

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

Papel de las células T reguladoras en la protección contra
Toxoplasma gondii en el modelo murino

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JONADAB EFRAÍN OLGUÍN HERNÁNDEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAFAEL SAAVEDRA DURÁN
(2010)



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.

Hoja de datos del jurado

1.- Datos del alumno

Nombre: Jonadab Efraín Olguín Hernández

Teléfono: 04455-3662-60-71

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Carrera: Biología

Número de cuenta: 30206793-0

2.- Datos del Tutor (Secretario)

Grado y nombre: Dr. Rafael Saavedra Durán

3.- Presidente del jurado:

Grado y nombre: Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

4.- Vocal del jurado:

Grado y nombre: Dra. Laura del Carmen Vargas Parada

5.- Suplente 1:

Grado y nombre: Dra. Diana Elodia Aguilar León

6.- Suplente 2:

Grado y nombre: Dra. Jacqueline Fernández Vargas

7.- Datos del trabajo escrito:

Título: Papel de las células T reguladoras en la protección contra *Toxoplasma gondii* en el modelo murino

Número de páginas: 114 p

Año: 2010

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en el laboratorio del Dr. Rafael Saavedra Durán. Se financió con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Proyecto PAPIIT IN-200608), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CONACYT 79775 y 102984) y del SNI – Estudiantes del fondo CONACYT (102399).

Esta tesis la dedico a la Universidad Nacional Autónoma de México. Te agradezco que me hayas dado la guía que necesitaba en mi vida. Por ti soy lo que soy.

A la memoria de mis abuelos, sé que hubieran estado orgullosos de leer esto. Los extraño... Agus, Cey, Mary y Ángel.

A mis papás: Alfredo y Esther. Por su amor, cariño, enseñanzas y regaños... sin ellos no hubiera llegado hasta aquí. Los amo.

A mis hermanas Miriam y Jemily. Las quiero con todo mi corazón.

A mi familia Olgún, gracias...,
Al amor que siento por ti, mi Gina...
Gracias por tu apoyo Isra... amigo.

A todos los amigos que me ha dado
la vida desde el kinder hasta la facultad...
Su amistad ha sido de gran ayuda.

Gaby, Lalo y Michelle...
No saben cuanto apoyo
he recibido de ustedes, gracias por existir, los quiero...

A todos los profesores y personas que me han indicado
el camino a seguir, gracias a ustedes hoy doy este paso.

A mi querido amigo, quien dio
un giro total a mi vida y le dio
sentido a mi carrera. Gracias por
sus enseñanzas, por su paciencia y
¡por las multas!... Gracias Dr. Rafael Saavedra...
lo admiro mucho...

A mis amigos del laboratorio: Eda, Jacqueline, Pablo y
Nohemí... gracias por sus consejos y su apoyo.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Jacqueline Fernández Vargas y a la MVZ. Georgina Díaz Herrera, por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto.

INDICE

Agradecimientos	7
INDICE	8
I. INTRODUCCIÓN	11
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.1. Características generales	12
1.1.1. Taquizoíto.....	13
1.1.2. Quiste (bradizoíto).....	13
1.1.3. Ooquiste	16
1.2. Ciclo de vida	16
1.3. Organelos.....	19
1.4. Genotipos	20
1.5. Epidemiología.....	21
1.6. Patología	23
1.7. Diagnóstico, tratamiento y prevención.	24
1.8. Respuesta inmune.....	25
2. Células T reguladoras	27
2.1. Antecedentes.....	27
2.2. Definición y distintas subpoblaciones de Tregs.....	28
2.3. Marcadores de superficie y Foxp3.....	32
2.4. Mecanismos de supresión	35
2.5. Participación de las Tregs en infecciones y su utilización en terapias.....	40
II. JUSTIFICACIÓN	42
III. OBJETIVO	42
IV. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42

V.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
1.	Animales utilizados	43
2.	Obtención de células de sangre	43
3.	Obtención de células de bazo	43
4.	Obtención de cerebros	44
5.	Cultivos celulares <i>in vitro</i>	45
5.1.	Descongelación de células	45
5.2.	Congelación de células.....	45
5.2.1.	Células en suspensión	45
5.2.2.	Células adherentes	45
5.2.3.	Hibridomas	46
5.2.4.	Fibroblastos humanos	46
6.	Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	47
6.1.	Cepa Me49.....	47
6.2.	Cepa RH.....	48
7.	Purificación de anticuerpos monoclonales (mAbs)	48
7.1.	Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄	48
7.2.	Geles SDS-PAGE.....	49
8.	Depleción de células CD25 ⁺	50
9.	Citometría de flujo	50
9.1.	Inmunofluorescencia directa	50
9.1.1.	En células de bazo	50
9.1.2.	En células de sangre	51
9.1.3.	Determinación de Foxp3.....	51
9.1.4.	Captura y análisis de poblaciones celulares	52
10.	Análisis estadístico.....	52

VI. RESULTADOS.....	53
1. Obtención y purificación del anticuerpo PC61 anti-CD25.....	53
2. Montaje de la técnica de depleción de células CD25 ⁺ <i>in vivo</i>	55
3. Análisis de la depleción de células CD25 ⁺ en sangre	59
4. Determinación del papel de las células Tregs durante la infección con la cepa Me49.....	61
5. Participación de las células Tregs durante la infección con una cepa tipo I de <i>T. gondii</i> ...	73
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	82
VIII. APÉNDICE.....	92
1. Soluciones Utilizadas	92
1.1. Generales.....	92
1.2. En cultivos celulares.....	92
1.3. En precipitación	93
1.4. En electroforesis.....	94
1.5. En inmunofluorescencia	96
1.5.1. Anticuerpos utilizados.....	96
1.5.2. Foxp3	96
IX. ABREVIATURAS	114

I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 15 años se ha observado el resurgimiento en distintos campos de la investigación científica de las células T reguladoras (Tregs). Aún cuando son una población celular muy pequeña (representan del 4 al 10% de las células T CD4⁺ periféricas), tienen un papel protagónico no sólo en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio, sino también en el control de la actividad efectora del sistema inmune a agentes externos. Se ha estudiado su participación en enfermedades como el cáncer, alergias y autoinmunidad; en desórdenes durante el embarazo y, siendo de principal interés, en enfermedades infecciosas.

El trabajo aquí presente explica, cuál es la participación de las células Tregs durante la infección con *Toxoplasma gondii*. La técnica utilizada es por depleción de células CD25⁺. Nuestros resultados nos indican que las células Tregs participan en la protección de los animales durante la infección con una cepa avirulenta (Me49), mientras que durante la infección con una cepa virulenta (RH), parece que participan de una manera adversa.

1. *Toxoplasma gondii*

1.1. Características generales

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular obligado. Su hospedero definitivo son los felinos en su mayoría, mientras que cualquier animal de sangre caliente puede ser su hospedero intermediario [1]. Su clasificación de acuerdo a 6 categorías taxonómicas es la siguiente:

Categoría taxonómica	Taxón	Autor, año
Phylum	Apicomplexa	Levine, 1970
Clase	Sporozoea	Leukart, 1879
Subclase	Coccidia	Leukart, 1879
Orden	Eimeriorina	Leger, 1911
Familia	Sarcocystidae	Biocca, 1956
Especie	<i>Toxoplasma gondii</i>	Nicolle & Manceaux, 1908

El phylum Apicomplexa, que incluye patógenos del hombre como *Plasmodium* y *Cryptosporidium* y de animales como *Eimeria*, *Sarcocystis* y *Neospora*, se define por la presencia de un complejo de organelos secretores apicales: roptrias, micronemas y gránulos densos (Fig. 1), y por la presencia de un organelo endosimbiótico, el apicoplasto. *Toxoplasma gondii* presenta 3 estadios dentro de su ciclo de vida.

1.1.1. Taquizoíto

El término “taquizoíto” (del griego *Tachos*, rápido), se propuso en 1973 por Frenkel [2] para describir la etapa de *T. gondii* que se multiplica rápidamente en cualquier tipo celular de sus hospederos intermediarios y en cualquier célula no epitelial del intestino de sus hospederos definitivos. Esta forma del parásito se asocia con la fase aguda de la infección; se multiplica rápidamente en cualquier tipo celular de cualquier animal de sangre caliente. Tiene un tamaño de $2 \times 6 \mu\text{m}$. Una característica de su morfología ultraestructural es que el núcleo se localiza al centro. Aunque este parásito no presenta medios de locomoción como cilios, flagelos o pseudópodos, se puede mover por ondulación y rotación. Se reproduce asexualmente, por un mecanismo semejante a la fisión binaria llamado endodiogenia, en el que se forman 2 células hijas que al crecer, ocupan todo el citoplasma de la célula madre, la cual termina por desaparecer (Fig. 2) [3].

1.1.2. Quiste (bradizoíto)

Bradizoíto proviene del griego *brady*, que significa lento y describe la etapa enquistada del parásito en los tejidos. El quiste (Fig 3), se asocia con la etapa crónica de la infección, pero los bradizoítos se pueden formar a partir de los 3 días post-infección. Los quistes contienen dentro a los bradizoítos que se dividen por endodiogenia (Fig. 2). Los quistes varían en tamaño, ya que pueden tener $5 \mu\text{m}$ de diámetro y contener 2 bradizoítos, hasta tener $100 \mu\text{m}$ de diámetro con miles de bradizoítos dentro. Aunque se pueden encontrar quistes en cualquier tejido, se encuentran principalmente en tejidos neuronales y musculares incluyendo el cerebro, los ojos y los músculos esquelético y cardíaco. Aunque el taquizoíto y el bradizoíto tienen una estructura muy semejante, una forma en que se pueden diferenciar es por la ubicación del núcleo, ya que los bradizoítos lo tienen hacia la parte posterior (Fig 4), mientras que en los taquizoítos se ubica al centro (Fig 1) [4].

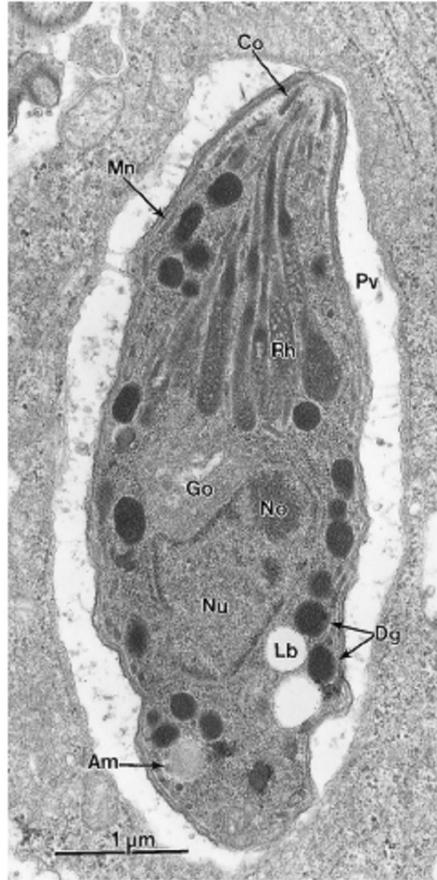


Figura 1. Organelos de un taquizoíto de *T. gondii*. Mn: micronemas., Rh: roptrias., Dg: gránulos densos., Pv: vacuola parasitófora., Go: Aparato de golgi., Nu: núcleo., No: nucleolo. Estos organelos secretorios característicos del phylum Apicomplexa se encuentran en la región apical. Micrografía tomada de la referencia 2

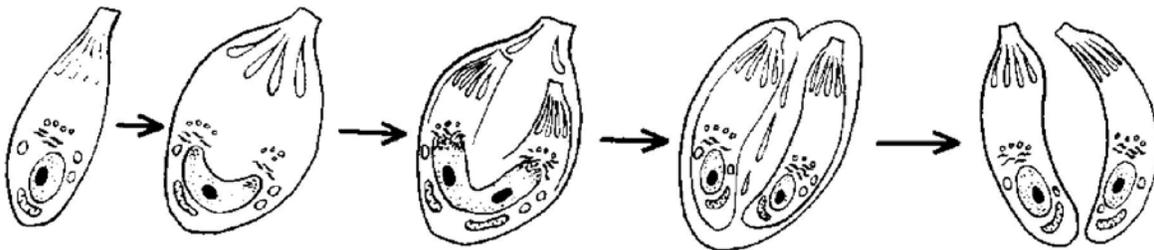


Figura 2. Reproducción asexual por endodiogamia. A partir de una célula que se replica, se forman 2 células hijas que ocupan el citoplasma de la célula madre, que termina por desaparecer.

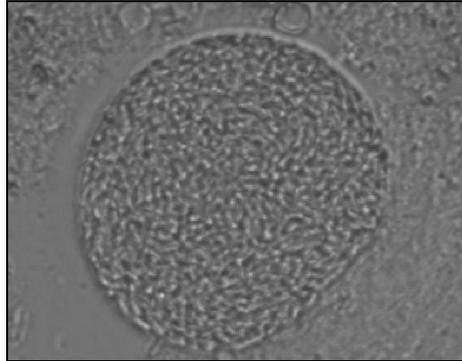


Figura 3. Quiste de *T. gondii*. En el interior del quiste se pueden observar bradizoítos. Fotografía vista a 20x. Se tomó del macerado de cerebro de ratón C57BL/6J de nuestro laboratorio, 30 días post-infección

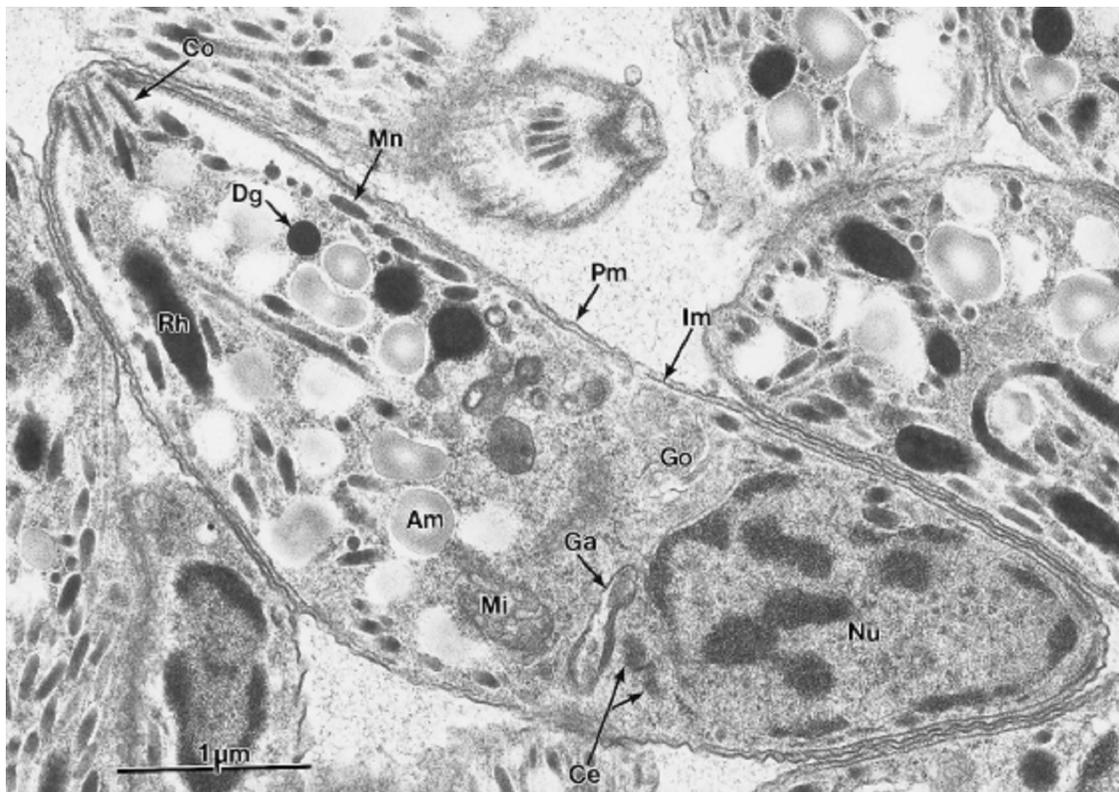


Figura 4. Bradizoíto de *T. gondii*. Aunque tiene una morfología muy semejante y los mismos organelos que el taquizoíto, el bradizoíto presenta el núcleo (Nu) hacia la parte inferior de la célula. Micrografía tomada de la referencia 2.

1.1.3. Ooquiste

Los ooquistes son secretados en las heces de los gatos infectados en su forma no esporulada (no son infectivos). Tienen una forma esférica de 10x12 μm de diámetro. La esporulación del ooquiste ocurre de 1 a 5 días después de la excreción, dependiendo de las condiciones del medio (aire y temperatura). El ooquiste esporulado es de forma elipsoidal, de 11x13 μm de diámetro. Cada ooquiste contiene 2 esporoquistes que contienen 4 esporozoítos, en total 8 esporozoítos (Fig. 5). Los protozoarios pertenecientes a la subclase coccidia se clasifican de acuerdo a la estructura del ooquiste; si éste contiene 4 esporoquistes, cada uno con 2 esporozoítos (en total 8 esporozoítos), se clasifica en el género *Eimeria*, pero si contienen 2 esporoquistes cada uno con 4 esporozoítos, son clasificados en el género *Isospora*. *T. gondii* tiene un ciclo de vida tipo *isospora*, por sus 2 esporoquistes (Fig. 5) [5].

1.2. Ciclo de vida

Casi todas las especies pertenecientes al orden felidae son los hospederos definitivos de *T. gondii*. Estos animales pueden infectarse por la ingestión de agua contaminada por ooquistes, por vía transplacentaria o por la ingestión de carne contaminada con quistes (Fig. 6). Cuando se ingieren quistes, su capa externa se rompe por enzimas proteolíticas en el estómago y en el intestino delgado del gato. Los bradizoítos liberados penetran las células epiteliales del intestino y comienzan el desarrollo de 5 etapas antes del inicio de la gametogonia. Después del desarrollo asexual comienza la etapa sexual que da lugar a microgametos (masculinos) y macrogametos (femeninos). Los microgametos utilizan su flagelo para penetrar y fertilizar microgametos maduros y así formar cigotos. Después de la formación del cigoto se forma una pared alrededor de él, lo que da lugar a la formación del ooquiste. Las células del epitelio intestinal infectadas se rompen y descargan los ooquistes al lumen intestinal. Los gatos pueden liberar miles de ooquistes no esporulados

en las heces en un corto periodo de tiempo y por pocos días. Si las condiciones del ambiente son las adecuadas, los ooquistes esporulan (Fig. 6) y tienen la capacidad de sobrevivir por un largo periodo de tiempo bajo condiciones ambientales normales; por ejemplo, pueden vivir meses o años en el suelo y por lo tanto pueden contaminar agua, vegetales, y ser dispersados por una amplia gama de animales invertebrados (moscas, gusanos, cucarachas) y vertebrados (ratones, ratas y aves). Los humanos y cualquier animal de sangre caliente pueden adquirir toxoplasmosis por el consumo de ooquistes presentes en toda la lista descrita anteriormente (Fig. 6). Después de la ingestión de ooquistes esporulados, las condiciones de pH del estómago favorece el rompimiento del ooquiste y la liberación de esporozoítos, los cuales penetran a las células del epitelio intestinal y son llevados hacia la lámina propia donde se multiplican en distintos tipos celulares incluyendo el endotelio vascular, fibroblastos, células mononucleares y leucocitos, pero nunca en los eritrocitos [6]. Los esporozoítos se convierten en taquizoítos los cuales se multiplican rápidamente e invaden cualquier tipo celular (Fig. 7), y éstos a su vez (por mecanismos de estrés como el sistema inmune), se convierten en bradizoítos y se enquistan [7]. Los quistes persisten durante toda la vida del hospedero (Fig 7), por lo que otra fuente de infección, es el consumo de carne cruda o mal cocida contaminada con quistes. En el caso de los hospederos inmunosuprimidos, puede ocurrir la reactivación de la enfermedad latente (Fig. 7). La infección congénita se presenta si la madre se infecta con quistes u ooquistes durante el embarazo porque el parásito, en forma de taquizoíto, entra en contacto con el feto vía placenta (Fig 6) [8].

De los 3 estadios de *T. gondii* descritos anteriormente, el taquizoíto y el bradizoíto se asocian con el hospedero intermediario, mientras el esporozoíto con el hospedero definitivo. El taquizoíto es el responsable de la expansión de *T. gondii* dentro del hospedero, mientras que el bradizoíto y el esporozoíto son capaces de transmitir la infección a otro hospedero.

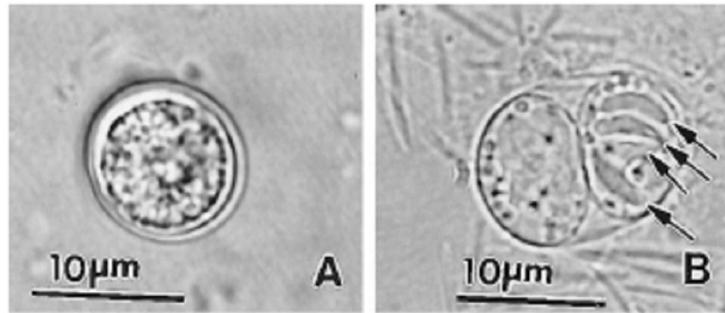


Figura 5. Ooquiste de *T. gondii*. A) ooquiste no esporulado. B) Ooquiste con 2 esporozoites; el de la derecha con 4 esporozoitos y el de la izquierda en proceso de esporulación. Tomado de referencia 2.

