 20 y 30 días.

La **gráfica 6** muestran las concentraciones de la quimiocina MCP-1 (Proteínas Quimiotáctica de Monocitos-1), la cual se ha reportado que es una quimiocina involucrada en procesos inmunorreguladores e inflamatorios en células con el receptor CCR2 (CC de quimiocinas 2) que se expresa en macrófagos, adipositos y células del músculo esquelético. Se ha informado que MCP-1 promueve la infiltración de macrófagos y linfocitos T después de una lesión tisular y parece ser necesaria para los procesos de reparación del músculo esquelético (Catalán, et al., 2018). Su concentración aumenta significativamente en los diez días hasta disminuir su concentración en los 15 días de inflamación y mantiene su concentración hasta los 30 días, comportamiento que se complementa con la **gráfica 1** de los linfocitos infiltrados en los pellets.



Gráfica 7. Media de concentraciones de IL-10 contra número de días de inflamación de grupo control, 5, 10, 15, 20 y 30 días.

La **gráfica 7** muestra las concentraciones de IL-10, donde no aumentan en los grupos de 5 y 10 días sino hasta los 15 días de inflamación, disminuyendo entre los 20 y 30 días, por lo que aparentemente no hay respuesta evidente de una inflamación crónica esperada en el ratón, contrario a lo esperado, se observa una leve respuesta ante el pellet hasta los 15 días y después no hay una respuesta que siga generándose ante el pellet como inductor de inflamación.



Gráfica 8. Media de concentraciones de IL-6 contra número de días de inflamación de grupo control, 5, 10, 15, 20 y 30 días.

Las concentraciones de IL-6 no aumentan en los primeros 5 días de inflamación y su concentración máxima se encuentra en los 10 días de inducción de inflamación, pero disminuye a partir de los 15 días y gradualmente decae hasta los 30 días. De ser el caso de una citocina proinflamatoria, no hay un aumento de concentración de esta citocina conforme mayor tiempo de inflamación se induce, por lo que se ve claramente una resolución de la inflamación del ratón.

Comparando las concentraciones de las diferentes citocinas se observa que hay cambios en IFN- γ , MCP-1 e IL-6 en diferentes grupos de experimentación. Principalmente se observa cambios a partir de los 10 días de inflamación, sin embargo, de acuerdo con un análisis estadístico ANOVA, la prueba de Tukey (usando el software estadístico IBM SPSS Statistics Visar), no existe diferencia significativa entre los grupos de experimentación en cuanto a la concentración de citocinas, exceptuando a MCP-1 e IL-6 con una significancia de 1.000 en el grupo de experimentación de 10 días. Contrario a lo esperado, no se determina un aumento en la concentración de citocinas proinflamatorias entre mayor tiempo de inflamación se produce con el pellet ni se encuentran similitudes en el

comportamiento de citocinas reportadas en diferentes estudios de inflamación crónica y agotamiento de células T.

8. Discusión de resultados.

Actualmente, el modelo de inflamación crónica mediante el uso de un pellet de algodón ha sido reportado en diferentes artículos y trabajos para probar la eficacia de diferentes extractos antiinflamatorios. Este modelo fue probado por Meier y colaboradores en 1950, el primero en demostrar que la cortisona podía inhibir la formación de granulomas en respuesta a la implantación de una bolita de algodón. El procedimiento fue modificado hasta llegar a Swingle y Shideman (1972), donde en su trabajo examinaron los efectos de ciertos agentes antiinflamatorios de un pellet de algodón implantado por vía subcutánea por un lapso de 6 días en una rata con adrenalectomía aguda obteniendo diferentes resultados favorables en la reducción del peso del granuloma. Es decir, a menor peso del granuloma, menor inflamación y a mayor peso, mayor inflamación, por ende, varios trabajos se han basado en este artículo para producir en su mayoría, inflamación crónica.