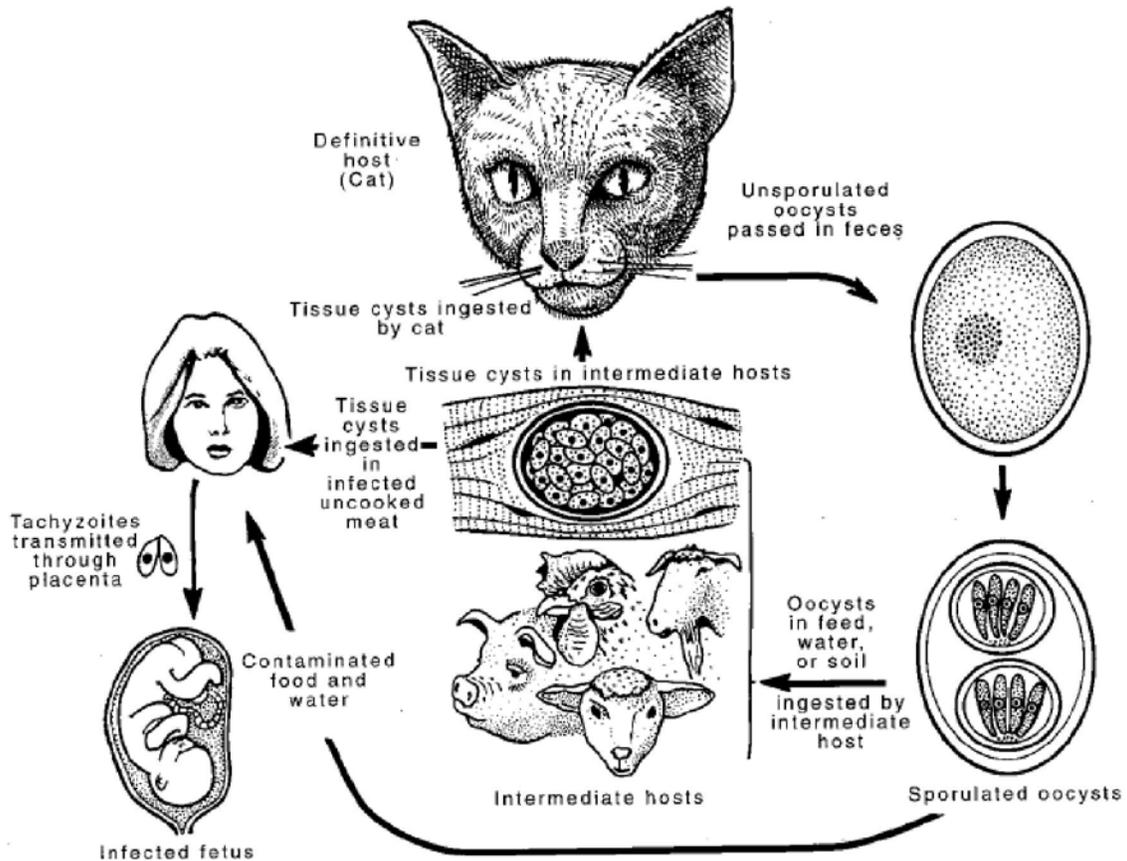


Figura 6. Ciclo de vida de *T. gondii*. Imagen tomada de referencia 2.

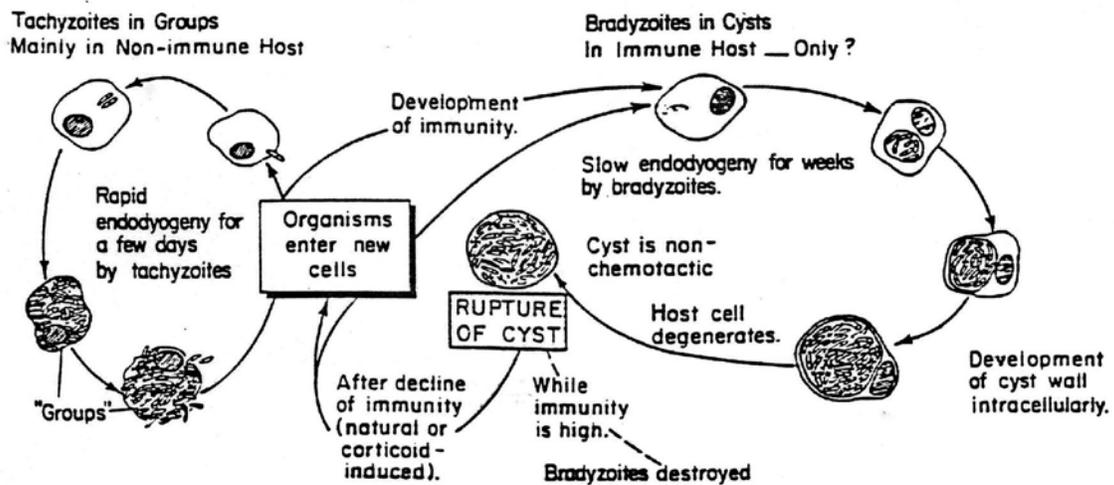


Figura 7. Desarrollo de *T. gondii* en el hospedero intermediario. Imagen tomada de referencia 3.

1.3. Organelos

La morfología del taquizoíto comprende un único citoesqueleto, organelos secretores (roptrias, micronemas y gránulos densos), organelos derivados por endosimbiosis (mitocondria y apicoplasto) y organelos eucariontes universales (núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas) (Fig 1) [9].

Los micronemas y roptrias se ubican en la parte más apical, mientras que los gránulos densos se ubican en todo el citoplasma. Estos organelos secretores participan en la invasión celular hacia el hospedero y en la formación de la vacuola parasitófora que evita la fusión del fagosoma y el lisosoma, lo que protege al parásito durante su desarrollo intracelular y favorece la formación de quistes en el hospedero [10].

El núcleo ocupa la región central o basal, dependiendo de la etapa invasiva (como se mencionó anteriormente). Por detrás del aparato de Golgi se encuentra el apicoplasto; este organelo específico del phylum Apicomplexa se había descrito desde principios de los 60's, pero fue descrito hasta 1997 como un plastidio típico. Tiene 500 nm de diámetro, posee 4 membranas y en su interior presenta contenido filamentosos y granular en el cual

se pueden observar ribosomas. Se propone que el origen de las 4 membranas pudo resultar de la fagocitosis de un alga verde que ya era parte de una endosimbiosis [11].

1.4. Genotipos

Cuando se realizó la genotipificación de distintas poblaciones de *T. gondii* por polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), se reveló que existe una muy baja variación genética [12;13]. La clonalidad entre los aislados de *T. gondii* es alta porque se han encontrado cepas con genotipos idénticos en regiones geográficas distintas [14]. *T. gondii* tiene una estructura de población que se clasifica en 3 linajes o cepas (I, II y III).

La presencia de una fase sexual en el ciclo de vida de *T. gondii*, podría predecir una alta diversidad genética entre las distintas cepas que conforman a la especie. Sin embargo, la alta clonalidad de *T. gondii* indica que la propagación en la naturaleza ocurre predominantemente por replicación asexual, o sea, en forma de quiste. Para que existiera diversidad genética derivada de la fase sexual, necesitaríamos que un hospedero definitivo se infecte con 2 genotipos diferentes de *T. gondii*, lo cual es muy poco probable. Las diferencias biológicas entre las 3 cepas de *T. gondii* se reflejan en el crecimiento, la infectividad, la patogénesis y la virulencia. Las cepas pertenecientes al tipo I son altamente virulentas en ratones ($LD_{100} = 1$). [15] La virulencia de las cepas tipo I es independiente del fondo genético del ratón y si es una cepa singénica o no. Se había sugerido que la virulencia de la cepa RH (de uso común en el laboratorio, tipo I) se debía a los pasajes continuos de la cepa desde que fue aislada en 1941; sin embargo, más de 20 cepas tipo I aisladas recientemente comparten el fenotipo de alta virulencia en ratones, indicando que la virulencia se correlaciona con el genotipo del parásito y no con los pasajes [16]. Las cepas tipo I se han aislado de una gran variedad de animales de granja, incluyendo cerdos, vacas y cabras, y de humanos en Norteamérica, Europa y otras partes

del mundo. Presenta un alto nivel de replicación *in vitro* y no hay interconversión taquizoíto-bradizoíto [15].

La toxoplasmosis causada por cepas tipo II es lo más frecuente en infecciones humanas y animales en Norteamérica y Europa [17;18]. La mayoría de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) infectados con *T. gondii* y casos de infección congénita, son causados por cepas tipo II [19]. Estas cepas son relativamente no virulentas en el modelo murino y en el humano, pero mucho depende del fondo genético del hospedero que afecta la interacción hospedero-parásito. Por ejemplo, la cepa de ratón C57BL/6J es susceptible a la infección con la cepa Me49 (Tipo II) de *T. gondii* [20], mientras que la cepa BALB/c es resistente. La infección por cepas tipo II conlleva a una infección crónica con persistencia de quistes en los tejidos del hospedero durante toda su vida. Presenta un nivel muy lento de replicación *in vitro* y una fácil interconversión taquizoíto-bradizoíto. La $LD_{50} \geq 10^3$ taquizoítos [15].

Las cepas tipo III son raras entre los aislados originados de Europa y Norteamérica. Se han encontrado en aislados provenientes de animales salvajes, de áreas remotas o distantes o de enfermedades humanas inusuales [15]. A diferencia de las tipo II, las cepas tipo III tienen un nivel de replicación alto, semejante a las cepas tipo I [21], pero su letalidad se asemeja a las cepas tipo II, por lo que son no virulentas. La baja letalidad de la cepa conlleva a una infección crónica al igual que las cepas tipo II. La $LD_{50} \geq 10^2$ taquizoítos [22].

1.5. Epidemiología

T. gondii se distribuye en todo el mundo. La seroprevalencia en Europa es alta. Un estudio multicéntrico que incluyó países como Bélgica, Dinamarca, Italia y Francia, entre otros, identificó el consumo de carne cruda o poco cocida como factor de riesgo para adquirir toxoplasmosis [23]. En Centroamérica la seroprevalencia es muy alta, pero las

causas son diferentes, ya que el factor de riesgo para adquirir toxoplasmosis en estas regiones es el alto índice de gatos callejeros sumado a que el clima favorece la permanencia de los ooquistes en el ambiente. En Brasil, la toxoplasmosis está asociada a un nivel socioeconómico bajo. La seroprevalencia es de menor índice en Asia [24]. Se ha descrito la toxoplasmosis en todo México, con alta seroprevalencia en las costas con clima cálido, pero también se presenta en el centro del país [25]. Todo lo anterior se resume en la Fig. 8. También el consumo de frutas y verduras contaminadas por ooquistes puede ser un foco de infección. Aún con las diferencias entre estas regiones del mundo, la principal vía de infección natural es la vía oral. Otra forma de transmisión es el trasplante de órganos de un donador seropositivo a uno seronegativo. Es muy raro infectarse por vía sanguínea, pero también se han dado casos [26]. En el laboratorio la forma de infección es por contacto con jeringas con taquizoítos o por contacto por vía oral con quistes [27].

Continents and countries	Year	Seropositivity (%)
Western Europe		
Austria	1998	43
Belgium	1997	50
France	2001	Up to 75
Germany	2004	26-54
Italy	2001	18-60
The Netherlands	2004	40.5
Spain	2004	28.6
Switzerland	1995	46
Scandinavia		
Denmark	1999	27.8
Finland	1995	20.3
Norway	1998	10.9
Sweden	2001	14.0-29.4
Central and Eastern Europe		
Croatia	2000	38.1
Poland	2001	46.4-58.5
Slovenia	2002	34
UK	1998	57-93
Yugoslavia	1992	23-33
The Americas		
USA	2004	16-40
Central America		
Costa Rica	1996	76
Cuba	1993	60
Mexico	2001	35
Panama	1988	90 (at 60 years of age)
South America		
Argentina	2001	72
Brazil	2001	59
West Indies	1991	29.7
Southeast Asia		
Indonesia	2000	58 ^a
Malaysia	2004	44.8
Thailand	1992, 1997, 2000, 2001	2.3-21.9

^aMale:female ratio = 63:52.

Figura 8. Niveles de seropositividad en Europa, América y el sureste de Asia. México presenta un 35% de seropositividad según un estudio hecho en 2001. Figura tomada de referencia 16.

1.6. Patología

La infección primaria por *T. gondii* es asintomática en 90% de los casos. En el 10% restante presentan síntomas no específicos de la infección: miocarditis, encefalitis, hepatitis linfadenopatía, entre otros [28].

En contraste con el curso asintomático en personas inmunocompetentes, la toxoplasmosis puede ser un gran factor de riesgo para las personas inmunocomprometidas. La mayoría de casos se debe a la reactivación de la infección latente, porque el sistema inmune no tiene la facultad de controlar la infección (Fig. 7). El sistema nervioso central es el principal sitio afectado, generando encefalitis, confusión y demencia. No sólo las personas con SIDA se consideran dentro del grupo de pacientes inmunocomprometidos, también aquéllos que se les haya transplantado un órgano o tengan cáncer y que estén en terapia con inmunosupresores [29].

En los humanos, el ganado y otros mamíferos superiores, la infección congénita se presenta si la madre se infecta durante el embarazo. Después de la adquisición de *T. gondii* durante el embarazo, el parásito entra en contacto con el feto vía placenta. La adquisición de la infección antes del embarazo no implica ningún riesgo al feto. La frecuencia de la transmisión y la severidad de la infección están inversamente relacionadas. La infección durante el primer o segundo trimestre resulta en toxoplasmosis congénita severa o aborto espontáneo del feto. En cambio, la infección durante el tercer trimestre resulta en un alumbramiento normal; en estos casos la infección pasa desapercibida pero si no es tratada, se puede desarrollar coriorretinitis o crecimiento retrasado en la segunda o tercer década de vida. La detección temprana y el tratamiento de la madre durante el embarazo reduce la frecuencia de la infección fetal cerca del 60% [30].

1.7. Diagnóstico, tratamiento y prevención.

La infección por *T. gondii* se puede diagnosticar de manera indirecta con métodos serológicos y de manera directa por PCR y aislamiento del parásito. Los métodos serológicos son usados en personas inmunocompetentes (a partir de muestras de sangre). La detección directa del organismo incluye cultivo celular, inoculación de ratones o PCR para extraer DNA de *T. gondii* a partir de fluidos cerebrospinales y/o sangre. Lo anterior facilita el diagnóstico en personas inmunocomprometidas y en recién nacidos con sospecha de enfermedad congénita [31].

Niños y adultos inmunocompetentes con toxoplasmosis usualmente no requieren de tratamiento al menos que los síntomas sean severos o persistentes. Después de haber diagnosticado la infección, el tratamiento incluye la combinación de pirimetamina, sulfadiazina y ácido fólico por 4 ó 6 semanas dependiendo de la condición del paciente [32].

Para prevenir la adquisición de toxoplasmosis, es necesario cumplir con reglas de higiene comunes como el lavarse las manos antes de comer, ingerir carne bien cocida, lavar frutas y verduras antes de consumirlas, hervir el agua de consumo, cambiar continuamente la arena de los gatos para evitar la esporulación de los ooquistes y utilizar guantes durante la manipulación de las heces [33].

1.8. Respuesta inmune

La primer etapa para que el sistema inmune del hospedero pueda actuar contra *T. gondii* es el reconocimiento. Estudios iniciales de los mecanismos de este reconocimiento indican que la ciclofilina 18 derivada del parásito se une al receptor de quimiocinas CCR5 que se encuentra en células dendríticas. Esta unión estimula la producción de IL-12 por parte de estas células (Fig 9). Se ha demostrado que en ausencia de CCR5 existe disminución en la producción de IL-12 y esto incrementa la susceptibilidad a *T. gondii* durante la fase crónica de la infección [34;35].

La otra vía de reconocimiento de *T. gondii* descrita hasta el momento es por el Receptor Tipo Toll 11 (TLR-11). Seguido de la infección con *T. gondii*, ratones carentes de MyD88, una proteína adaptadora que interviene en la vía de señalización de los TLRs, producen muy poca IL-12 en suero y son altamente susceptibles a la toxoplasmosis aguda [36]. Debido a esto, se ha tratado de demostrar la participación específica de varios TLR encontrando únicamente participación del TLR-11 al cual, se une la profilina (proteína de unión a actina) del parásito. Ratones deficientes en TLR-11 son susceptibles a la infección con *T. gondii*, y presentan una menor producción de IL-12 [37].

Las principales células productoras de IL-12 durante la infección con *T. gondii* son las células dendríticas [38]. La función principal de la IL-12 es activar a linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ [39] y células NK [40] para producir altos niveles de IFN- γ (Fig. 9). El IFN- γ es la principal citocina mediadora de la resistencia contra *T. gondii*, ya que activa macrófagos para controlar la replicación del parásito (Fig. 9) [41]. En humanos se ha demostrado que el IFN- γ activa fagocitos para producir intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno que eliminan al parásito [42;43]. La ausencia del IFN- γ o de su señalización durante la infección genera descontrol en la carga parasitaria y muerte del hospedero [44]. Por lo tanto, la carencia de IL-12 reduce los niveles de IFN- γ lo que produce falla en el control de

la infección [45]. Sin embargo, el IFN- γ requiere adicionalmente del TNF- α para activar la actividad anti-microbial de los macrófagos [46]. La protección sinérgica de estas 2 citocinas se atribuye a la sobreproducción de la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), lo cual promueve la producción de óxido nítrico, que actúa directamente en la eliminación de *T. gondii* (Fig. 9) [47].

La protección contra *T. gondii* es mediada por la respuesta inflamatoria tipo T_H1 durante la fase aguda de la infección, pero esto puede implicar inflamación severa en múltiples órganos, incluido el intestino y el hígado. Se sabe que las células CD4⁺ productoras de IFN- γ son las principales causantes de esta inflamación, y que la eliminación de estas poblaciones previene la necrosis, pero sólo en la cepa susceptible de ratón C57BL/6J [48]. Aún cuando el IFN- γ es una citocina importante para mediar la protección contra *T. gondii*, su contraparte, la IL-10, es necesaria para evitar el daño causado por una respuesta T_H1 exacerbada y mantener la homeostasis (Fig 9) [49]. Se ha demostrado que la ausencia de esta citocina es letal durante la infección con *T. gondii* en la cepa susceptible y resistente de ratón [50], debido a una respuesta T_H1 exacerbada y sin control [51]. También se ha demostrado la participación del TGF- β en la modulación de la respuesta T_H1 exacerbada en el intestino del ratón C57BL/6J [52]. Es importante mencionar que la IL-10 durante la infección con *T. gondii* no proviene de células T reguladoras como en otros modelos, sino proviene de células CD4⁺ que producen tanto IFN- γ como IL-10 [53].

Aunque la inmunidad protectora contra *T. gondii* es mediada por células T y no por anticuerpos, se ha descrito expansión de células B que producen altos niveles de IgM e IgG, lo que distingue la infección aguda de la crónica, respectivamente [54]. Se han atribuido varias funciones a estos anticuerpos, incluyendo la opsonización de parásitos extracelulares y su subsecuente fagocitosis y muerte [55]. Inclusive, ratones carentes de

células B sobreviven a la fase aguda de la infección, pero mueren de encefalitis toxoplásmica de 3 a 4 semanas post-infección [56].

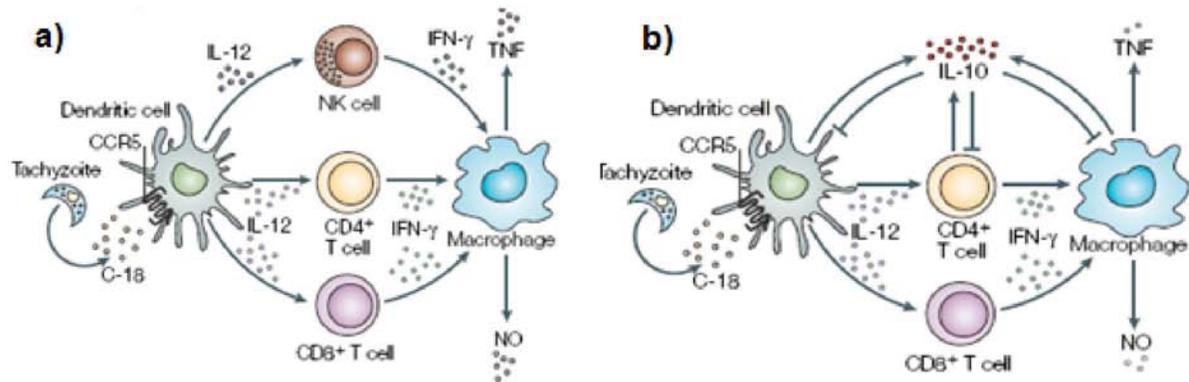


Figura 9. Respuesta inmune contra *T. gondii*. Después de reconocer a la ciclofilina 18 del parásito (C-18) por el receptor de quimiocinas CCR5, las Células dendríticas producen IL-2 que activa linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ para producir IFN-γ, el cual, activa macrófagos para producir NO que elimina a *T. gondii* generando protección (a). Para evitar una respuesta T_H1 exacerbada, interviene la IL-10 como mecanismo regulador (b). Tomado de referencia 31.

2. Células T reguladoras

El sistema inmune tiene la capacidad de proteger al hospedero no sólo de microbios patógenos, sino también de una respuesta inmune excesiva o autoinmune. De esto se encarga una población de células T, llamada células T reguladoras (Tregs), que contribuye al mantenimiento de la homeostasis inmune.

2.1. Antecedentes

A finales de los años sesentas se describieron funciones efectoras de las células T como la participación en la reacción de hipersensibilidad tipo retardada o su cooperación con las células B para producir una respuesta mediada por anticuerpos [57;58]. Estudios posteriores propusieron que las células T no sólo tenían funciones efectoras, sino también supresoras sobre la respuesta inmune. En 1971, debido a que se comenzaron a describir subpoblaciones de células T, se sugirió que esta regulación negativa podía ser mediada

por una subpoblación de células (llamadas en ese momento T supresoras o Tsup) que interferían con la actividad efectora de otras células T. Estas células fueron caracterizadas por la expresión del marcador de superficie Lyt-2 (CD8) [59]. Los estudios realizados para definir esta subpoblación de Tsup eran inconsistentes e irreproducibles entre distintos laboratorios, probablemente por las limitaciones en las técnicas que no permitían aclarar las dudas sobre esta población celular, por lo que se perdió interés en este campo de investigación [60]. En 1982 se describió que ratones timectomizados 3 días después de nacidos presentaban enfermedades autoinmunes en distintos órganos como la tiroides, estómago, próstata, ovarios y testículos, lo que retomó la idea que existen subpoblaciones de células T capaces de mantener la homeostasis del sistema inmune [61]. En 1985, Shimon Sakaguchi describió que la transferencia de células T carentes del marcador CD5^{hi} (Ly-1⁺) a ratones desnudos (*nu/nu*) generaba autoinmunidad (principalmente inflamación intestinal), y que la adición de la subpoblación de células que expresan el marcador CD5 podía prevenir la autoinmunidad [62]. Estos resultados confirmaron la existencia de lo que a finales de los sesentas se conoció como células T supresoras, y dio lugar al extenso campo de investigación generado por las células T reguladoras (Tregs) [63].

2.2. Definición y distintas subpoblaciones de Tregs

Las células Tregs son una subpoblación de células T que suprimen la respuesta inmune fisiológica y patológica, contribuyendo al mantenimiento de la tolerancia inmunológica y a la homeostasis inmune [64]. Hay subpoblaciones de células Tregs que se clasifican por su desarrollo y fenotipo en células Tregs naturales y adaptativas.

Las células Tregs naturales (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) se originan en el timo como una población de células maduras (Fig. 10). En la periferia comprenden del 5 al 10% de las células CD4⁺ [65] y expresan constitutivamente el factor de transcripción Foxp3, que sirve

como regulador principal del desarrollo y función de estas células [66;67]. A la fecha, es el único marcador específico de las Tregs. Ratones carentes de Foxp3 (*scurfy*), no tienen células Tregs naturales y desarrollan el síndrome de linfoproliferación autoinmune y producción de citocinas sin control, lo que ocasiona la muerte de 4 a 5 semanas posteriores a nacer [68]; esto se puede evitar transfiriéndoles células Tregs naturales (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) [69]. Lo anterior es muy similar al síndrome IPEX en humanos (inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al cromosoma X), que se caracteriza por autoinmunidad agresiva causada por mutaciones en el gen Foxp3 [70]. En ratones, Foxp3 es exclusivamente expresado en las células Tregs naturales y se puede expresar en otras poblaciones efectoras de células T (CD4⁺ y CD8⁺), confiriéndoles actividad supresora [71]. Al examinar la población Foxp3⁺ en células T humanas, se encontró que se expresa después de estimular el TCR en células CD4⁺ en clones de células no reguladoras, sugiriendo que en humanos, Foxp3 es un marcador de activación [72].

Se han descrito algunos marcadores de superficie para distinguir las poblaciones de células Tregs de otras poblaciones de células T. Las células Tregs naturales expresan constitutivamente distintos marcadores de superficie como el CD25, CTLA-4, GITR, OX40, y L-selectina (CD62L), pero estos marcadores no son exclusivos de las Tregs naturales, sino que también se expresan en otras poblaciones celulares.

Además de la tolerancia a lo propio, las células Tregs naturales participan en el control de la supresión de la respuesta inmune contra células tumorales propias [73], alérgenos [74], microbios comensales o patógenos [75], transplantes de órganos alogénicos [76] y al feto durante el embarazo [77].

Naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs

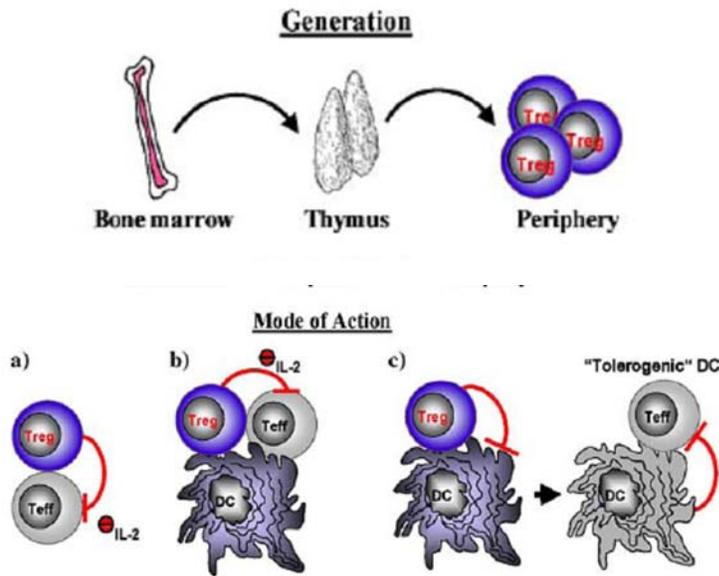


Figura 10. Desarrollo y función de las células Tregs naturales. Después de desarrollarse en el timo y migrar a periferia, las células Tregs naturales pueden suprimir la producción de IL-2 de las células T efectoras por contacto directo (a), o de manera indirecta por la APC (b). También, pueden condicionar a células dendríticas volviéndolas supresoras y éstas, puede suprimir a otras poblaciones efectoras (c). Tomado de referencia 67.

Las células Tregs adaptativas son una subpoblación de células Tregs que se pueden desarrollar fuera del timo a partir de células T. En general, las células Tregs adaptativas se desarrollan por estimulación antigénica específica, especialmente por citocinas. Las poblaciones de células Tregs adaptativas comprenden: las células T_{R1}, que secretan IL-10 (Fig. 11) [78] y se inducen en presencia de IL-10, anti-CD3 y anti-CD46 [79]; células T_{H3}, que secretan el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , Fig. 11) [80] y se inducen por cultivo de células T convencionales con TGF- β , IL-10 e IL-4 en ausencia de IL-12 [81]. También se han producido un tipo de células T que también presentan actividad supresora en presencia de drogas inmunosupresoras y anti-inflamatorias [82;83]. Se ha demostrado que células T naïve pueden diferenciarse en células tipo-Tregs naturales Foxp3⁺ bajo ciertas condiciones en modelos *in vivo* e *in vitro* [84;85]. Las células T_{R1} poseen función efectora de manera independiente de Foxp3 [86], mientras que la

expresión de Foxp3 en las células T_{H3} no se ha caracterizado. Aún quedan muchas incógnitas sobre cómo actúan estas poblaciones de células Tregs adaptativas y cuál es su contribución al mantenimiento de la homeostasis inmune y la tolerancia a lo propio.

Aunque las Tregs provienen principalmente del timo, las células Tregs adaptativas pueden ser inducidas bajo condiciones no inflamatorias en la periferia después de entrar en contacto con las células presentadoras de antígeno (APC), en particular células dendríticas. Por lo tanto, las APCs no participan únicamente en la activación de células efectoras, sino también en la supresión de éstas. Lo anterior depende de la maduración de la APC; por ejemplo, la estimulación de células T naïve CD4⁺ de humanos con APC inmaduras *in vitro*, resulta en la diferenciación a células Tregs adaptativas, ya que éstas no proliferan y producen altas cantidades de IL-10 (Fig. 11) [87;88]. Una APC inmadura tiene un fenotipo con baja expresión de MHC II, CD40, CD80 y CD86 y baja producción de IL-12; pero secreta altos niveles de IL-10. [89]. La misma IL-10 afecta la habilidad de la APC para activar a la célula T haciéndola supresora en lugar de efectora, en una forma de retroalimentación (Fig 11) [90]. Las APCs se pueden volver supresoras bajo la influencia de citocinas como la IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β [91-93].

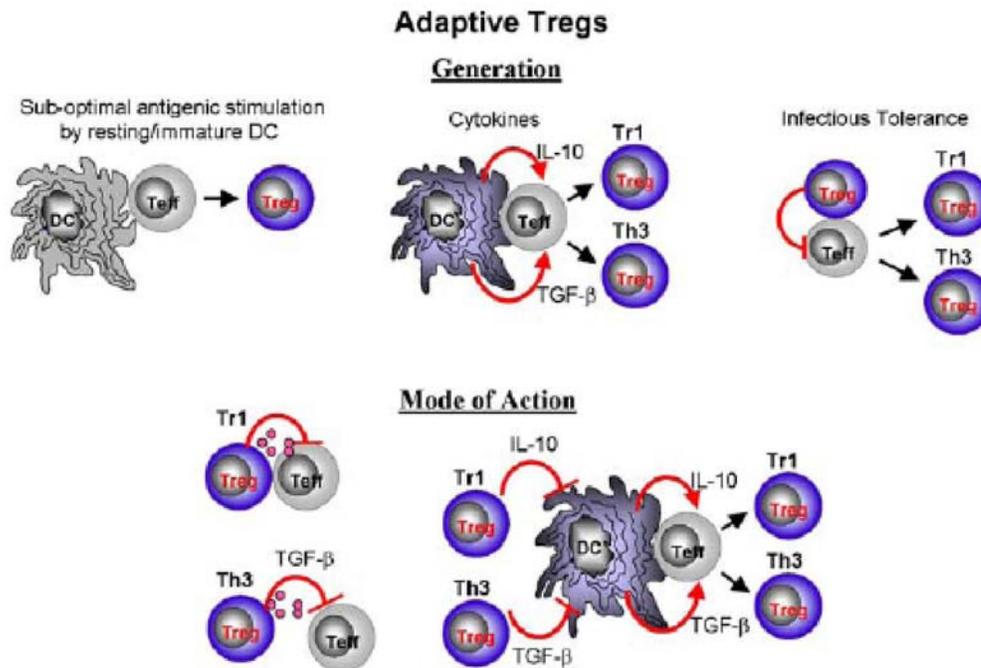


Figura 11. Desarrollo y función de las células Tregs adaptativas. Después de diferenciarse a partir de células T naïve en células Tregs adaptativas por Células dendríticas inmaduras o citocinas como IL-10 y TGF- β , actúan de manera semejante al de las Tregs naturales, suprimiendo poblaciones de células efectoras, o actuando sobre Células dendríticas para volverlas inmaduras y así, éstas condicionan a células T efectoras para que adquieran el fenotipo de Tregs adaptativas. Tomado de referencia 68.

2.3. Marcadores de superficie y Foxp3

Los marcadores moleculares son esenciales para definir y analizar subpoblaciones celulares. El problema de distinguir a las células Tsup a principios de los 80's se debió en gran manera a la falta de marcadores específicos para esas células. Con el avance en las técnicas moleculares actuales, se han descrito los siguientes marcadores para definir a las células Tregs:

- CD25 [94;95].
- CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4) [96;97].
- GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related gene) [98].
- LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene-3) [99].
- CD127 [100;101].

- Foxp3 (Forkhead/winged-helix transcription factor box P3) [102;103].

La evidencia acumulada en la literatura sugiere que la lista anterior de marcadores a excepción de Foxp3, no están restringidos a la población de células Tregs.

Después de activarse, todas las células T expresan el CD25, la cadena α del receptor de IL-2 [104]. La IL-2 favorece la expansión clonal de las células T. CTLA-4 es un regulador negativo de la activación; es expresado en todas las células CD4⁺ o CD8⁺ de 2 a 3 días después de que la célula fue activada [105]. Ratones knockout para CTLA-4 desarrollan enfermedades autoinmunes similares a las inducidas por la depleción de Tregs [106]. De manera semejante, la expresión de GITR y LAG-3 es inducida en las células T después de activarse [107;108]. En la búsqueda para distinguir específicamente a las células Tregs, se han descrito otros marcadores de superficie: CD101 [109] y FR4 (receptor de folato 4) [110], pero al igual que los descritos en la lista anterior, se expresan en todas las poblaciones de células T después de activarse. Se ha sugerido que CD127, la cadena α del receptor de IL-7, puede ser usado para discriminar entre poblaciones de células Tregs (CD127^{low}) y células T efectoras (CD127^{hi}) en humanos [111;112]; sin embargo, se ha reportado recientemente que la mayoría de células T expresan el marcador CD127 después de activarse [113]. Entonces, todos los marcadores descritos son marcadores de activación de células T y no pueden distinguir de manera exacta a las células Tregs de células T efectoras (Teffs).

El factor de transcripción Foxp3 es considerado como el marcador más preciso de las células Tregs [114]. La expresión de Foxp3 se restringe a las células T α/β y de manera más específica a la población CD4⁺, pero algunas células CD8⁺ también lo expresan. También existe la expresión de Foxp3 en mínimos porcentajes en la población T $\gamma\delta$, NK, macrófagos y células dendríticas [115-117].

En el timo se adquiere la expresión de Foxp3; células CD4⁺Foxp3⁺ se pueden detectar en ratones 3 días después de haber nacido [118;119]. La expresión ectópica de Foxp3 en células T naïve es suficiente para convertirlas en células Tregs; esto les confiere actividad supresora *in vivo* e *in vitro*, suprime la transcripción génica de citocinas y además regula la transcripción de moléculas asociadas con Tregs como CD25, CTLA-4 y GITR [120]. Foxp3 es un represor de la transcripción de la IL-2, IL-4 e IFN- γ por la interacción directa con el factor nuclear NF- κ B [121]. Foxp3 es importante para la funcionalidad de las células Tregs; su ausencia genera síndromes autoinmunes fatales en humanos y en el ratón; aunque la autoinmunidad no se restringe a la falta de funcionalidad de Foxp3, sino que también engloba otras moléculas inmunoreguladoras como el CTLA-4 [122;123] y el TGF- β [124].

Actualmente se sabe que en ratones, Foxp3 se puede encontrar en la población CD4⁺CD25⁺ y en la población CD4⁺CD25⁻ [125;126]. En el bazo y nódulos linfáticos, la mayoría de células CD4⁺CD25⁺ expresan Foxp3 pero también hay células CD4⁺Foxp3⁺ que no expresan CD25 [127;128]. En los pulmones la mayoría de células CD4⁺Foxp3⁺ no expresan CD25 [129].

2.4. Mecanismos de supresión

Se ha descrito que las células Tregs naturales suprimen la activación y/o expansión de múltiples tipos celulares. Primeramente se demostró que suprimen la activación y expansión de las células T CD4, ya que al transferir células T CD4 depletadas de Tregs a ratones *nu/nu*, se induce autoinmunidad, mientras que al transferir células TCD4 con células Tregs (CD4⁺CD25⁺), se inhibe el desarrollo de autoinmunidad [130]. Estudios *in vitro* han demostrado que las células Tregs suprimen la activación y/o proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ y su producción de citocinas en presencia o ausencia de APCs [131-133]. Se ha descrito que también suprimen la proliferación de células B, la producción de inmunoglobulinas, el recambio de clase entre las inmunoglobulinas [134], la función citotóxica de células NK [135] y la función y maduración de células dendríticas [136]. La inducción de la actividad supresora de las Tregs requiere estimulación antigénica vía TCR [137]. A pesar de que se han propuesto varios mecanismos para la supresión que ejercen las Tregs, como condicionar a las APCs volviéndolas inmaduras o el consumo de IL-2, algunos de estudios *in vivo* e *in vitro*, apuntan que la supresión es mediada por contacto célula-célula por moléculas de membrana en la célula Treg, lo cual se ejemplifica de manera muy clara cuando la célula Treg se separa de la célula Teff por una membrana semipermeable y no se observa supresión [138]. Ciertas moléculas accesorias expresadas en las células T como CTLA-4 y LAG3, interactúan con CD80 y CD86 en la APC contribuyendo a este mecanismo de supresión dependiente de contacto (Fig. 12a) [119;139]. CTLA-4 expresado en la Treg activa la inducción de la enzima indoleamin 2,3-dioxigenasa (IDO) en las células dendríticas por la interacción con CD80 y CD86. IDO cataliza la conversión del triptófano en cineurina y otros metabolitos. La activación de IDO aumenta el catabolismo del triptofano en la APC, resultando en muy poca cantidad de triptofano libre disponible para las células TCD4⁺ naïve que posteriormente se pueden activar y realizar su función efectora [140], por lo que las

células dendríticas pueden inducir un fenotipo regulador sobre las células T naïve (Fig. 12c) [141].

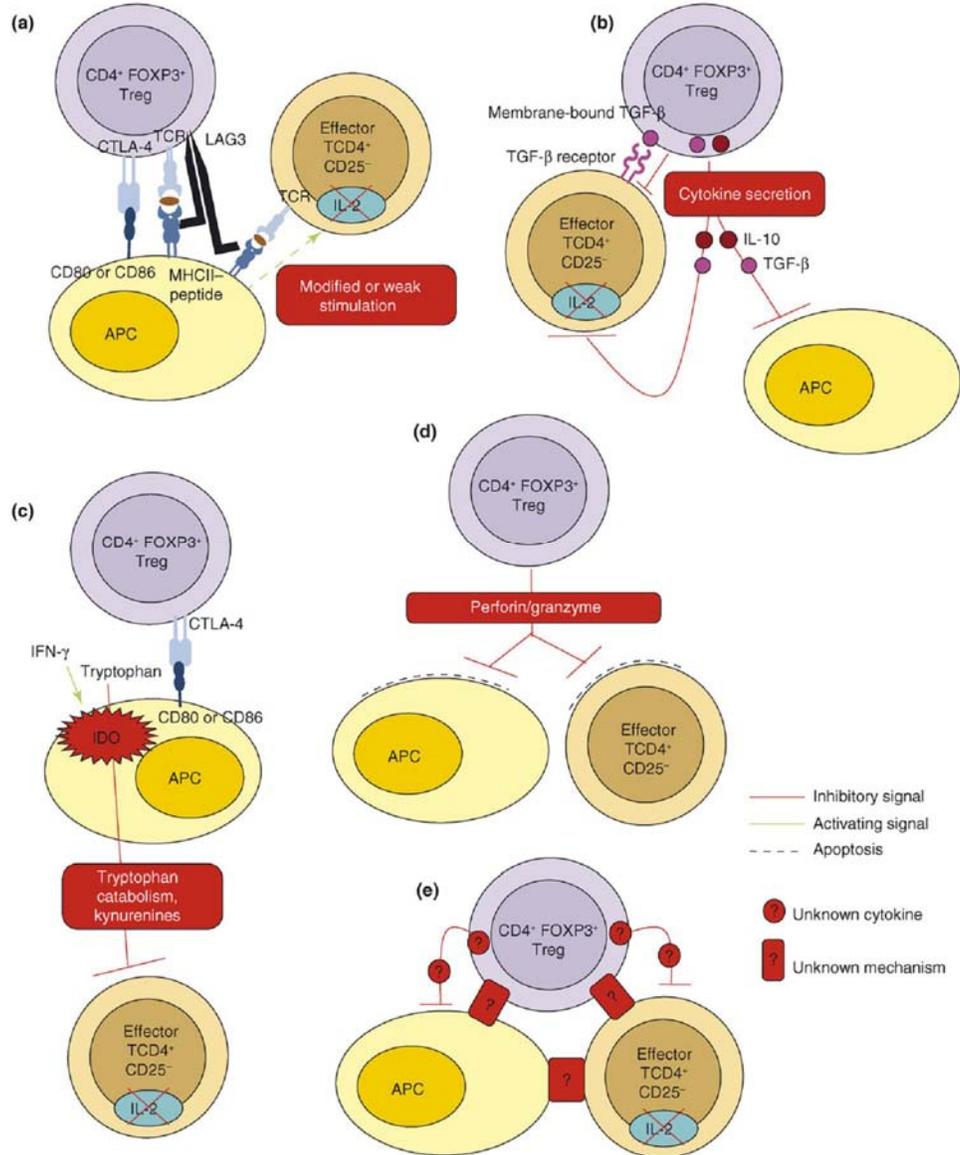


Figura 12. Mecanismos de supresión de las células Tregs. Varios mecanismos han sido descritos por los que las Tregs suprimen la actividad de otras células: inhibición de la expresión del gen de IL-2, modulación de moléculas coestimuladoras en la APC e interacción de LAG3 con moléculas del MHC II (a); secreción de citocinas inmunosupresoras (b); inducción del catabolismo del triptofano por CTLA-4 (c) y citotoxicidad (d). Ninguno de estos mecanismos por sí solo puede explicar todos los aspectos de la supresión y aún existen varios mecanismos de supresión por describir (e). Tomado de referencia 43.

Sin embargo, ratones knockout para CTLA-4 presentan autoinmunidad severa aún cuando sus Tregs presentan funciones supresoras intactas [142]. LAG3 es una molécula de adhesión asociada a CD4 que se une a MHC II [143]. Anticuerpos contra LAG3 eliminan la supresión de las Tregs *in vivo*, la actividad supresora de ratones knockout para LAG3 se deteriora *in vitro* y la expresión ectópica de LAG3 en células T naïve les confiere función supresora (Fig. 12a), aunque ratones deficientes en LAG3 no presentan enfermedades autoinmunes [144].

En contraste con los requerimientos para suprimir *in vitro* a las células efectoras por contacto directo (competencia por IL-2) o por contacto indirecto vía APC, hay muchos reportes que indican que las citocinas como la IL-10 y el TGF- β son necesarias *in vivo* para suprimir a las células Teffs o condicionar un ambiente supresor (Fig. 12b) [145].