El método por granuloma se ha utilizado para evaluar exudación y proliferación de los componentes de inflamación crónica. El peso seco es igual a la cantidad de tejido granulomatoso formado alrededor del cuerpo extraño (Sánchez-Flores, 2013). En la **gráfica 1** se observa cómo se va desarrollando el granuloma con el pellet de algodón y tal como mencionan Swingle y Shideman, en los primeros 5 a 6 días se da un aumento de peso del granuloma, tanto en peso húmedo y peso seco, pero es en el lapso de los 15 días donde se da un significativo aumento del peso total del granuloma para después disminuir entre los 20 y 30 días.

En la **gráfica 2** se observa el porcentaje de la población de linfocitos positivos a CD8 citotóxicos. Esta población ya fue estudiada en el fenómeno de agotamiento de linfocitos, donde se puede observar cómo aumenta en los primeros cinco días, donde el organismo del sujeto de experimentación reacciona al agente externo

(pellet de algodón), pero se ve claramente una disminución del porcentaje de células T CD8⁺ entre más días se permite el desarrollo de la inflamación. El conteo bajo de linfocitos T positivos a CD8 se ve claramente en enfermedades como el COVID-19, por ejemplo, de acuerdo con Diao y colaboradores (2020), en su estudio analizaron la tormenta de citocinas que afectan la gravedad del COVID-19. En el estudio de Diao, los pacientes enfermos tenían un número significativamente bajo de células T (CD4 y CD8), una correlación negativa con la supervivencia del paciente. Si se correlacionan los datos de los pellets y el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con los datos obtenidos del agotamiento de células T en COVID-19, bien puede inferirse que los linfocitos T CD8 positivos están entrando al estado de agotamiento.

Basándose en las características del estado de agotamiento de células T, se esperaría que las citocinas anti y proinflamatorias se comportaran del mismo modo como se ha reportado en diferentes enfermedades que inducen inflamación crónica como en LCMV, cáncer, COVID-19, entre otras, pero en todos los grupos experimentales, exceptuando control, MCP-1 e IL-6 en el grupo de experimentación de 10 días, no se encontraron diferencias significativas. Tampoco hay aumentos significativos en cuanto más tiempo se deja el pellet como inductor de inflamación crónica como se describe en estudios de COVID-19. Para entender la actividad de las citocinas en el agotamiento de células T se comparó lo reportado por esta enfermedad. Diao al observar a pacientes con COVID-19, correlacionó el número de células T y las citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10, los autores encontraron que TNF, IL-6 e IL-10 aumentaron significativamente en pacientes infectados, y el análisis estadístico resultó en que los niveles de estas citocinas fueron significativamente más altos en pacientes que se encontraban en cuidados intensivos que en pacientes sin cuidados intensivos, en cambio, en los niveles de IFN, IL-2 e IL-4 no se mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Así también se observó una relación de IL-10, IL-6, TNF e IFN con el recuento de células T en el desarrollo de la enfermedad por COVID-19; se encontró un aumento de estas citocinas al inicio de la enfermedad, pero disminuyeron significativamente en su resolución en comparación con el desarrollo de la enfermedad. Mientras que los recuentos de células T totales, CD4, y CD8 se

recuperaron durante la resolución. Esto sugiere que la disminución de las células T observada en pacientes con COVID-19 puede ser resultado de una alta concentración sérica de TNF, IL-6 e IL-10 que regulan negativamente la supervivencia o proliferación de las células T (Diao, et al., 2020), esto explicaría la disminución que se observó de linfocitos T positivos a CD8 entre los grupos de experimentación de 20 y 30 días de inflamación con pellet (**gráfica 2**) infiriendo así que el recuento bajo de estos dos grupos experimentales es consecuencia de una resolución de la inflamación y no de un agotamiento de células T.