Algunos experimentos han respaldado la idea de que las Tregs suprimen a las células efectoras mediante la IL-10. La transferencia adoptiva de células T CD4⁺CD25⁺ a ratones a los que se les realizó un trasplante alogénico de piel, induce tolerancia; pero la inyección de un anticuerpo que bloquea el receptor de IL-10 acelera el rechazo al trasplante [146].

El TGF- β expresado en membrana ha sido reportado en células Tregs humanas y murinas, lo que indica que el mecanismo de supresión que utiliza esa citocina probablemente es por contacto célula-célula. El 80% de las células Tregs expresan TGF- β en su membrana cuando se activan con altas dosis de anti-CD3, APCs e IL-2, en ratones (Fig 12b) [147]. Sin embargo, existen reportes en los que las Tregs aisladas de ratones knockout para TGF- β exhiben actividad supresora normal *in vitro* [148]. Aún cuando se puede generar controversia sobre el posible papel del TGF- β en mediar la supresión ejercida por las Tregs, hay una amplia evidencia de su requerimiento en el mantenimiento de las Tregs naturales ya que, ratones knockout para TGF- β muestran un número

reducido de Tregs [149]. El TGF- β también se requiere para la inducción de Tregs adaptativas a partir de células T naïve, ya que la expresión de Foxp3 se puede inducir cultivando éstas con TGF- β , IL-2 y estimulación antigénica [150].

Existe evidencia de que la IL-2 se requiere para el mantenimiento de las Tregs en la periferia y su activación. Las células Tregs constitutivamente expresan el receptor de la IL-2 de alta afinidad. Ratones deficientes en IL-2 presentan reducidas cantidades de células Tregs Foxp3⁺ [151]. En la supresión que ejercen directamente las Tregs sobre células Teffs, existe la posibilidad de que las Tregs absorban la IL-2 del medio por su receptor de alta afinidad por lo que bloquean la proliferación de otras células T (Fig 12) [152].

Las Tregs también pueden eliminar a células efectoras (células T, monocitos y DC's) por mecanismos como la liberación de perforina y granzima A [153], mientras que pueden eliminar células B por mecanismos dependientes de perforina (Fig. 12d) [154]. Seguramente existen distintos mecanismos por los cuales las Tregs puedan suprimir a células efectoras, los cuales en un futuro no muy lejano serán descritos. Estos mecanismos pueden ser muy variados incluyendo citocinas, moléculas de superficie u otros que aún no se conocen (Fig. 12e) [155].

Sean cual sean los mecanismos por los que las Tregs suprimen, es necesario controlar la magnitud de esta supresión para el beneficio del hospedero porque una supresión muy fuerte causaría inmunosupresión y esto implica que el hospedero sería susceptible a una infección o cáncer, y de manera contraria, la ausencia de supresión (la nula participación de las Tregs) implicaría fenómenos de autoinmunidad y alergia. Se sabe que existen varios mecanismos para el control de la actividad supresora de las Tregs. La modulación de la fuerza de señalización por el TCR de las Teffs puede modificar su susceptibilidad a ser suprimidas por las Tregs. Cuando se cultivan *in vitro* células Teffs con Tregs en

presencia de grandes cantidades de anticuerpo anti-CD3, existe resistencia de las células Tregs a ser suprimidas [156].

La adición de grandes cantidades de citocinas como el TNF- α [157], IL-2 [158] e IL-6 [159] *in vitro*, en un cultivo con células Tregs y Tregs, puede eliminar la supresión mediada por Tregs.

GITR es expresado constitutivamente en las Tregs en mucho mayor nivel que en otras poblaciones de células T [160], que también lo expresan después de activarse [161]. La unión de anticuerpos agonistas para GITR amplifica la respuesta inmune *in vivo* e *in vitro* atenuando la supresión de las Tregs, por ejemplo la inyección de anticuerpos anti-GITR en ratones que presentan tumores, favorece la eliminación de éstos por una respuesta inmune efectora más fuerte [162].

Muchos miembros de los TLRs son expresados en las Tregs y participan en su activación y expansión [163]. Células dendríticas cultivadas con lipopolisacárido (LPS) que es el ligando del TLR-4, o con dinucleótido de citosina-guanina (CpG) que es el ligando del TLR-9, eliminan la supresión mediada por Tregs *in vitro*. Los sobrenadantes de cultivo de estas células dendríticas también eliminan la actividad supresora de las Tregs. Se ha propuesto que esto es mediado por la IL-6, ya que hay grandes cantidades de esta citocina y al agregar al medio anticuerpo anti-IL-6, hay expansión de Tregs y reestablecimiento de su actividad supresora [164;165]. En este contexto, se han descrito otros TLRs expresados constitutivamente en las Tregs como el TLR-2 [166] y el TLR-8 [167]. Todo lo anterior sugiere que existen varios mecanismos por los cuales se puede controlar la supresión de las Tregs.

2.5. Participación de las Tregs en infecciones y su utilización en terapias

La participación de las células Tregs en distintas enfermedades infecciosas es muy variable; se han descrito en infecciones bacterianas, parasitarias, fungales y virales [168]. El principal papel observado de las Tregs es limitar la patología suprimiendo la respuesta efectora y permitiendo en algunos casos, el desarrollo de la infección crónica [169;170]. La desventaja de esto es cuando el control de la respuesta inmune efectora es excesivo y conlleva a que la respuesta contra la infección sea ineficiente, favoreciendo la expansión de ésta y en algunos casos la muerte del hospedero [171]. Durante la infección crónica las Tregs limitan el daño a los tejidos favoreciendo el mantenimiento de la inmunidad contra el patógeno a largo plazo. También se ha propuesto que las Tregs activadas por infecciones pueden contribuir a la limitación de la respuesta inmune a alergias o autoinmunidad. Por otra parte, la persistencia de la activación de las Tregs en una infección crónica conlleva a la reactivación de la enfermedad o al desarrollo de tumores por la escasa respuesta inmune efectora (Fig. 13) [172;173].

Las Tregs pueden suprimir la respuesta inmune contra células cancerosas emergentes y por lo tanto impedir la respuesta inmune efectora contra tumores que se estén estableciendo. Se han descrito proporciones altas de Tregs entre los linfocitos infiltrados en tumores y en varios tipos de cáncer [174]. Estas observaciones sugieren que la reducción en el número de Tregs o la atenuación de su función puede incrementar la eficacia de la inmunoterapia en el cáncer.

En el otro extremo se encuentran las enfermedades autoinmunes y alergias, en las que ha reportado un menor número de estas células [175;176]. Aunque aún queda por definir si esa disminución es causa o consecuencia de estas enfermedades, la expansión de Tregs *in vivo* o *ex vivo*, puede ser un tratamiento efectivo para tratar esas enfermedades. En la tolerancia a transplantes alogénicos, la expansión de Tregs puede utilizarse para inducir tolerancia [177]. En algunos desórdenes en el embarazo, se ha propuesto que el

aumento en el número de Tregs podría disminuir la acción efectora contra el feto, evitando su rechazo por el sistema inmune de la madre [178]. Todo lo anterior se ejemplifica en la Fig. 14.

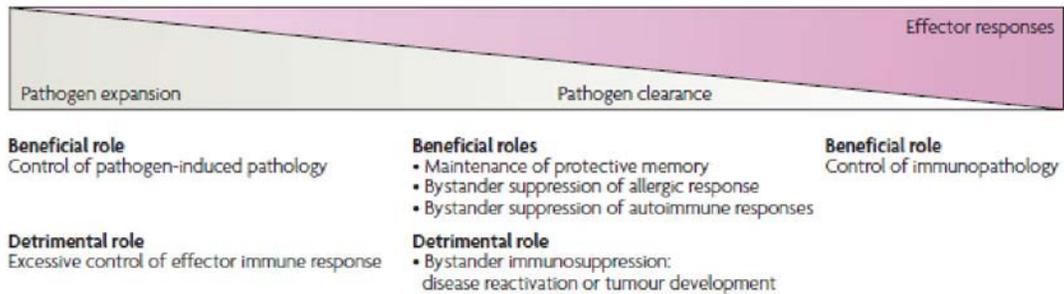


Figura 13. Papel positivo y negativo de las Tregs durante las infecciones. Si durante la infección es mayor la presencia de las Tregs que de células efectoras, el beneficio es el control de la patología causada por una respuesta inmune exacerbada; pero un papel perjudicial es que haya un control excesivo de la respuesta efectora. Por el contrario si la respuesta efectora es mayor, se puede eliminar completamente al patógeno, pero se puede causar autoinmunidad por la respuesta exacerbada. Tomado de referencia 118.

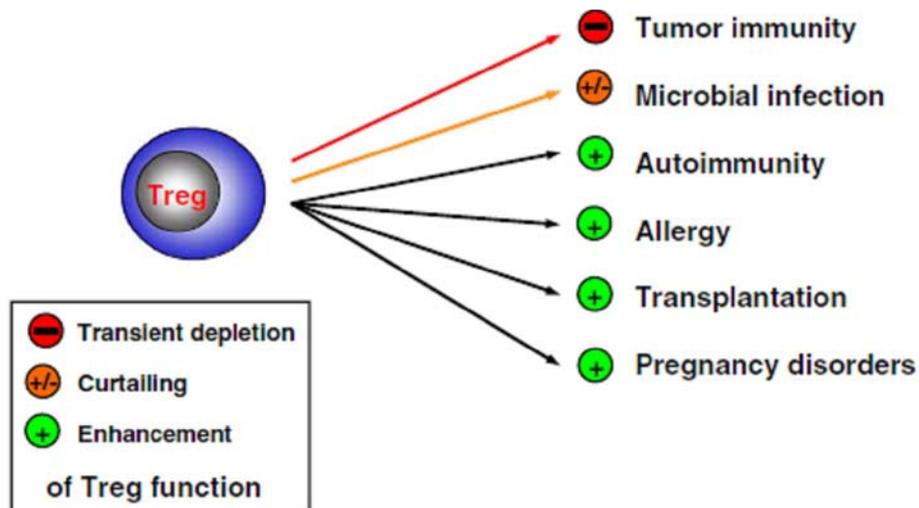


Figura 14. Participación de las Tregs en terapias. La reducción de las Tregs favorece la inmunidad a tumores, mientras que en enfermedades infecciosas existe una participación completamente variada. Existe beneficio al aumentar las Tregs en enfermedades autoinmunes, alergia, trasplantes alogénicos y desordenes en el embarazo. Tomado de referencia 68.

II. JUSTIFICACIÓN

El estudio de las células Tregs en distintos modelos de infección, ha generado un amplio campo de investigación. El generalizar la participación de las células Tregs en los distintos modelos de infección es incorrecto. Existen ejemplos donde las células Tregs favorecen la sobrevivencia del parásito suprimiendo la respuesta efectora y permiten, en algunos casos, el desarrollo de la infección crónica o la muerte del hospedero; y otros ejemplos donde no intervienen en el curso de la infección.

III. OBJETIVO

Determinar la participación de las células Tregs durante la infección con *T. gondii* en el modelo murino.

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

El enfoque experimental realizado fue el siguiente: ratones C57BL/6J depletados de células CD25⁺, se infectaron con la cepa Me49 de *T. gondii* (cepa tipo II); así como ratones BALB/c depletados de células CD25⁺ se infectaron con la cepa RH de *T. gondii* (cepa tipo I). Se analizó peso, mortalidad, número de quistes en cerebro (en el caso de la infección con la cepa Me49) y las distintas proporciones de las poblaciones de células Tregs y T efectoras (Teffs) en sangre periférica a distintos tiempos post-infección por citometría de flujo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales utilizados

Se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6J, BALB/c y CD1 del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se mantuvieron en un ambiente controlado con aire filtrado (filtración EPA 100), con agua, alimento *ad-libitum* (Harlan™, México) y ciclos de luz 12x12. Todo el equipo e insumos son esterilizados. La edad de los ratones al tiempo de los experimentos fue de 6 a 8 semanas y un peso promedio de 18 a 20 g.

2. Obtención de células de sangre

El ratón se coloca dentro de un inmovilizador sujeto a un soporte universal con pinzas, se corta la punta de la cola del ratón con unas tijeras de disección y con las yemas de los dedos se recorre y se oprime la cola del ratón para obtener la sangre gota por gota recibiendo en un tubo eppendorf con 2 μ l de heparina 100X. Se obtienen cerca de 50 μ l de sangre por ratón. Después de sangrar los ratones requeridos por experimento, la sangre se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

3. Obtención de células de bazo

El bazo de ratones se obtiene previo sacrificio del ratón por dislocación cervical. Después de enjuagar con alcohol al 95% y colocar al animal exponiendo su flanco izquierdo, se abre el peritoneo con una incisión cercana a los 2 cm con unas tijeras. El bazo se extrae con unas pinzas y se coloca en una caja de Petri con 10 ml de medio RPMI 1640 a 4°C. De estos 10 ml de medio se toma la mitad con una jeringa de 10 ml, la cual se inserta poco a poco en el bazo teniendo cuidado de no perforar la contraparte. Se va inyectando poco a poco el medio mientras que con unas pinzas se prensa el bazo hasta que quede en una tonalidad muy clara. Con una pipeta de 10 ml se toman los 10 ml finales de medio con las células de la caja de Petri y se pasan a un tubo de rosca de 15 ml, dejando

sedimentar los pedazos grandes de tejido. Las células se pasan a otro tubo, se centrifuga a 300 g por 5 mins descartando el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 1 ml de solución de lisis dejando actuar a temperatura ambiente por 5 mins, se agregan 10 ml de DPBS para detener la lisis y se centrifuga a 300 g por 5 mins. Se aspira el sobrenadante y las células se lavan con 10 ml de DPBS. Después se resuspenden en 10 ml de DPBS y se cuenta el número de células por tinción con azul tripano (Gibco™). Se toman 10 µl de esta dilución y se cuenta el número de células en una cámara de Neubauer. Se hacen los cálculos para saber el número de células/ml de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$[\text{Número de células contadas}] \times [\text{dilución}] \times 10^4 = \text{células/ml}$$

4. Obtención de cerebros

El ratón se sacrifica por dislocación cervical. Después de enjuagar al animal con alcohol al 95%, se hace un corte por la nuca con unas tijeras de disección para obtener la cabeza completa. Ésta se fija en un pedazo de unicel y se sujeta con agujas por ambas orejas y por la nariz. Se quitan los excesos de tejido y la piel de la cavidad craneal superior. Se hacen 3 incisiones a partir de la nuca, una al centro del cráneo y dos en cada lado cercanas a los 45° para formar un triángulo y poder quitar la tapa del cráneo. Teniendo expuesto el cerebro se extrae con unas pinzas de disección y se coloca en una caja de Petri con 500 µl de DPBS. Después los cerebros se colocan en maceradores de tejidos en un volumen final de 1 ml. El cerebro se macera perfectamente con el pistilo sin dejar grumos ni pedazos de tejido. Se recupera el cerebro macerado con una pipeta Pasteur y se transfiere en un tubo eppendorf a 4°C.

5. Cultivos celulares *in vitro*

5.1. Descongelación de células

El criotubo con las células requeridas se descongela en un baño a 37°C. Una vez derretido todo el medio, se transfiere con una pipeta Pasteur a un tubo con 10 ml de medio DMEM completo a 37°C, se homogeniza y se centrifuga a 300 g por 5 mins. El sobrenadante se descarta y se resuspende en 5 ml del medio adecuado (dependiendo de la línea celular), en una botella de 25 cm². Se incuba a 37°C con 5% de CO₂ y 100% de humedad.

5.2. Congelación de células

5.2.1. Células en suspensión

Las células se centrifugan a 300 g por 5 mins, se descarta el sobrenadante y se resuspenden en 1 ml de medio de congelación a 4°C. Se almacenan a -70°C al menos una noche (Forma Scientific® Bio-freezer) y después se transfieren a un tanque de N₂ a -200°C. Se conserva por tiempo indefinido.

5.2.2. Células adherentes

Si las células (fibroblastos) crecen adheridas a la botella, se tripsinizan de acuerdo al protocolo descrito (5.2.4.) y se centrifugan a 300 g por 5 mins. Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 ml de medio de congelación a 4°C. Se almacena a -70°C al menos una noche (Forma Scientific® Bio-freezer) y después se almacena en un tanque de N₂ a -200°C.

5.2.3. Hibridomas

Se utilizaron los hibridomas PC61 (ATCC TIB-222), productor del anticuerpo monoclonal mAb anti-CD25 de ratón (IgG1 de rata) PC61 y el hibridoma F4-1D1 (IgG1 de rata, regalo del Dr. Olivier Denis, Institut Scientifique de Santé Publique, Bruselas, Bélgica). Los hibridomas se cultivan en 50 ml de medio CDM sin suero (Gibco™) con glutamina al 4% (Gibco™) en botellas de 150 cm². Cuando las células están confluentes se hace una dilución 1:5 cosechando el sobrenadante restante y centrifugando a 300 g por 5 mins. Se descarta el pellet y el sobrenadante recuperado se almacena a -20°C hasta el momento de su purificación [179].

5.2.4. Fibroblastos humanos

Los fibroblastos crecen adheridos a la pared inferior de botellas de 25cm² con 5 ml de medio DMEM completo, a 37°C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad hasta que estén confluentes; en un lapso de 4 a 7 días. Al estar confluentes se pueden diluir obteniendo 3 cajas a partir de una (dilución 1:3); cada vez que diluimos los fibroblastos es un pasaje. Para realizar un pasaje, se elimina el medio por aspiración con vacío y se enjuagan los fibroblastos con 5 ml de DPBS por 5 mins, se aspira y se agrega 1 ml de Tripsina-EDTA 1x a 37°C. Se dan unos cuantos golpes a la caja y cuando la mayor parte de las células se han despegado, se agregan 2 ml de medio DMEM completo a 37°C homogenizando por pipeteo. De los 3 ml finales se transfiere 1 ml a 1 caja de 25 cm² que contiene 4 ml de medio DMEM completo (en total 3 cajas). Se incuban a 37°C con 5% de CO₂ y 100% de humedad.

6. Cepas de *Toxoplasma gondii*

El trabajo con material biológico infectado con *T. gondii* debe llevarse a cabo con precaución ya que es un patógeno tipo 2 de acuerdo a los niveles de bioseguridad del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Durante el manejo de animales infectados con la cepa Me49 y RH de *T. gondii* se trabaja con guantes, bata y en una campana de flujo laminar.

6.1. Cepa Me49

La cepa Me49 de *T.gondii* (Tipo II) se mantiene por pasajes *in vivo* en ratones de la cepa CD1 [180]. Los quistes se obtienen del cerebro de ratones infectados 2-3 meses antes. De acuerdo al protocolo descrito para la obtención de cerebros en el apartado 2.1.3, se toma una muestra de 10 μ l con una micropipeta, se coloca sobre un portaobjetos y posteriormente se coloca un cubreobjetos observando toda la preparación en un microscopio óptico (objetivo 20X). Se cuenta el número de quistes en toda la preparación y se calcula en número de quistes/ml. La preparación final se diluye para obtener 200 quistes/ml y se carga en una jeringa de 1 ml a la cual se le colocó un tubo de teflón (Cole Parmer®) de 0.02 cm de diámetro, insertado en la aguja y con aproximadamente 20 cm de longitud. Los ratones se infectan previa anestesia por aspiración con sevorano® el cual se coloca en 1 tubo corning (Sigma–aldrich®) de 50 ml con tapa que contiene un trozo de algodón al fondo. El ratón se coloca en la boca del tubo hasta que se quede inmóvil y posteriormente el tubo de teflón se inserta en la boca del ratón pasando por el esófago. Se inocula a cada ratón con 100 μ l del macerado de cerebro conteniendo 20 quistes [181].

6.2. Cepa RH

Los taquizoítos de la cepa RH (cepa tipo I) de *T. gondii* se cultivan en fibroblastos humanos confluentes. Los fibroblastos se infectan con taquizoítos en medio DMEM con 1% de FCS. Cuando los taquizoítos lisan los fibroblastos, se puede hacer un pasaje a otra caja con fibroblastos confluentes. Para acelerar el crecimiento del cultivo, se puede cambiar el medio diariamente. Si los taquizoítos se utilizan para infectar ratones, se lavan 1 vez con 5 ml de DPBS, se centrifugan a 500 g por 10 mins, se descarta el sobrenadante por aspiración con vacío y se resuspenden en 1 ml de DPBS. Se cuenta el número de taquizoítos por tinción con azul tripano en una cámara de Neubauer. Se resuspenden 3000 taquizoítos/ml. Se cargan con una pipeta Pasteur en una jeringa de 1 ml colocando una aguja de 22x32 μm de diámetro (BD yale® ultrafine). Se inyectan 100 μl por ratón por vía intraperitoneal (300 taquizoítos) [182].

7. Purificación de anticuerpos monoclonales (mAbs)

7.1. Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El sobrenadante de cultivo (medio CDM) de los hibridomas se descongela en un baño a 37°C y se mide el volumen obtenido. En un baño a 4°C con agitación constante, se agrega lentamente la cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para llegar a una saturación al 45% dejando agitar de 2 a 4 hrs. El medio se centrifuga a 20000 g a 4°C durante 1 hr (centrífuga Beckman modelo J2-21), se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en el volumen mínimo de PBS pH 7.8. Se dializa contra PBS pH 7.8 con una bolsa de diálisis de 6000-8000 MWCO (Spectra/Por®), durante 48 hrs a 4°C con cambios cada 6 hrs. El dializado se centrifuga a 20000 g por 10 mins. Para cuantificar la cantidad obtenida de anticuerpo y el rendimiento de la precipitación se lee a $\lambda=280$ nm en un espectrofotómetro, utilizando la siguiente fórmula:

$$[A_{280}/1.25] \times [\text{Factor de dilución}] = \text{mg/ml de anticuerpo}$$

El anticuerpo se almacena en alícuotas de 1 mg/ml a -20°C hasta su uso [179].

7.2. Geles SDS-PAGE

Después de armar la cámara de electroforesis (Hoefer™, SE 600 series) compuesta por la base, 2 vidrios de 18x16 cm, los separadores y las pinzas, se vierten aproximadamente 25 ml del gel de corrida (al 10%) y se deja polimerizar por 1-2 hrs dejando una capa de 1 cm de grosor de isobutanol saturado. Se descarta el isobutanol y se enjuaga con agua mQ secando con papel Whatman®. Se vierten aproximadamente 10 ml del gel concentrador teniendo cuidado de colocar los peines (carriles) sin introducir oxígeno y se deja polimerizar por 1 hr. Los carriles se lavan 3 veces con aproximadamente 5 ml buffer de electrodos para colocar en ellos las muestras a correr en el gel; éstas deben contener 25 µg del anticuerpo a evaluar en buffer de muestra (2X) en igual volumen, quedando al 1X. Los marcadores de peso molecular (MPM, Mark12™ Unstained Standard Invitrogen™ 1X) se ponen en el primer carril del gel concentrador. Después de armar la cámara inferior y superior y cargarlas con buffer de electrodos, se conecta a una fuente de poder que tiene los siguientes parámetros: 60 V, 12.5 mA de corriente máxima y potencia máxima ilimitada, dejando en esas condiciones toda la noche. Después de sacar el gel de la cámara, se agregan 75 ml de solución de enjuague para quitar el SDS y fijar las proteínas, en un baño a 55°C con agitación suave por 20 mins. Se descarta la solución de enjuague y se agregan 70 ml nuevos más 7 ml de azul de Coomassie y se deja en el mismo baño por media hora. Se descarta la solución de enjuague y se agregan 100 ml de solución de lavado cada hora hasta desteñir.

8. Depleción de células CD25⁺

Para llevar a cabo la inyección por vía intraperitoneal, el ratón se inmoviliza sujetándolo de la nuca y de la cola con una sola mano. Se inyecta el anticuerpo anti-CD25 PC61 (100 o 200 μ g) resuspendido en 200 μ l de DPBS, contenido en una jeringa de 1 ml (0.40 mm x 1/2", BD Plastipak®). El mismo protocolo se hace para el control de isotipo y la inyección de DPBS como control.

Para realizar la inyección intravenosa, el ratón se coloca en un inmovilizador sujetado a un soporte universal por unas pinzas. La cola del ratón se expone a una lámpara con un foco de 100 W por 20 segundos aproximadamente, lo que permite que las venas de la cola se dilaten y sea más fácil su identificación. El ratón tiene 3 venas en su cola ubicadas en la parte lateral e inferior; la inyección solo se puede hacer en estos lugares, nunca en la arteria (que está en la parte superior de la cola). La cola del ratón se toma entre los dedos índice y medio y se inyecta la cantidad requerida de anticuerpo resuspendida en 100 μ l de DPBS. El anticuerpo se carga en jeringas de 1 ml (27G x 13 mm, BD Plastipak®), pero se cambia la aguja por una más fina (30G x 1/2, BD PrecisionGlide™).

9. Citometría de flujo

9.1. Inmunofluorescencia directa

9.1.1. En células de bazo

Se colocan 10⁶ células de bazo en un tubo eppendorf, se centrifugan a 300 g por 5 mins y se descarta el sobrenadante por aspiración con vacío. Se agrega a cada tubo 100 μ l de solución de lavado con los anticuerpos a utilizar resuspendiendo por agitación perfectamente. Se incuba a 4°C durante 30 mins en oscuridad. Se agrega 1 ml de solución de lavado, se centrifuga a 300 g por 5 mins, se descarta el sobrenadante y las

células se resuspenden en 400-500 μ l de DPBS. Se analiza inmediatamente en el citómetro de flujo.

9.1.2. En células de sangre

Después de obtener 50 μ l de sangre de acuerdo al protocolo descrito en el apartado III.2., se agrega 1 ml de DPBS, se centrifuga a 300 g por 5 mins y se descarta el sobrenadante. Se agregan 500 μ l de buffer de lisis (ver apéndice), se incuba a temperatura ambiente durante 5 mins y se agrega 1 ml de DPBS a 4°C. Se centrifuga a 300 g por 5 mins y se resuspende en 100 μ l de solución de lavado con los anticuerpos a utilizar. Se incuba a 4°C, 30 mins en oscuridad. Se agrega 1 ml de buffer de lavado, se centrifuga a 300 g por 5 mins y se descarta el sobrenadante. Las muestras se resuspenden en un volumen de 200-300 μ l de DPBS y se analizan inmediatamente en el citómetro de flujo.

9.1.3. Determinación de Foxp3

A 100 μ l de sangre en un tubo eppendorf con 2 μ l de heparina 100X, se le agregan los anticuerpos a utilizar en 5 μ l de solución de lavado, se incuba a 4°C durante 30 mins en oscuridad. Después de lisar los eritrocitos con 500 μ l de buffer de lisis (5 mins a temperatura ambiente) y agregar 1 ml de DPBS, las células se centrifugan a 300 g por 5 mins y se agrega 500 μ l de solución de fijado (Anti-mouse/rat Foxp3 staining set, eBioscience™) y se incuba a 4°C durante 30 mins. Posteriormente se agrega 1 ml de buffer de lavado y se centrifuga a 300 g por 5 mins. Se descarta el sobrenadante y se agregan 100 μ l de solución de permeabilización 1X (Anti-mouse/rat Foxp3 staining set, eBioscience™) con el anticuerpo anti-Foxp3 y se incuba a 4°C durante 30 mins en oscuridad. Se agrega 1 ml de buffer de lavado y se centrifuga a 300 g por 5 mins. Se descarta el sobrenadante y las muestras se resuspenden en un volumen de 200-300 μ l de DPBS y se leen inmediatamente en el citómetro de flujo.

9.1.4. Captura y análisis de poblaciones celulares

La captura de las distintas poblaciones celulares se realizó con los citómetros de flujo FACScan® y FACSCalibur® (Becton Dickinson, México). Se obtuvieron 5000 eventos de la población R₂ en cada experimento. El análisis de las muestras obtenidas por citometría de flujo se realizó utilizando el software FlowJo (versión 5.7.2).

10. Análisis estadístico

El análisis de mortalidad, peso, número de quistes y porcentaje de Tregs se realizó con el software GraphPad Prism (versión 3.00), usando una prueba de normalidad para conocer la distribución de los resultados. Para conocer si existían diferencias significativas se realizó una prueba “t de student simple”. Para conocer si existían diferencias significativas en las gráficas de mortalidad, se realizó una prueba “Log-rank test”.

VI. RESULTADOS

1. Obtención y purificación del anticuerpo PC61 anti-CD25

La cadena α del receptor de IL-2 (IL-2 R α) o CD25, es un marcador de superficie expresado constitutivamente en las células Tregs [183] y es ampliamente utilizado para discernir entre poblaciones naïve de células Tregs y células Teffs [184], aún cuando también se expresa en múltiples tipos celulares como células B, monocitos, células dendríticas y células T activadas [185;186].

El primer paso para estudiar a las células Tregs, fue obtener el anticuerpo anti-CD25 PC61 del sobrenadante de cultivo PC61 *in vitro*. Como se puede observar en la tabla 1, se obtuvo un rendimiento promedio cercano a los 32 μ g de anticuerpo PC61 por ml de sobrenadante de cultivo.

Por otra parte, se requiere un anticuerpo control para los experimentos a realizar, el cual debe ser del mismo isotipo que el anticuerpo PC61 (IgG1), pero con una especificidad diferente. El anticuerpo control de isotipo utilizado fue el F4-1D1, el cual se obtuvo de la misma manera que el PC61. El rendimiento de la purificación de este anticuerpo fue en promedio cercano a los 52 μ g/ml de cultivo (Tabla 1).

Para verificar la pureza de ambos anticuerpos, realizamos una electroforesis desnaturalizante y reductora. Como se observa en la Fig. 15, observamos 2 bandas con pesos moleculares cercanos a los 50 y 25 KDa, lo que nos indica que son la cadena pesada y ligera del anticuerpo, respectivamente. Cada vez que se precipitan los anticuerpos, se realiza una electroforesis para comprobar su pureza.

Tabla 1. Rendimiento del anticuerpo PC61 y su control de isotipo F4-1D1

PC61				F4-1D1			
Muestra	Total (mg)	Sobrenadante de cultivo (ml)	Rendimiento ($\mu\text{g/ml}$ de cultivo)	Muestra	Total (mg)	Sobrenadante de cultivo (ml)	Rendimiento ($\mu\text{g/ml}$ de cultivo)
1	2.63	108	24	1	3.78	99	38
2	3.1	103	30	2	7.02	88	79
3	4.14	109	37	3	4.756	90	52
4	4.14	110	37	4	2.96	73	40
5	3.78	108	35				
Promedio	3.55	107.6	32.6	Promedio	4.63	87.5	52.25

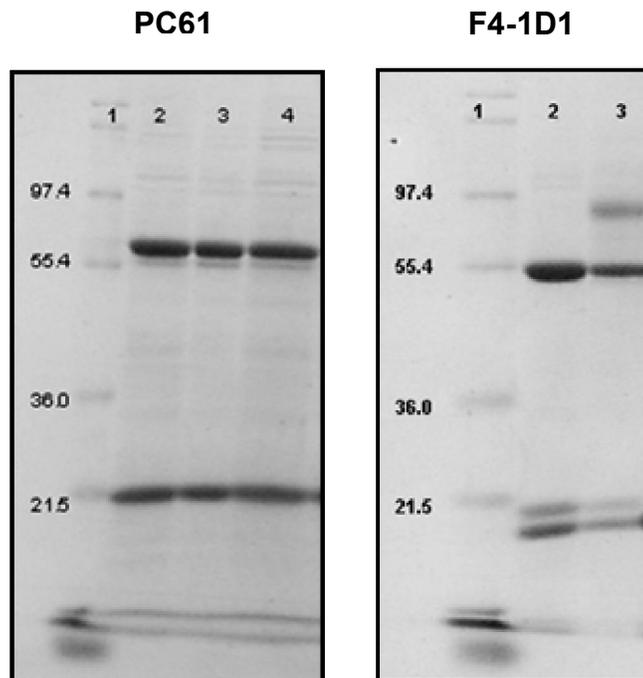


Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE (10% de acrilamida) del anticuerpo PC61 y F4-1D1 purificados. Carril 1: MPM (kDa). Carril 2, 3 y 4: muestras de los anticuerpos respectivos.

2. Montaje de la técnica de depleción de células CD25⁺ *in vivo*

Ya obtenido el anticuerpo PC61 anti-CD25, se procedió a montar la técnica de depleción *in vivo* inyectando este anticuerpo en ratones BALB/c. Hay que recordar que aunque la inyección del anticuerpo anti-CD25 es capaz de depletar células Tregs, también se eliminarían las células que expresen este marcador, incluyendo células Teffs. Debido a esta posibilidad y a que en la literatura hay reportes de depleción con dosis que van desde 100 µg y hasta 1 mg por vía intraperitoneal [187-191], se utilizó en un inicio, una dosis de 100 µg del anticuerpo PC61 por vía intraperitoneal, evaluando el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ en el bazo 2 días después (Fig. 16). Como podemos observar en la Fig. 17, 2 días después de la inyección de 100 µg del anticuerpo PC61, se disminuye el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ de 11.74% en nuestro ratón control (DPBS) a 1.69% en el ratón depletado. Por lo tanto, la inyección de 100 µg es capaz de eliminar cerca del 85% de las células CD4⁺CD25⁺.

En la Fig. 18 se explican los pasos que se siguieron para detectar por citometría de flujo las células CD4⁺CD25⁺.

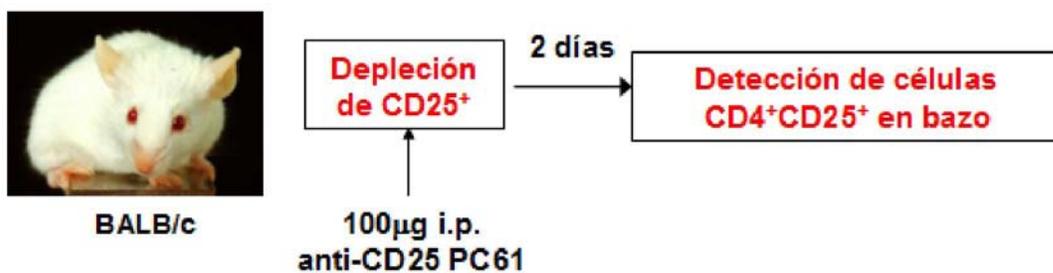


Figura 16. Protocolo de depleción de células CD4⁺CD25⁺.

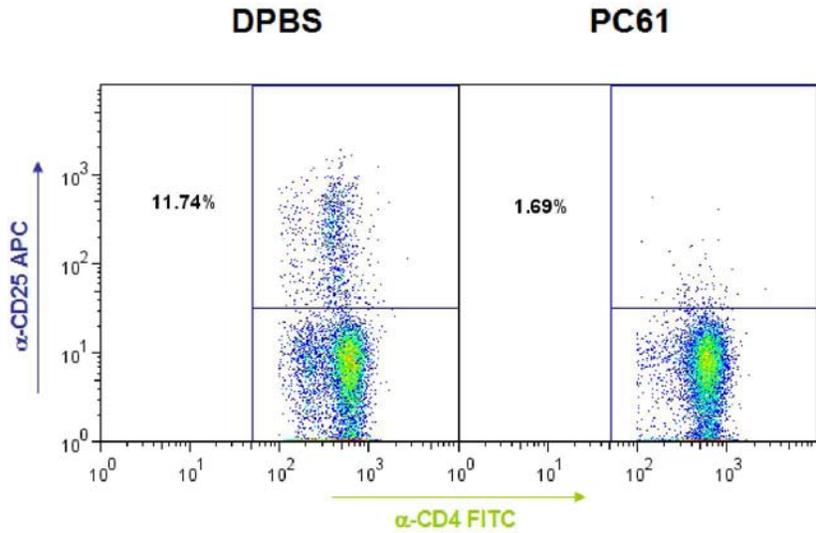


Figura 17. Determinación de células $CD4^+CD25^+$ en ratones depletados con el anticuerpo PC61. Grupos de 2 ratones BALB/c se inyectaron con 100 μ g del anticuerpo anti-CD25 PC61 o con DPBS por vía i.p., y dos días después se determinó el porcentaje de células $CD4^+CD25^+$ en bazo por IFA utilizando los anticuerpos anti-CD4 FITC y anti-CD25 APC. Datos representativos de 2 ratones por grupo. El análisis de poblaciones se realizó de acuerdo a lo descrito en la Fig. 18.

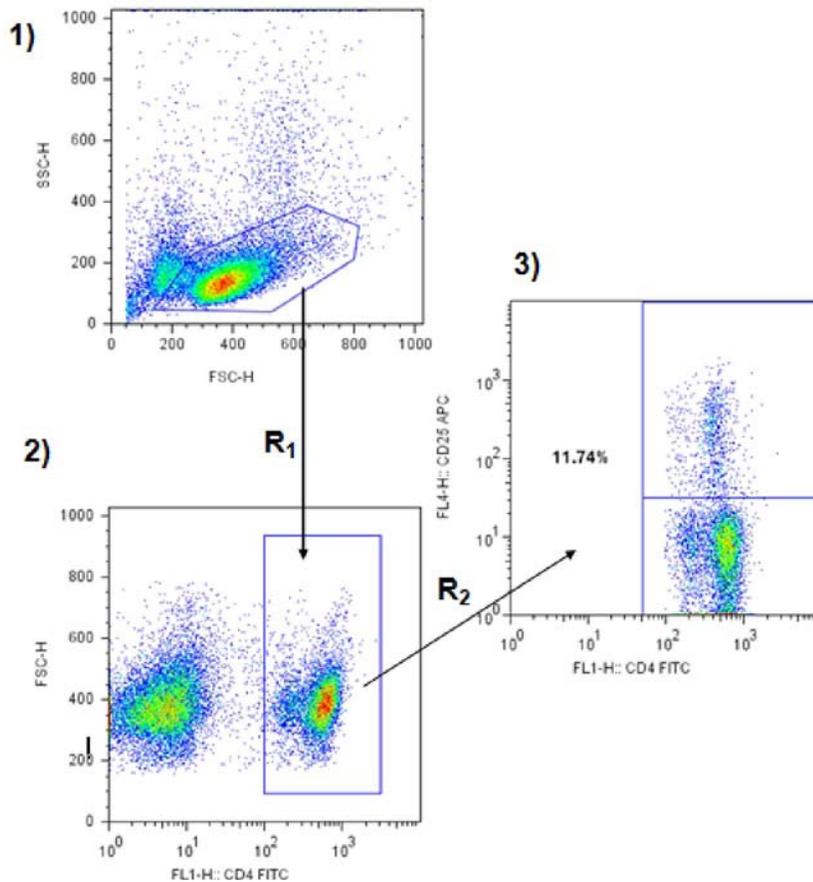


Figura 18. Estrategia de análisis en las distintas poblaciones celulares al teñir con 2 anticuerpos. De una región de tamaño vs granularidad (1), se selecciona otra región de tamaño contra células $CD4^+$ (2). Al final se selecciona en los ejes de la gráfica la población $CD4^+CD25^+$ (3).

Como ya se comentó anteriormente, hay un amplio repertorio con respecto a las dosis de anti-CD25 utilizadas para depletar las células Tregs. En la literatura se reportó que al depletar con 500 μg de este anticuerpo, la depleción de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ dura cerca de 14 días [192]. El siguiente paso fue determinar el tiempo que dura la depleción de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ utilizando 100 μg ó 200 μg del anticuerpo PC61. Para analizar las poblaciones celulares, se incluyeron anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD25 y en análisis realizado se detalla en la Fig. 19.

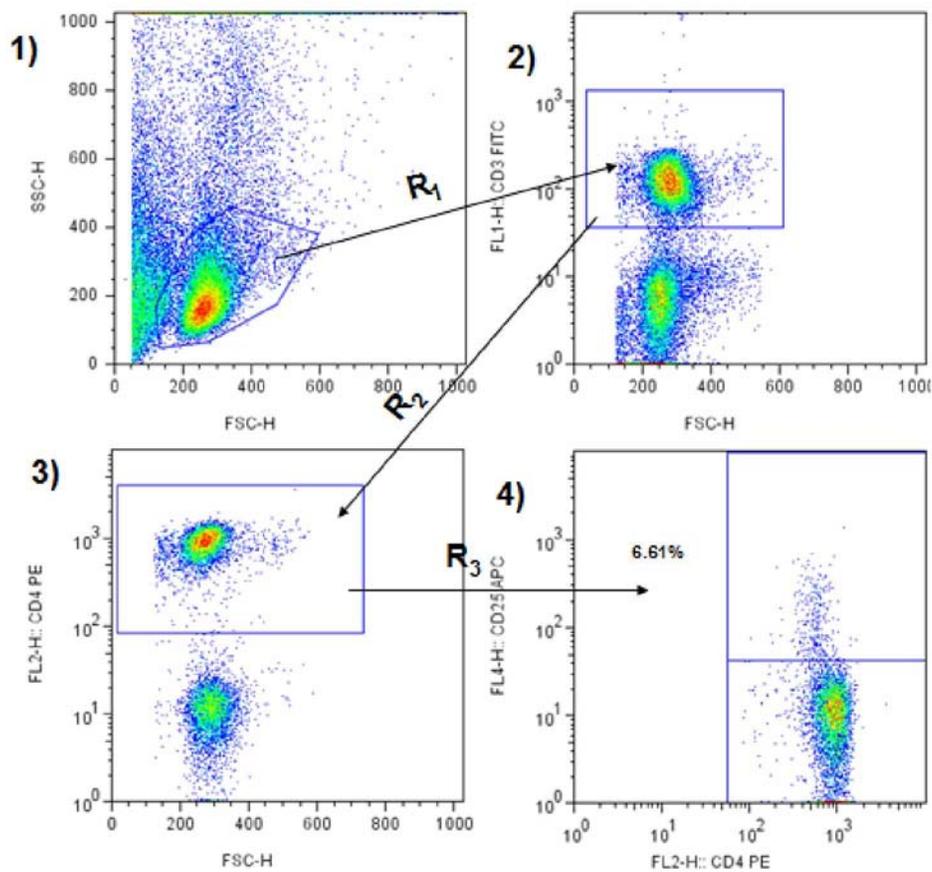


Figura 19. Estrategia de análisis en las distintas poblaciones celulares al teñir con 3 anticuerpos. De una región de tamaño y granularidad (1), se selecciona otra región de tamaño contra células CD3^+ (2), de ésta se selecciona otra región de tamaño contra células CD4^+ (3). Al final se selecciona en los ejes de la gráfica la población $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ (4).

Posteriormente se llevó a cabo el estudio de la cinética de depleción/“aparición” de células Tregs en el bazo de ratones depletados con 100 ó 200 μg del anticuerpo PC61. Para este experimento se tuvieron grupos de 10 ratones que se sacrificaron a los días 3, 7, 10 y 14 post-depleción (2 ratones por día) y se determinó el porcentaje de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ en el bazo. Como podemos observar en la Fig. 20, los ratones no depletados tienen aproximadamente 14% de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$. Los animales sacrificados a los 3 días post-depleción, depletados con 100 μg del anti-CD25 PC61 tienen 3% aproximado de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ y mantienen este porcentaje hasta el día 7. Es al día 10 cuando comienza a reaparecer el porcentaje de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ (cerca del 7%) y al día 14 ya casi se recuperó. En los ratones depletados con 200 μg el porcentaje se mantiene bajo hasta el día 10 (3.46%) y al día 14 ya hay una recuperación casi total (12%). Con estos resultados concluimos que la dosis ideal para depletar a los ratones por vía intraperitoneal es de 200 μg ya que la depleción dura más tiempo.