Seeman y colaboradores (2017), en su trabajo encontraron que dentro de los modelos que utilizaron para inducir inflamación aguda y crónica, el tratamiento con LPS (lipopolisacáridos) y PCI (contaminación e infección peritoneal), los niveles séricos de citocinas proinflamatorias aumentaron rápidamente y se recuperaron después de 72 horas. Esto indica que el modelo de LPS de inflamación sistémica resultó ser el más adecuado cuando se está interesado en el impacto de nuevas terapias para la inflamación aguda, resultados que son similares al presente trabajo.

Con lo anterior mencionado, se puede comparar que la expresión de citocinas es similar a la superación del desarrollo de una inflamación aguda y no un proceso de inflamación crónica y tormenta de citocinas. Se infiere una similitud al fenómeno de tolerancia inmune en cuanto a la persistencia del granuloma del pellet de algodón. El granuloma se describe como una respuesta típica de los procesos inflamatorios crónicos ya que en la reacción de la inflamación aguda no tiene la capacidad de eliminar el agente externo, sin embargo, durante la formación del granuloma se da un incremento en el número de fibroblastos, la síntesis de colágeno y mucopolisacáridos para aislar dentro del tejido afectado un cuerpo extraño (Olajide, et al., 2000; Arul, et al., 2005), lo que resultaría en la tolerancia inmune. Esta última se define como la incapacidad del sistema inmune de producir una respuesta específica ante un antígeno propio o extraño, que es inducida por un contacto previo de dicho antígeno (Casariego, 2016), lo cual explicaría por qué el ratón no responde al estímulo del pellet de algodón como inductor de inflamación después de los 15 días.

9. Conclusiones.

Se determinó indirectamente la cantidad de células infiltradas en los pellets mediante peso húmedo y peso seco, se identificó la población de linfocitos positivos a CD8 en sangre periférica y se cuantificó citocinas pro y antiinflamatorias reportadas en el agotamiento de células T CD8⁺. Sin embargo, no se generó un modelo *in vivo* de agotamiento de linfocitos T con el modelo de inflamación con pellet de algodón al sólo inducir una aparente inflamación aguda cuya resolución ocurre después de los 15 días.

10. Perspectivas.

- Usar el modelo de pellet de algodón como inductor de inflamación crónica con el receptor PD-1 (reportado en el agotamiento de células T CD8⁺) bajo las mismas condiciones para confirmar los resultados reportados en este trabajo.
- Realizar la colocación de diferentes tamaños del pellet de algodón para comparar el efecto del pellet y el granuloma como inductor de inflamación en los diferentes tiempos establecidos en este trabajo.

11. Financiamiento.

Este trabajo de tesis se realizó con el apoyo de los proyectos PAPIIT de la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM PAPIIT IN 222721, "Uso de un nanosistema liposomal para reducir el síndrome de activación de macrófagos y agotamiento de células T", en el laboratorio de Oncología Celular L-4 PB de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

12. Bibliografía.

- Agnellini, P., Wolint, P., Rehr, M., Cahenzli, J., Karrer, U. y Oxenius, A. (2007). Impaired NFAT nuclear translocation results in Split exhaustion of virus-specific CD8+ T cell functions during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104:4565-4570. doi: 10.1073/pnas.0610335104
- Arts RW, Joosten L, Netea M. (2018). The potential role of trained immunity in autoimmune and autoinflammatory disorders. *Front Immunol* [Internet]; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00298>
- Arul, V., Miyazaki, S. y Dhananjayan, R. (2005). Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of the leaves of *Aegle marmelos* Corr. *J Ethnopharmacol*: 159-163. DOI: 10.1016/j.jep.2004.09.013
- Balusu S, Van Wonterghem E, De Rycke R, Raemdonck K, Stremersch S, Gevaert K, et al. (2016). Identification of a novel mechanism of blood brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles. *EMBO Mol Med.* 016 Oct 4;8(10):1162-1183.doi: 10.15252/emmm.201606271.
- Blattman, J.N., Wherry, E.J., Ha, S.J., van der Most, R.G., y Ahmed, R. (2009). Impact of epitope on PD-1 expression and CD8 T-cell exhaustion during chronic infection. *J Virol.*, 2009 May;83(9), 4386-4394. doi: 10.1128/JVI.02524-08.
- Bordini, A., et al. (2015). Dairy products and inflammation: a review of the clinical evidence., *Crit Rev Food Sci and Nutr.* DOI: 10.1080/10408398.2014.967385
- Casariego, Z.J. (2016). Pérdida de tolerancia inmune en la etiología de las úlceras aftosas recidivantes (RAU) de la mucosa oral: la ruptura de la tolerancia inmunológica causaría injuria persistente en la mucosa bucal provocando las úlceras aftosas recurrentes (2ª parte). *Av en Odontoestomatol*, 32(3), 159-167
- Catalán, V., Frühbeck, G. y Gómez-Ambrosi, J. (2018).

- Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Skeletal Muscle of Obese Subjects, Obesity. Chapter 8., Academy Press; 163-189. ISBN: 9780128125045
- Cervantes-Villagrana, R. D., Cervantes-Villagrana, A. R. y Presno-Bermal, J. M. (2014). Mecanismos de señalización involucrados en la resolución de la inflamación. *Gac Med Mex.*;150:440-9.
 - Cerwenka, A., Carter, L., Reome, J., et al. (1998). In vivo persistence of CD8 polarized T cell subsets producing type 1 or type 2 cytokines. *J Immunol*;161: 97-105. PMID: 9647212
 - Chávez-Sánchez, F.R., Rojas-Lemus, M., Fortoul van der Goes, T.I., & Tenorio-Zumárraga, E.P. (2017). Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(5), 36-44.
 - Chen, G.Y. y Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.*; 10(12):826-37. doi: 10.1038/nri2873.
 - Cristobo Bravo T, Quirós Viqueira O, Rodríguez Bencomo D. (2015). Actualización en la detección y manejo de la sepsis en el menor de un año. *AMC [Internet]*. 2015 Oct. 19(5): 512-527.
 - Diao, B., et al. (2020). Reduction and Functional Exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* [Internet]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
 - Fajgenbaum, D. C. y June, C.H. (2020). Cytokine Storm. *N Engl J Med.* 2020 Dec 3;383(23):2255-2273. DOI: 10.1056/NEJMra2026131.
 - Filella, X., Molina, R. y Ballesta, A.M. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Formación Continuada del Médico Práctico, Med. Integral*;39(2):63-71.
 - García-Arias, Mario Ramón, Ramírez-García, Leticia, Matamoros-Mejía, Adriana Paula, Armengual-Rodríguez, Lidia Araceli, Rivera-Salgado, María Irene, Vicuña-González, Rosa

- María, Espino-Bazán, Alejandra, & Ramírez-Del Pilar, Rodolfo. (2018). Enfermedad de Castleman multicéntrica en una paciente postrasplantada de médula ósea. *Medicina interna de México*, 34(2), 321-326. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i2.1532>
- Germolec, D. R., et al., Jamie, C., et al. (eds). (2018). *Markers of inflammation. Immunotoxicity Testing: Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media. Vol. 1803. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5
 - González-Chávez, A., Elizondo-Argueta, S., Guitiérrez-Ryes, G. y León-Pedroza, J. I. (2011). Implicaciones fisiopatológicas entre inflamación crónicas y el desarrollo de diabetes y obesidad. *Cir Cir*;79:209-216.
 - González-Costa, M., y González, A.A.P. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Rev Hab Cien Med*, 18(1), 30-44.
 - González-Costa, M. y Padrón-González, A. A. (2018). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Rev Haban Cienc Méd* [Internet]. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2445>
 - Guerrero-Ríos, I.R. (2013). *Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria del Extracto Acuoso de Sanvitalia procumbens (Ojo de Gallo) en un Modelo de Ratones CD1*. TESIS. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, D.F, México.
 - Graw, F., Richter, K., Oxenius, A. y Regoes., R.R. (2011). Comparison of cytotoxic T lymphocyte efficacy in acute and persistent lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Proc. R. Soc. B.*, 278:3395-3402. doi: 10.1098/rspb.2011.0453.
 - Harty, J. Tvinnereim, A. y White, D. (2000). CD8+ T cell effectors mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 2000;18: 275-308.