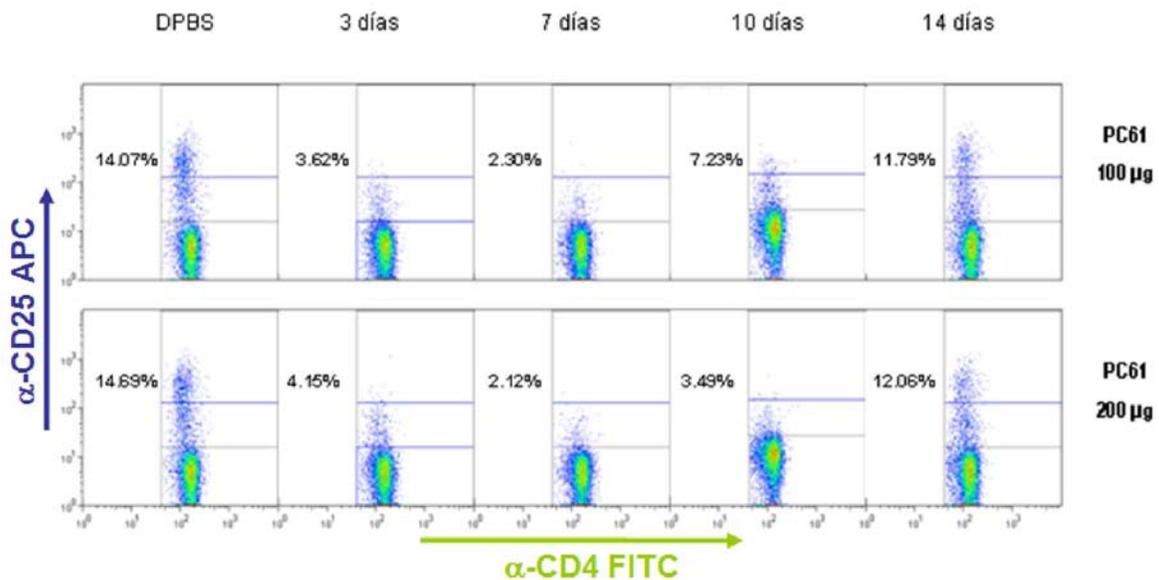


Figura 20. Análisis de la depleción de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ en bazo de ratones BALB/c. Los ratones se inyectaron al día 0 con 100 ó 200 μg del anticuerpo anti-CD25 PC61 y se evaluó el porcentaje de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ por citometría de flujo. Estos datos son representativos de 10 ratones por grupo (se sacrificaron 2 ratones de cada lote por día). El análisis de poblaciones se realizó de acuerdo a lo descrito en la Fig. 19.

3. Análisis de la depleción de células CD25⁺ en sangre

A continuación, se montó la técnica de detección de células CD25⁺ en sangre con el fin de poder evaluar la depleción en el mismo ratón sin la necesidad de tener un lote grande de animales e inclusive hacerlo en intervalos más largos de tiempo.

Tomando en cuenta todo lo anterior y como ya habíamos establecido que la dosis ideal para depletar células CD4⁺CD25⁺ era de 200 µg, grupos de 2 ratones recibieron esta dosis i.p., y se analizó el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ en la sangre de ratones C57BL/6J por citometría de flujo. Cabe mencionar que se cambió de cepa de ratón debido a que al inicio del montaje de nuestra técnica no había disponibilidad de animales de la cepa C57BL/6J en el bioterio del Instituto.

Al momento de realizar este experimento ya contábamos con el anticuerpo control de isotipo F4-1D1, por lo que inyectamos la misma dosis de este anticuerpo (200 µg) en el grupo control. Los ratones inyectados con el control de isotipo presentan un porcentaje similar durante toda la cinética (5.11- 6.23%, Fig. 21), mientras que los ratones inyectados con el anticuerpo PC61 disminuye el porcentaje de células cercano al 0% al día 2 y se mantiene al día 9, del día 16 al 23 hay recuperación parcial del porcentaje y al día 30 se llega al 5.06%. Estos resultados nos señalan que podemos seguir la cinética de depleción también en sangre. Asimismo, parece haber una depleción más prolongada de células CD4⁺CD25⁺ en la sangre de los ratones que en el bazo pues en este último dura aproximadamente 15 días, mientras que dura en sangre 30 días (Fig. 20 y 21).

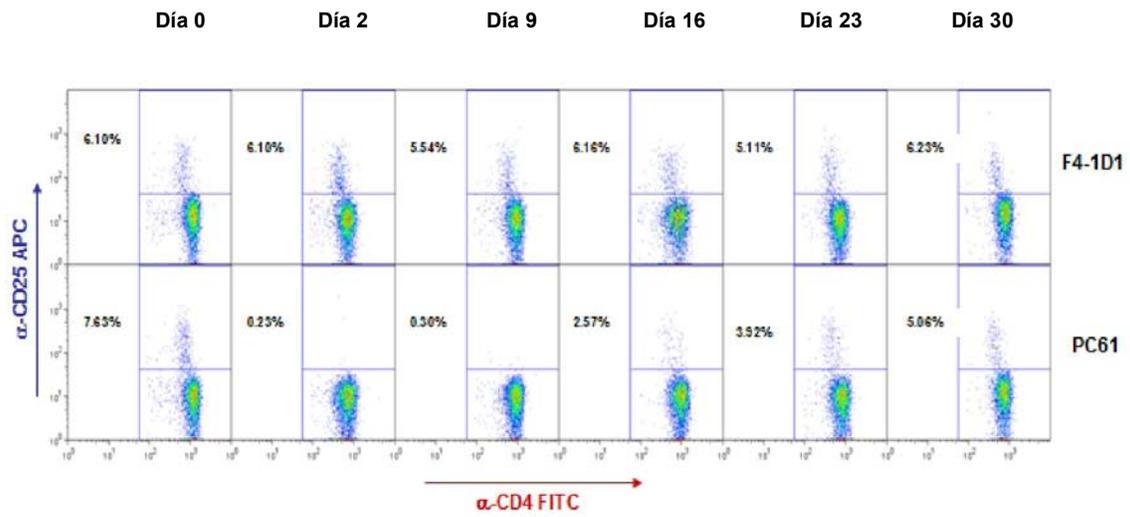


Figura 21. Análisis de la depleción de células CD4⁺CD25⁺ en sangre de ratones C57BL/6J. Los ratones se inyectaron al día 0 con 200 µg del anticuerpo anti-CD25 PC61 (control de isotipo F4-1D1) y se evaluó el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ por citometría de flujo. Estos datos son representativos de 2 ratones por grupo. El análisis de poblaciones se realizó de acuerdo a lo descrito en la Fig. 19.

4. Determinación del papel de las células Tregs durante la infección con la cepa Me49

Habiendo encontrado la dosis necesaria para depletar las células $CD4^+CD25^+$ y teniendo la cinética de depleción tanto en bazo como en sangre, nos dispusimos a determinar cuál es el papel de las células Tregs durante la infección con *Toxoplasma gondii*.

La estrategia experimental que se siguió se describe en la Fig. 22, donde grupos de ratones fueron depletados con 200 μ g del anticuerpo anti-CD25 por vía intraperitoneal (o el anticuerpo control de isotipo F4-1D1) y 2 días después se infectaron con 20 quistes de la cepa Me49 de *T. gondii* por vía oral. En los primeros experimentos realizados se utilizó DPBS como control (no se contaba con el anticuerpo control de isotipo F4-1D1). Se evaluó la mortalidad, el peso, el número de quistes en cerebro 30 días después de la infección y la cinética de depleción de células Tregs.

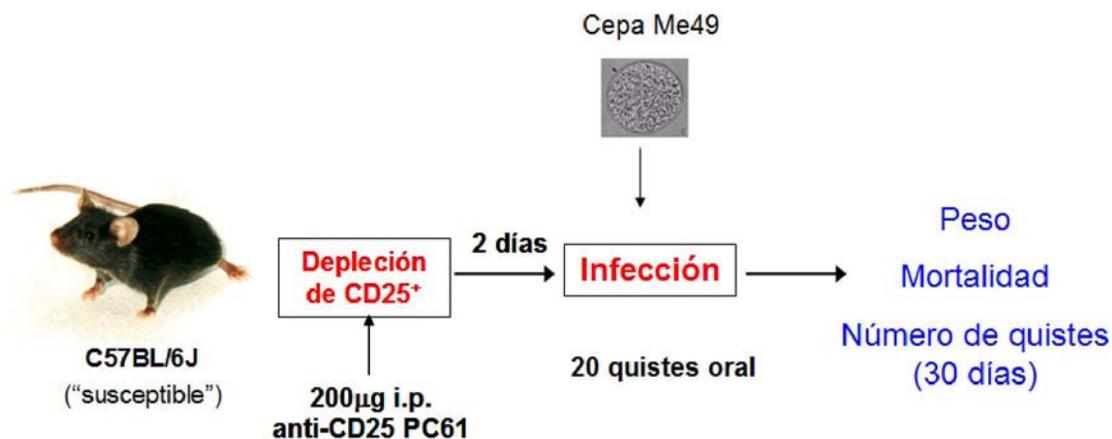


Fig. 22. Protocolo para determinar el papel de las células Tregs durante la infección con la cepa Me49 de *Toxoplasma gondii*.

Determinamos la variación en el peso, como un parámetro del estado de salud general del animal, como se ha reportado en la literatura [193;194]. Como podemos observar en la Fig. 23, ambos grupos comenzaron con un peso promedio de 18 g. En los ratones control, los animales bajan de peso a partir del día 6, aunque el comportamiento era heterogéneo. A partir del día 11 poco a poco comienzan a recuperarlo. Los ratones depletados bajan de peso desde el día 5 y tardan más en recuperarlo conforme avanza el tiempo. A diferencia del grupo control, el peso de los ratones depletados se vuelve más homogéneo con tendencia a mantenerlo bajo. Todo lo anterior se aprecia de una mejor manera en la Fig. 24, donde el peso se normalizó a porcentaje, tomando el peso promedio del día -2 (día de la depleción) como el 100%. Claramente observamos que los ratones depletados bajan aún más de peso que los controles y no lo recuperan como los animales control, lo que sugiere que las células Tregs se ven implicadas en la protección de los animales durante la infección con *T. gondii*, ya que su ausencia favorece la disminución del peso.

Al analizar la mortalidad, observamos que 50% de los ratones control (DPBS) mueren entre el día 80 y 105, que corresponde a la fase crónica de la infección. Sin embargo, muere el 50% de los ratones inyectados con el anticuerpo PC61 durante la fase aguda de la infección, en los días 11 y 17 y es en la fase crónica de la infección cuando el resto de los ratones muere, entre los días 77 y 97. Se encontraron diferencias significativas entre estos grupos (Fig. 25).

Otro parámetro a evaluar en nuestro estudio fue el número de quistes en cerebro 30 días después de la infección. Lo hicimos a este tiempo ya que durante la fase aguda de la infección (1-2 semanas), *T. gondii* se dispersa por todo el organismo como taquizoíto y es muy difícil observarlo como quiste en el cerebro. Es a inicios de la fase crónica (cerca de un mes de infección) cuando ya se pueden detectar quistes en el cerebro. Como podemos observar en la Fig. 26, en los ratones control se observaron menos quistes que en los ratones depletados. La Fig. 26b muestra los promedios con su desviación estándar,

encontrando diferencias significativas entre los grupos. Los tres experimentos descritos (peso, mortalidad y número de quistes) nos llevó a concluir que las células Tregs participan en la protección de los ratones C57BL/6J durante la infección con *T. gondii*.

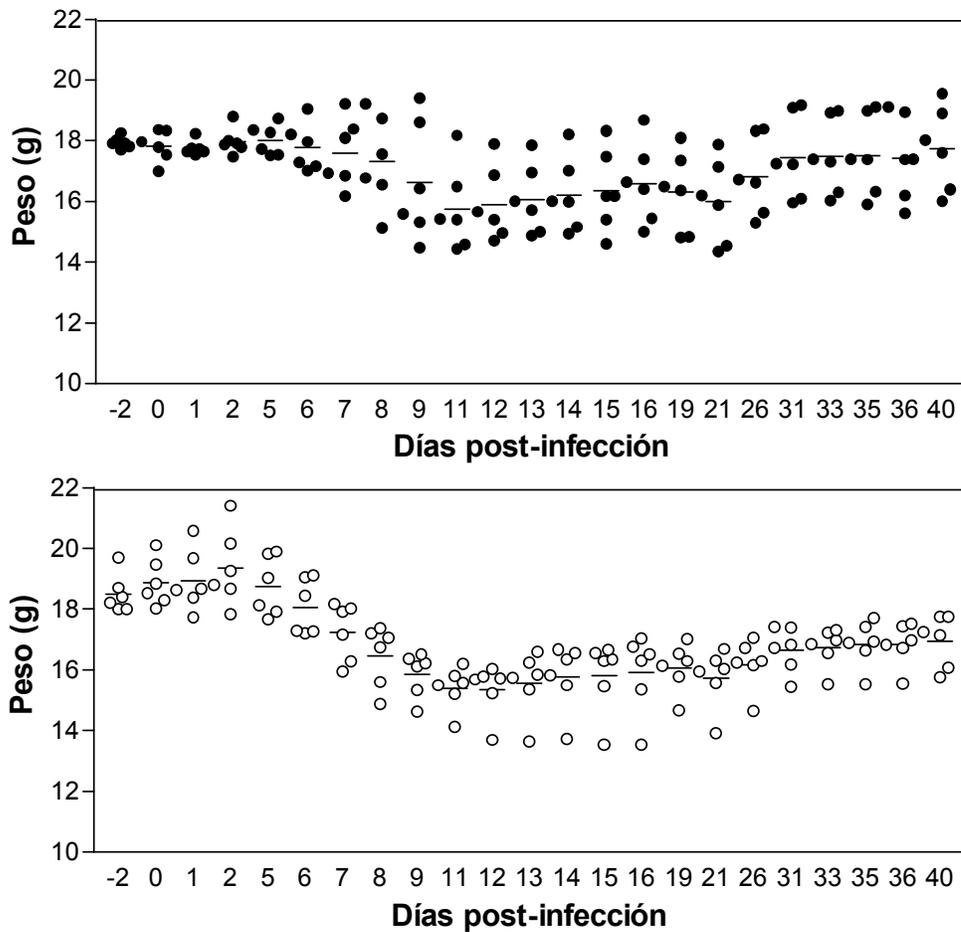


Figura 23. Curva de peso. Ratones C57BL/6J se inyectaron con 200 μ g del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal (○) o DPBS (●) y se infectaron con 20 quistes de la cepa Me49 de *T.gondii*. Cada punto representa un ratón. Datos representativos de 6 ratones por grupo.

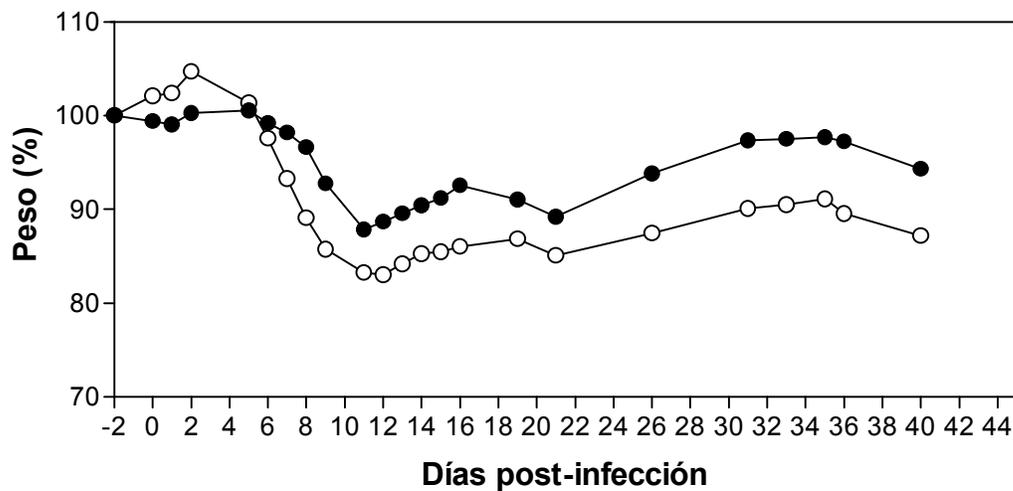


Figura 24. Normalización del peso. Los datos descritos en la gráfica anterior se normalizaron tomando el peso promedio del día -2 (día de la depleción) como el 100%. Ratones inyectados con 200 μ g del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal (○) o DPBS (●). Datos representativos de 6 ratones por grupo.

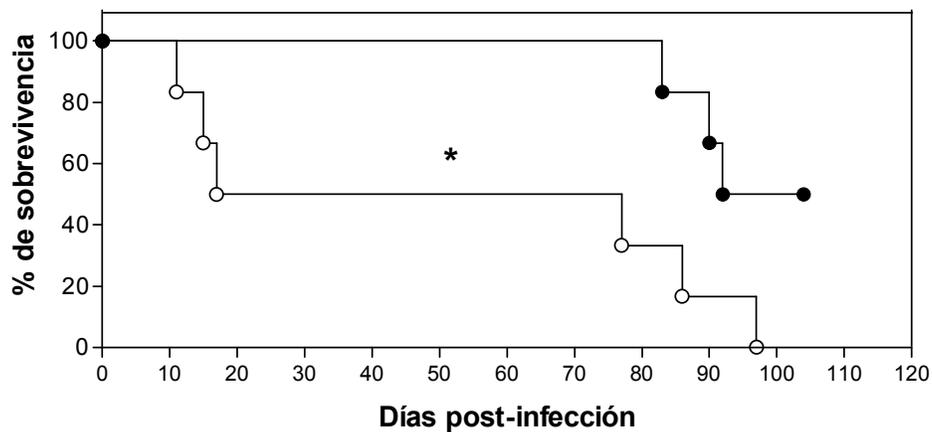


Figura 25. Curva de mortalidad. Ratones C57BL/6J se depletaron con 200 μ g del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal (○) o DPBS (●) infectados 2 días después con 20 quistes de la cepa Me49 de *T.gondii* por vía oral. Datos representativos de 6 ratones por grupo. * Para conocer diferencias significativas entre los grupos, se realizó una prueba "Log-rank test" con un $\alpha=0.05$.

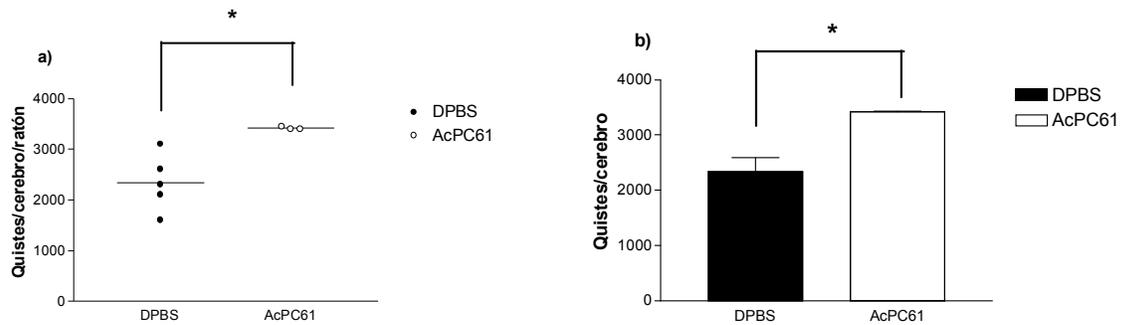


Figura 26. Número de quistes en cerebro 30 días p.i. Ratones C57BL/6J inyectados con 200µg del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal (○) o DPBS (●) e infectados con 20 quistes de la cepa Me49 de *T.gondii*. Número de quistes por cerebro por ratón (12a, cada punto es un ratón) y promedio total por grupo mas desviación estándar (12b). * p<0.001.

Para confirmar los datos obtenidos, hicimos réplicas de nuestros experimentos de acuerdo a lo descrito en la Fig. 22 (incluyendo como control un anticuerpo isotipo F4-1D1 y animales no infectados y no depletados). Como podemos observar en la Fig. 27, obtuvimos resultados similares a los descritos en las Figs. 21, 22 y 23 con respecto a la mortalidad y el peso. Lo anterior confirma la participación protectora de las células Tregs durante la infección con *T. gondii*.

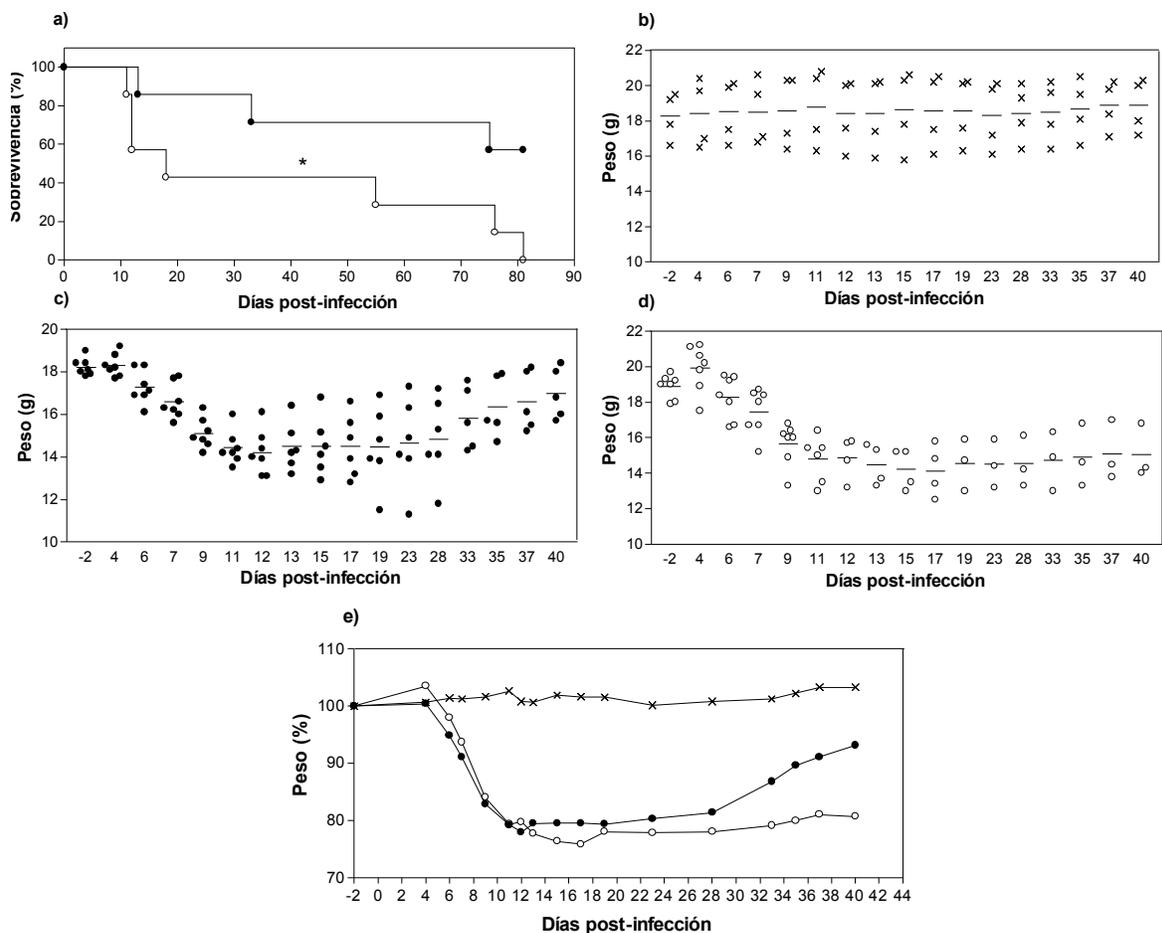


Figura 27. Reproducibilidad de los experimentos. Ratones C57BL/6J no tratados (x), inyectados con 200µg del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal (○) o 200µg del anticuerpo control de isotipo F4-1D1 (●) e infectados con 20 quistes de la cepa Me49 de *T.gondii*. Mortalidad (a), peso de ratones no tratados (b, x), infectados e inyectados con el control de isotipo (c, ●) e infectados e inyectados con el anticuerpo PC61 (d, ○) cada punto es un ratón y normalización del peso a porcentaje (d) tomando el peso del día -2 (día de la depleción) como el 100%. Datos representativos de 7 ratones por grupo * p<0.001.

Una de las preguntas hechas desde el inicio de esta tesis, es si la inyección del anticuerpo anti-CD25 PC61 depleta las células Tregs ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) y al mismo tiempo las células Teffs ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$), porque como se ha mencionado, ambas poblaciones expresan el CD25. En la literatura se ha demostrado que la inyección del anticuerpo PC61 es capaz de depletar las células que expresen CD25, sean o no Tregs [195;196]. También es ampliamente reconocido que todas las células Tregs naturales expresan el factor de transcripción $Foxp3^+$ en ratones, pero que hay células $Foxp3^+$ que son $CD25^-$ [197;198].

Con el fin de determinar el porcentaje de células Tregs eliminadas por la inyección del anticuerpo PC61 durante la infección con *T. gondii*, se analizó el porcentaje de células $CD4^+CD25^+$, $CD4^+Foxp3^+$, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Tregs naturales) y $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ (células Teffs) por citometría de flujo en la sangre de los ratones a los días 0, 4 y 12 post-infección. Los análisis se realizaron de acuerdo a lo descrito en la Fig. 28.

Como podemos observar en la Fig. 29a y 31a, el tratamiento con el anticuerpo PC61 elimina casi por completo el porcentaje de células $CD4^+CD25^+$ a los días 0 y 4 post-infección, mientras que al día 12 ya una ligera recuperación de estas células. En la población $CD4^+Foxp3^+$ disminuye el porcentaje conforme avanza el tiempo hasta llegar a 0.64% al día 12 (Fig. 29b y 31b) Esta eliminación de células $CD4^+CD25^+$ o $CD4^+Foxp3^+$ no ocurre en aquellos animales no infectados y no depletados o en aquellos infectados e inyectados con el anticuerpo control de isotipo al día 0 y 4. Al día 12 de manera interesante, hay disminución de células $CD4^+Foxp3^+$ en los ratones infectados e inyectados con el anticuerpo control de isotipo, lo que nos sugiere que la infección favorece la disminución en el porcentaje de células $CD4^+Foxp3^+$ (de 9.86% al día 4 a 3.52% al día 12; Fig. 29b y 31b). Al analizar la población $CD4^+Foxp3^+$ en los ratones depletados al día 12 post-infección, vemos que hay disminución en el porcentaje de estas

células en estos animales, lo que nos sugiere que las células $CD4^+CD25^+$ que aumentan al día 12 post-infección (Fig. 29a) son células Teffs y no Tregs.

Para conocer si la inyección del anticuerpo PC61 elimina tanto células Tregs como Teffs, decidimos analizar en un solo "gating", las poblaciones de células Tregs, definidas como $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, o células Teffs, definidas como $CD4^+CD25^+Foxp3^-$. Como podemos observar en la Fig. 30, la inyección del anticuerpo PC61 elimina tanto células Tregs como Teffs al día 0 y 4, pero de manera sorprendente al día 12, el porcentaje de células Tregs se mantiene bajo, mientras el porcentaje de células Teffs ya aumentó a 8.24%. La disminución en el porcentaje de células Tregs y Teffs al día 0 y 4, no ocurre en los animales no infectados y no depletados y aquellos infectados e inyectados con el control de isotipo. Al día 12 post-infección en los animales infectados e inyectados con el control de isotipo existe disminución en el porcentaje de células Tregs (3.83%) y aumento en el porcentaje de células Teffs (8.73%) (Fig. 30). Es muy importante reiterar que la mortalidad del 50% del grupo de ratones inyectados con el anticuerpo PC61 está dada alrededor de estos días (entre el día 10 y día 16 post-infección, Fig. 25 y 27a) sumado a que es el punto más bajo en el peso de los ratones (Fig. 24 y 27c). Con base en lo anterior, podemos concluir que es la ausencia de células Tregs y no de Teffs la que provoca una mayor mortalidad, una mayor pérdida de peso y un mayor número de quistes en cerebro en ratones infectados con la cepa Me49 de *T. gondii*. Por lo tanto, podemos atribuir un papel protector a las células Tregs durante la infección con la cepa Me49 *T. gondii*.

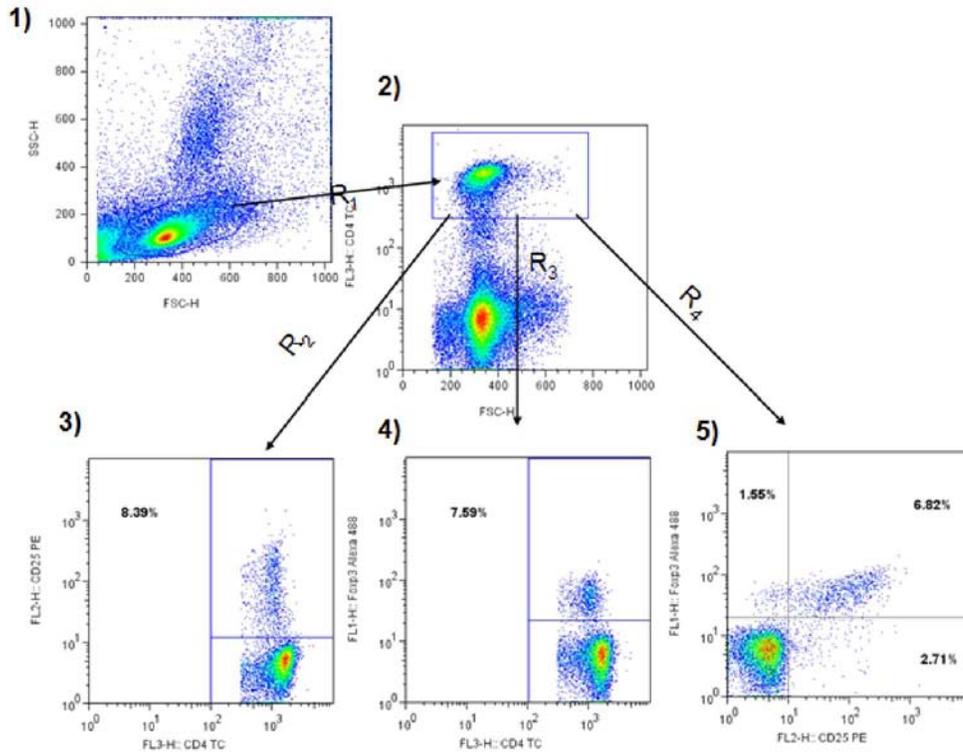


Figura 28. Estrategia de análisis en las distintas poblaciones celulares al teñir para FOXP3. De una región de tamaño vs granularidad (1), se selecciona otra región de tamaño contra células CD4⁺ (2) y al seleccionar los ejes deseados, se puede discernir entre la población CD4⁺CD25⁺ (3), CD4⁺FOXP3⁺ (4) y CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (5).

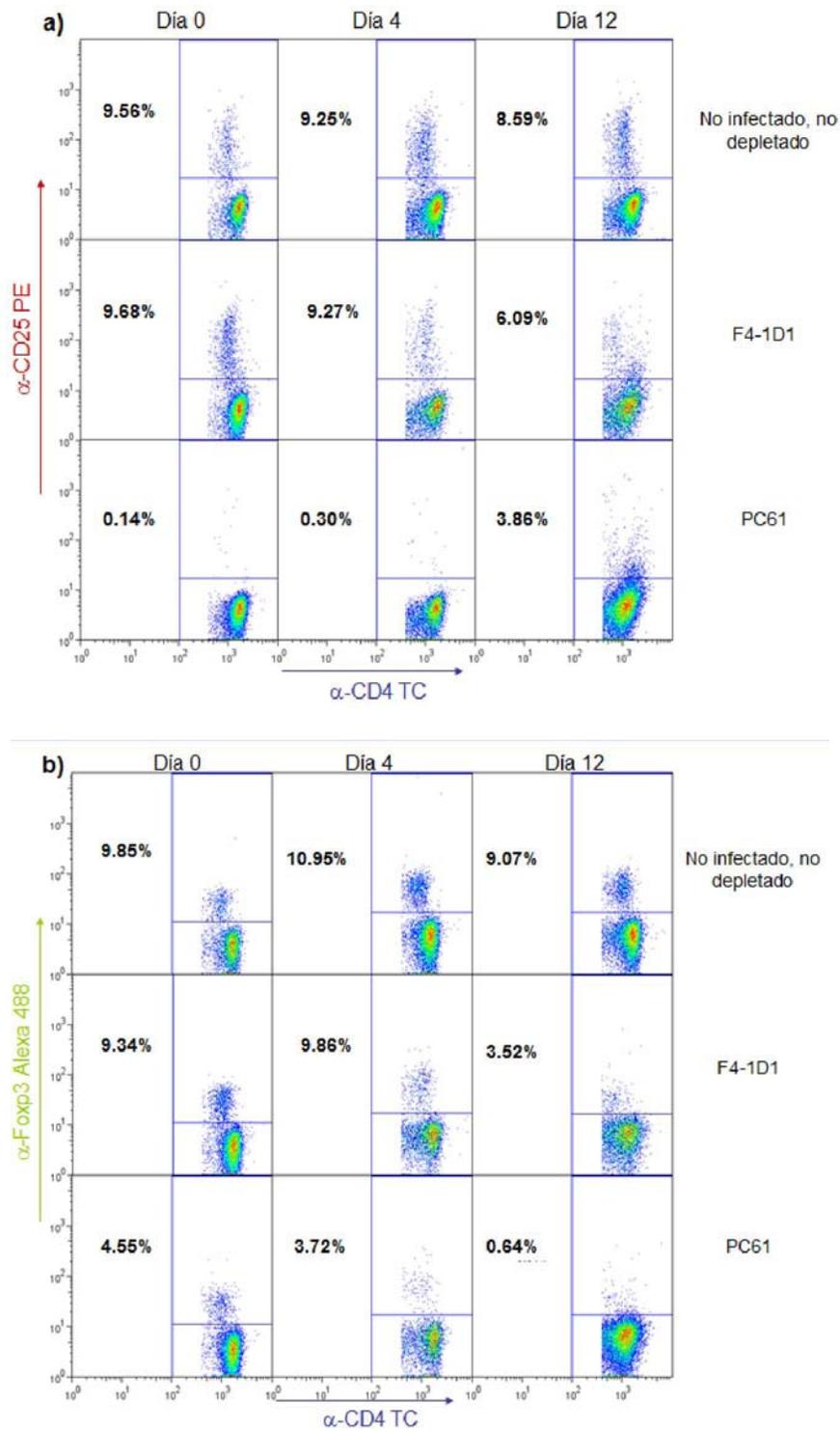


Figura 29. Cinética de células CD4⁺CD25⁺ (a) y CD4⁺Foxp3⁺ (b) en sangre. Ratones C57BL/6J sin tratamiento (panel superior), inyectados con 200 μ g del anticuerpo control de isotipo F4-1D1 (panel intermedio) o con 200 μ g del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal (panel inferior) e infectados con 20 quistes de la cepa Me49 de *T.gondii*. Datos representativos de un pool de sangre de 2 ratones. n=7 ratones por grupo.

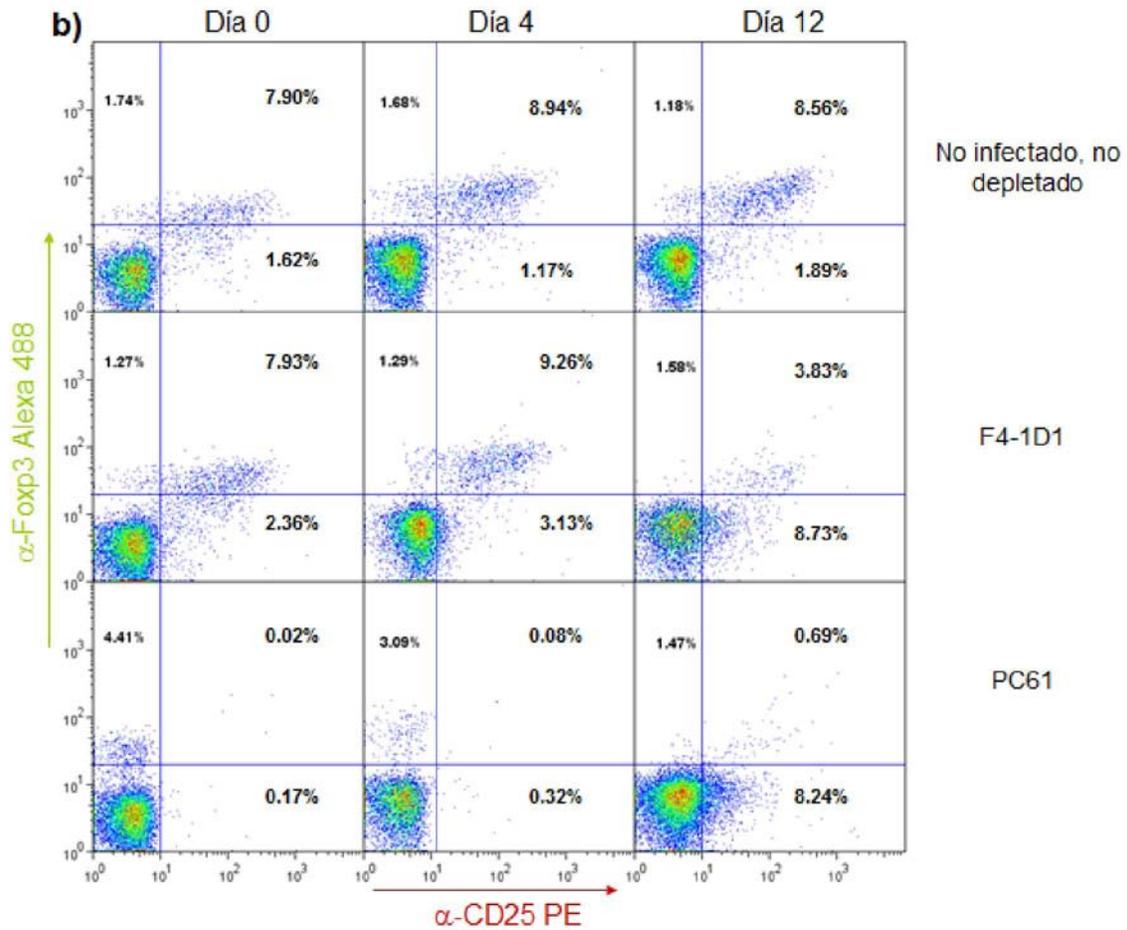


Figura 30. Cinética de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ en sangre. Ratones C57BL/6J sin tratamiento (panel superior), inyectados con 200 μ g del anticuerpo control de isotipo F4-1D1 (panel intermedio) o con 200 μ g del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal (panel inferior) e infectados con 20 quistes de la cepa Me49 de *T.gondii*. Datos representativos de un pool de sangre de 2 ratones. n=7 ratones por grupo.

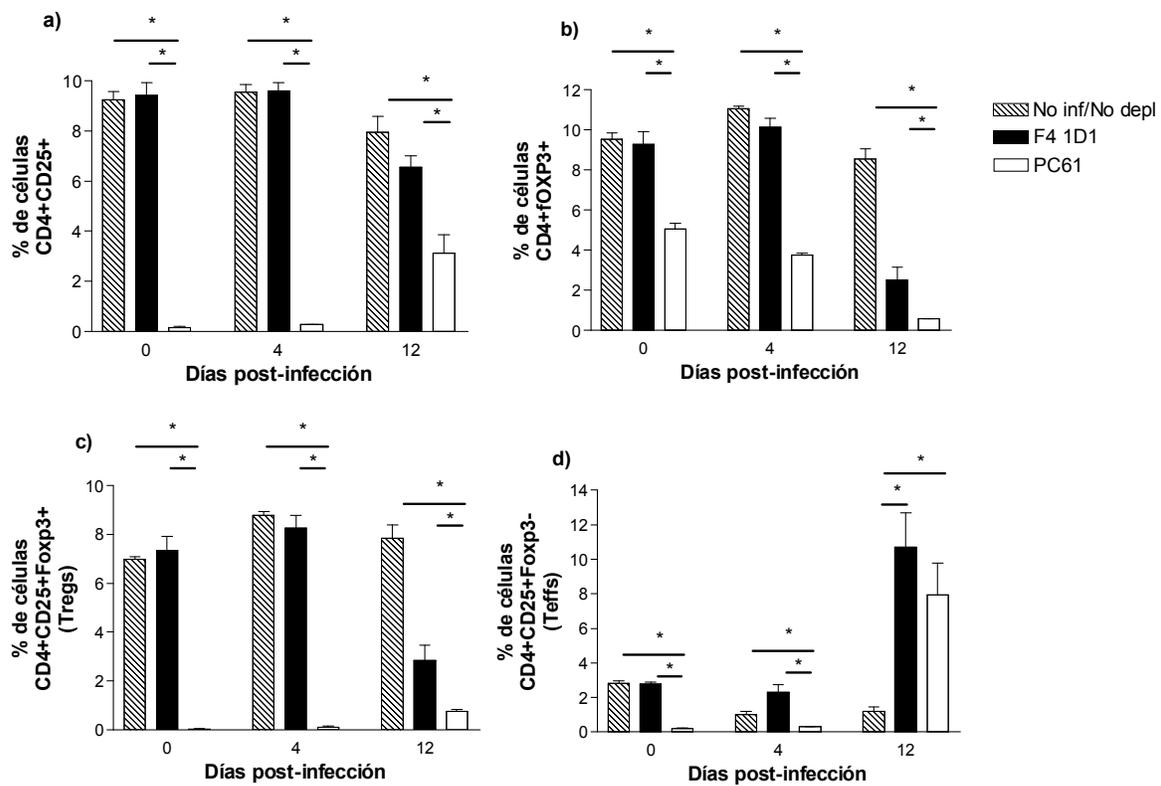


Figura 31. Porcentajes totales de las poblaciones analizadas en sangre. (a) Porcentaje de células CD4⁺CD25⁺, (b) CD4⁺Foxp3⁺, (c) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Tregs) y (d) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ (Teffs). n = 7 ratones por grupo. Al día 12 post-infección, debido a la mortalidad descrita en la figura 25a, el grupo de ratones depletados tiene únicamente 4 ratones en su grupo. * P<0.05

5. Participación de las células Tregs durante la infección con una cepa tipo I de *T. gondii*

Debido al papel protector de las células Tregs durante la infección con una cepa tipo II (Me49), quisimos saber qué papel tienen las células Tregs durante la infección con una cepa altamente virulenta de *T. gondii*, conocida como RH. Hay que recordar la letalidad de la cepa RH: su LD₁₀₀ es de 1 taquizoíto (Tx) no importando la cepa de ratón infectada, por lo que no hay susceptibilidad ni resistencia. La estrategia experimental seguida se describe en la Fig. 32.