- Hernández-Ruiz, J. y Becker, I. (2006). Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud Pública de México*, 48(5), 430-439.
- Iwamoto, C., Yamada, T., Ito, Y., Minoura, K. y Numata, A. (2001). Cytotoxic cytochalasans from a *Penicillium* species separated from a marine alga. *Tetrahedron*, 57:2904-2997.
- Janssen W.J., Henson P.M. (2012). Cellular regulation of the inflammatory response. *Toxicol Pathol.*;40(2):166-73.
- Jiang, H. y Chess, L. (2004). An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004;114:1198-1208.
- Kägi, D., Ledermann, B, Bürki, K., Zinkernagel, R.M. y Hengartner, H. (1996). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 1996;14: 207-232.
- Kahan, S.M. y Zajaz, A.J. (2019). Immune Exhaustion: Past lessons and New Insights from Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Viruses*, 11(2), 156.
- Khawar Babar M, Hassan Abbasi M, Sheikh N. (2016). IL-32: a novel pluripotent inflammatory interleukin, towards gastric inflammation, gastric cancer, and chronic rhino sinusitis. *Med Inflamm* [Internet]. Available from: Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8413768>
- Kotas M.E., Medzhitov R. (2015). Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell.*;160:816–827. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.010.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. y Mitchell, R.N. (2007). Acute and chronic inflammation. En: Saunders (Elsevier). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th. ed. New York: McGraw-Hill Interamericana; 2007: p. 58-31.
- Li, C.K., Wu, H., Yan, H., Ma, S., Wang, L., Zhang, M., et al. (2008). T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. *J Immunol.*, 181:5490-500. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.549

- Lucke, S., Hoene, A., Walschus, U., Anette, K. A. y Pissarek, J. W. (2015). Acute and chronic local inflammatory reaction after implantation of different extracelular porcine dermis collagen matrices in rats. *Biomed Res Int*;2015:10. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/938059/>
- Ma C.S. y Tangye S.G. (2016). Immunology: Cytotoxic T cells that escape exhaustion. *Nature*. 2016 Sep 15;537(7620):312-314. doi: 10.1038/nature19428. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27556942.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B. y Roitt, I. (2007). *Inmunología*. 7ª ed. Elsevier España, S. A., Madrid, España.
- Martínez-Nadal, N.G., Rodríguez, L.V. y Casillas, C. (1964). Isolation and characterization of sarganin complex, a new broad-spectrum antibiotic isolated from marine algae. *Antimicrobial agents y chemotherapy*. 13:1-134.
- Matiz, G. E., Franco, L. A. y Rincón, J. (2011). Actividad antiinflamatoria de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* L. (Swartz). *Rev. Univ. Ind. Santander, Salud*; 43(3): 281-287, Oct.-Dic.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*. 2002;420(6917):846-52
- Nemoto Y., Suzuki K. (2018). Prevention of dementia onset with targeting at physical activity and social participation among Japanese community-dwelling older adults. *Arch. Phys. Health Sports Med.*;1:39–43.
- Olajide, A.O., Ave, S.O., Makinde, J.M., Ekhehar, A.I., Olusola, A., et al. (2000). Studies on the antiinflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. *J Ethnopharmacol*:179-186.
- Parham, P. (2006). *Inmunología*. 2ª ed. Editorial Panamericana. Pp: 180-182.
- Parra-Izquierdo, V., Flórez-Sarmiento, C. y Romero-Sánchez, C. (2020). Inducción de “tormenta de citocinas” en pacientes infectados con SARS-CoV-2 y desarrollo de COVID-19. ¿Tiene el tracto gastrointestinal

alguna relación en la gravedad?,
Rev Colomb
Gastroenterol.2020;35(Supl 1).
DOI:
<https://doi.org/10.22516/25007440.539>

- Pérez-Antón, E., Thomas, M.C., Egui, A. y López, M. C. (2019). T-cell exhaustion process during chronic infection caused by intracellular trypanosomatids. *Ars Pharm.* 2019;60(2): 65-78. DOI: <https://doi.org/10.30827/ars.v60i2.9432>
- Pérez Martín, O.G. y Vega García, I.G. (2016). La inmunología en el humano sano para estudiantes de Ciencias Médicas. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 81-82.
- Puller, M.J., Khanolkar, A., Tebo, A.E. y Zajaz, A.J. (2004). Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections. *J. Immunol*, 172: 4204-4214.
- Roe, K. (2020). An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scand J Immunol.*
<https://doi.org/10.1111/sji.12970>
- Sánchez-Flores, J.S. (2013). Evaluación del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo); Para comprobar su actividad hipoglucemiante y antiinflamatoria. TESIS. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. D.F., México.
- Seemann, S., Zohles, F. y Lupp, A. (2017). Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *J Biomed Sci* 24, 60.
<https://doi.org/10.1186/s12929-017-0370-8>
- Shik, D. y Munitz, A. (2010). Regulation of allergic inflammatory responses by inhibitory receptors. *Clin Exp Allergy.*; 40(5):700-9.
- Siachoque, H., Valero, O. e Iglesias, A. (2013). Tolerancia inmunológica, un recorrido en el tiempo: ¿Cómo discriminar entre lo propio y lo extraño? *Revista Colombiana de Reumatología*;20(4):237-249.

- Suzuki K. (2019). Chronic Inflammation as an Immunological Abnormality and Effectiveness of Exercise. *Biomolecules*, 9(6), 223. <https://doi.org/10.3390/biom9060223>
- Swingle, K.F. y Shiderman, F.E. (1972). Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. *J Pharmacol Exp Ther*, 1972;183(1):226-34.
- Takeuchi O., Akira S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*;140:805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Trapani, J. y Smyth, M. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2: 735-747.
- Verma, N.D., Hall, B.M., Plain, K.M., Robinson, C.M., Boyd, R., Tran, G.T., Wang, C., Bishop, G.A. y Hodgkinson, S.J. (2014). Promotes Induction of Highly Potent TH1-Like CD4+CD25+ T Regulatory Cells That Inhibit Allograft Rejection in Unmodified Recipients. *Frontiers in Immunology*, Vol. 5. Doi:10.3389/fimmu.2014.00190
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 12:492-9. 10.1038/ni.2035
- Wiesel, M., Joller, N., Ehlert, A.K., Crouse, J., Spörri, R., Bachmann, M.F. y Oxenius, A. (2010). Th cells act via two synergistic pathways to promote antiviral CD8+ T cell responses. *J. Immunol.*, 185:5188-5197.
- Wiesel, M. y Oxenius, A. (2012). From crucial to negligible: functional CD8+ T-cell responses and their dependence on CD4+ T-cell help. *Eur. J. Immunol*. 42:1080-1088.
- Wooland, D. y Dutton, R. (2003). Heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol* 2003;15: 336-342.
- Zamora-Rodríguez, Z., Mollina, V., Mena, L. y Nodal, C. (2017). Efecto anti-inflamatorio de la terapia combinada del D-002 y Lyprinol en un modelo de inflamación crónica. *Rev CENIC, Ciencias Biológicas*, Vol. 48, Núm. 1, pp. 6-11, Centro Nacional

de Investigaciones Científicas, La
Habana.