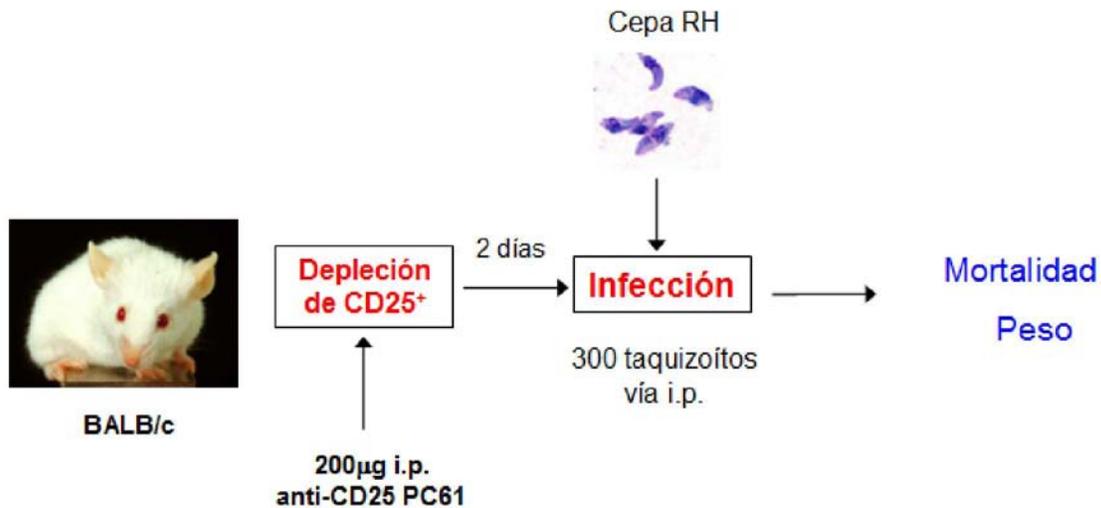


Figura 32. Estrategia experimental para determinar el papel de las células Tregs durante la infección con la cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

A los animales utilizados en este experimento se les monitoreó el peso como reflejo de su estado de salud. Como podemos observar en la Fig. 33, los ratones infectados e inyectados con el control de isotipo mantienen el peso hasta el día 4, comienzan a perderlo al día 5 y así gradualmente hasta el día 9 cuando todos se murieron (Fig. 33a), los ratones infectados e inyectados con el anticuerpo PC61 ganan peso al día 4 y lo mantienen hasta el día 6, que es cuando comienzan a perderlo y así gradualmente hasta el día 10 que es cuando todos mueren (Fig. 33b). Para comparar los grupos, se

normalizaron los pesos a porcentaje tomando el peso del día de la depleción (día -2) como el 100%. Como se muestra en la Fig. 33c, los ratones depletados nunca alcanzan pesos tan bajos como los ratones inyectados con el control de isotipo F4-1D1.

En la figura 33d se observa la mortalidad de los ratones descritos en el párrafo anterior. Nuestro grupo control presentó mortalidad a partir del día 7, al día 8 se llegó al 20% de sobrevivencia y al día 10 todos los ratones habían muerto. Se observa un ligero desplazamiento en la mortalidad del grupo depletado; aquí los ratones comienzan a morir al día 8 y es al día 10 donde hay aún 20% de sobrevivencia; al día 11 todos los ratones estaban muertos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Estos resultados nos señalan la participación de las células Tregs durante la infección con la cepa RH de *T. gondii* aunque, a diferencia de la participación protectora de estas células en la infección con la cepa Me49 de *T. gondii*, parecen tener una participación adversa durante la infección RH, ya que los ratones inyectados con el anticuerpo PC61 sobreviven más tiempo.

Al momento de realizar el experimento descrito en el apartado anterior, se publicó un artículo donde demostraron el papel adverso de las células Tregs en una infección experimental por *Trypanosoma congolense*, que se caracteriza por ser altamente virulenta en la cepa de ratón BALB/c, donde los ratones mueren de parasitemia fulminante al día 10 post-infección (muy similar a la cepa RH). La estrategia experimental que ellos utilizaron fue inyectar dosis muy bajas del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intravenosa, logrando la eliminación completa del parásito y la sobrevivencia de los ratones [199]. Basándonos en lo antes descrito y que en el experimento anterior demostramos una posible participación adversa de las células Tregs, depletamos grupos de 4 ratones con dosis de 50 ó 25 μg del anticuerpo PC61 por vía intravenosa (como control inyectamos el anticuerpo F4-1D1); monitoreamos la mortalidad y la cinética de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ en sangre.

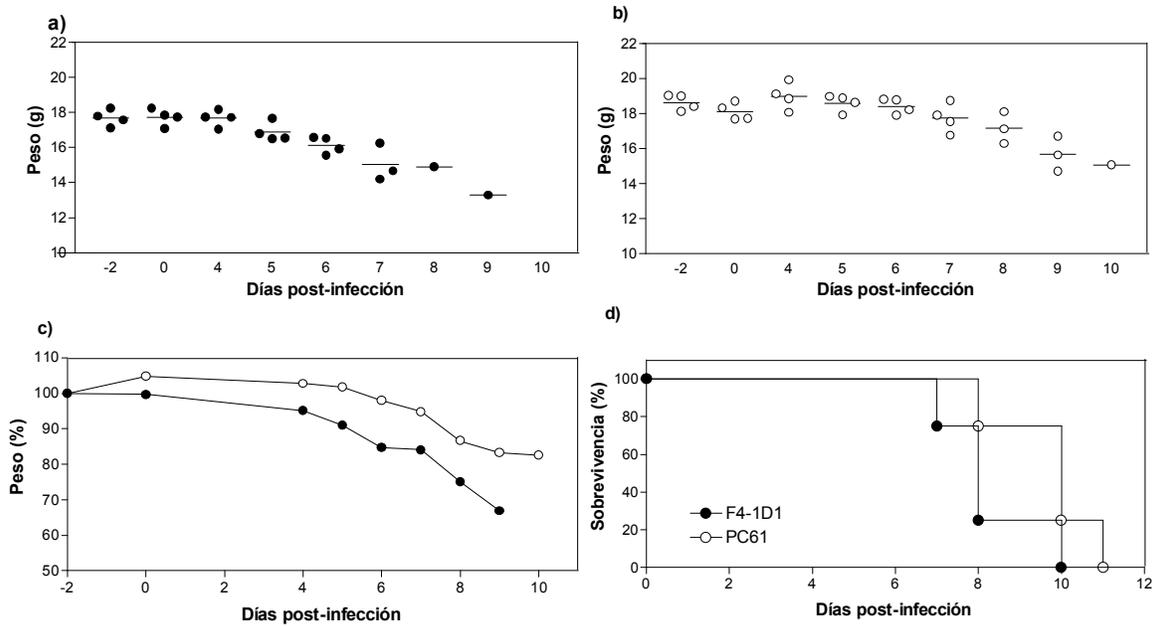


Figura 33. Curvas de peso y mortalidad. Ratones BALB/c inyectados con 200 μ g del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal (\circ) (b), o 200 μ g del anticuerpo control de isotipo F4-1D1 (\bullet) (b) e infectados con 300 Tx de la cepa RH de *T.gondii*. Cada punto representa un ratón (a y b). Para apreciar mejor las diferencias se normalizó el peso del día de la depleción (día -2) como el 100% (c). Mortalidad de los grupos (d). Datos representativos de 4 ratones por grupo

Como se observa en la Fig. 34, ya sean los ratones inyectados con 50 ó 25 μ g del control de isotipo F4-1D1 e infectados con la cepa RH de *T. gondii* o aquéllos sólo infectados, mueren de manera fulminante al día 8 post-infección. Sin embargo al depletar ya sea con 50 μ g o con 25 μ g, logramos observar que la mortalidad se desplaza de forma notable en hasta 4 días, aunque no de manera significativa. Lo anterior nos indicaba que posiblemente las células Tregs participan de manera adversa durante la infección RH de *T. gondii*.

Para probar la eficacia de nuestra depleción por vía intravenosa y confirmar la participación adversa de las células Tregs durante la infección por la cepa RH de *T. gondii*, medimos los porcentajes de las células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻ (Fig. 35 y 36) en la sangre de los ratones antes descritos al día 0 (día de la infección), 4 y 8 post-infección (unas horas antes de que se presentara la totalidad de la mortalidad en los ratones sólo infectados).

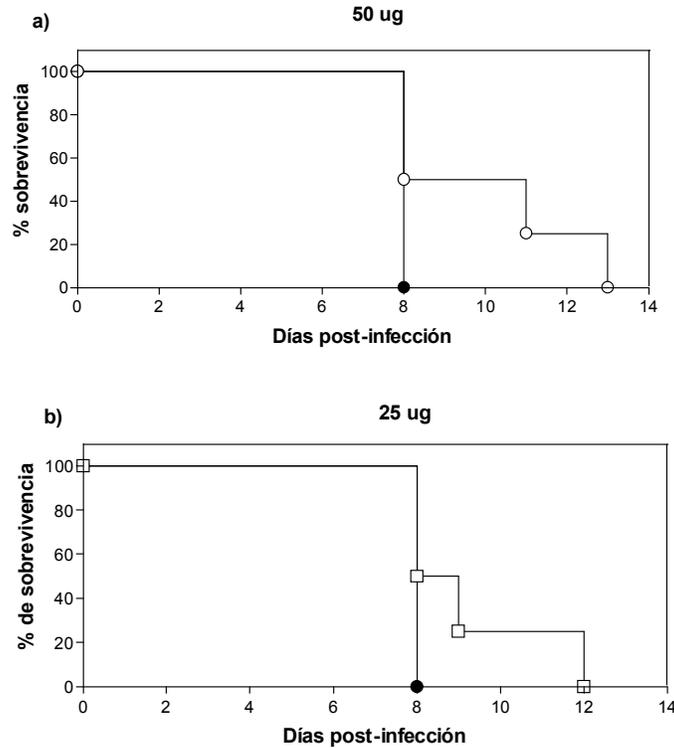


Figura 34. Curvas de mortalidad. Ratones BALB/c inyectados con 50 (a, ○) ó 25 (b, □) µg del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal e infectados con 300 Tx de la cepa RH de *T.gondii*. Se utilizó como control ratones sólo infectados (● a y b). Para conocer diferencias significativas entre los grupos, se realizó una prueba “Log-rank test” con un $\alpha=0.05$. Datos representativos de 4 ratones por grupo.

Los ratones infectados presentan porcentajes de células Tregs entre 5 y 8% a los días 0, 4 y 8 post-infección respectivamente y de células Teffs entre 4 y 2% a estos mismos días. Lo anterior también se observa en los ratones infectados e inyectados con el control de isotipo. Al depletar con 50 µg del anti-CD25 PC61 se ve una disminución casi en la totalidad de las células Tregs y Teffs (día 0, Fig. 35 y 36), aunque al día 4 ya hay presencia de ambas poblaciones. Al día 8 se mantiene un porcentaje muy semejante en estas dos poblaciones (3.76% de Tregs; 3.53% de Teffs. Fig 35 y 36). Estos resultados nos indican que el conservar el porcentaje basal de células Tregs (~8%) tiene un efecto adverso durante la infección con la cepa RH de *T. gondii* (es mayor el porcentaje de Tregs que de Teffs en aquellos ratones que se mueren primero). Aunque la inyección del anticuerpo PC61 disminuye el porcentaje de las células Tregs y Teffs, es esta baja en el porcentaje de ambas poblaciones lo que parece favorecer la mayor sobrevivencia en los ratones.

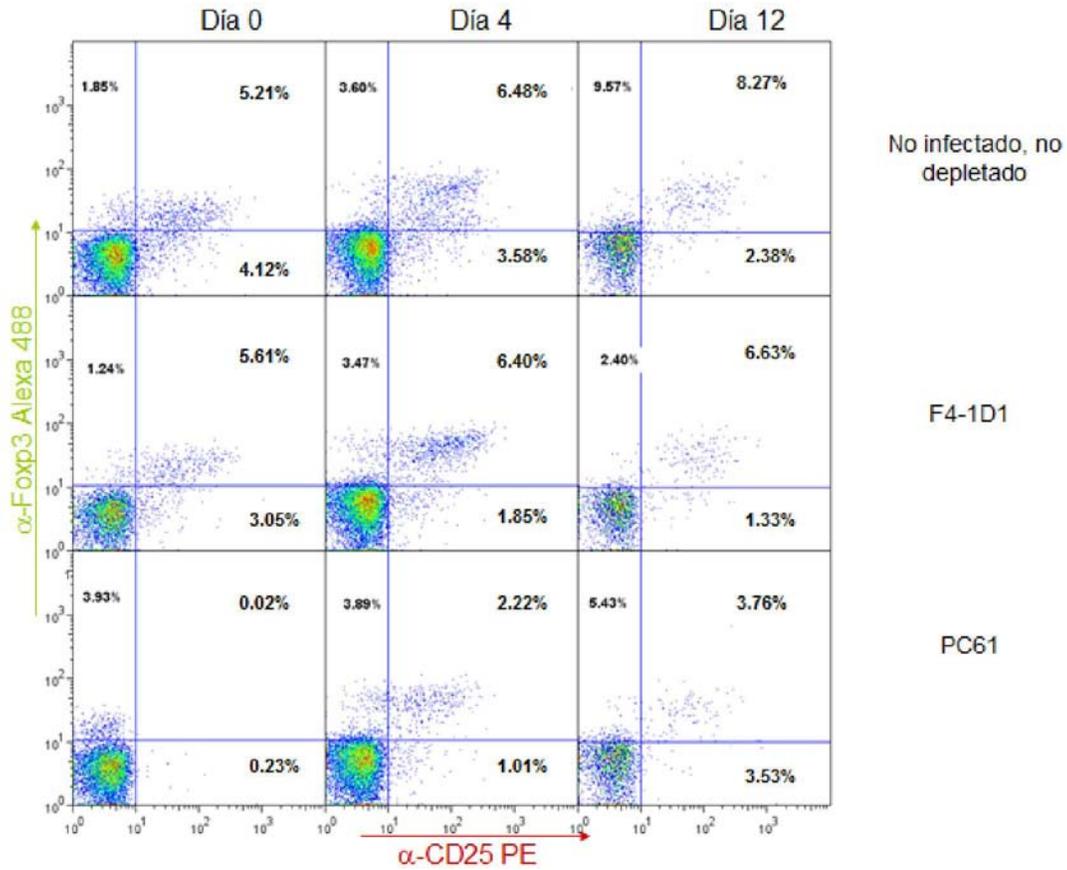


Figura 35. Cinética de células CD4⁺ CD25⁺FOXP3⁺ Ratones BALB/c sólo infectados (panel superior), inyectados con 50 µg del anticuerpo control de isotipo F4-1D1 (panel intermedio) o 50 µg del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intravenosa al día -2 e infectados con 300 Tx de la cepa RH de *T.gondii* al día 0. Datos representativos de un pool de sangre de 2 ratones. n=4 ratones por grupo.

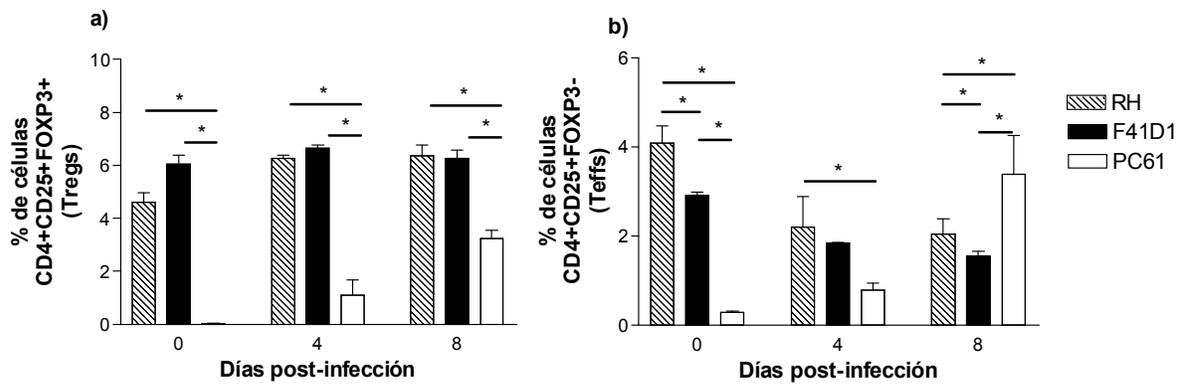


Figura 36. Porcentajes totales de las poblaciones analizadas en sangre. (a) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Tregs) y (b) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ (Teffs). n = 4 ratones por grupo. * P<0.05

Al analizar las poblaciones $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ (Tregs) y $CD4^+CD25^+FOXP3^-$ (Teffs) en los ratones inyectados con 25 μg del anticuerpo PC61, notamos que aún cuando el anticuerpo es capaz de eliminar ambas poblaciones de células, la duración es menor, ya que se alcanza el 3% de células Tregs al día 4 post-infección, mientras que la población de Teffs alcanza el 1% (Fig 37). Entonces, conforme disminuimos la dosis del anticuerpo PC61, también disminuye su eficacia para mantener la depleción de células $CD25^+$ y por lo tanto puede que esto se vea reflejado en que hubo mortalidad antes en este grupo, en comparación con el inyectado con 50 μg del anticuerpo PC61 (Fig. 34).

Al momento de hacer el análisis de linfocitos totales $CD25^+ Foxp3^-$ (no excluyendo linfocitos $CD4^+$ como en todos los análisis anteriores), se observó que hay un aumento considerable en el número de éstos, únicamente en los ratones depletados (nunca en los controles). La manera en que se observó la diferencia se describe en la Fig. 38 y los análisis correspondientes en la Fig. 39 y 40. En un ratón infectado, hay un porcentaje entre el 2 y 3% de linfocitos totales sean Tregs o Teffs a los días analizados (0, 4 y 8 post-infección, Fig. 39). Los ratones inyectados con 50 ó 25 μg del anticuerpo F4-1D1 e infectados mantienen un porcentaje entre el 2 y 4% de Tregs y Teffs a los mismos días, siendo más evidente un aumento al día 4 y 8 post infección (Fig. 39). En los ratones infectados e inyectados con 50 ó 25 μg del anticuerpo PC61, claramente observamos la disminución casi total de las células $CD25^+$ al día 0, pero de manera sorprendente hay una expansión enorme de una población efectora (porque expresa $CD25$) que es $Foxp3^-$ a los días 4 y 8 post-infección. No es notable la diferencia en porcentaje (Fig. 39) pero al hacer el análisis del número de células (Fig. 40), claramente se observa el aumento de células $CD25^+Foxp3^-$ al día 8 post-infección al depletar con 50 ó 25 μg del anticuerpo PC61.

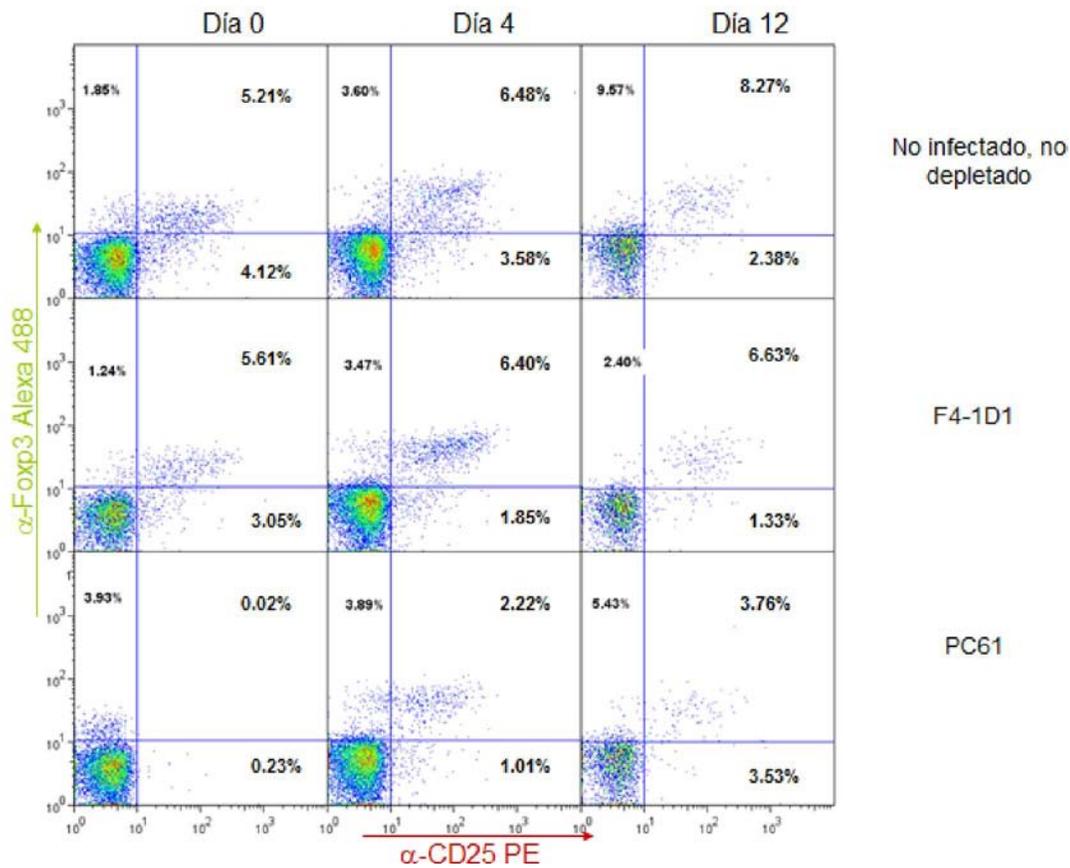


Figura 37. Cinética de células CD4⁺ CD25⁺FOXP3⁺ en sangre. Ratones BALB/c sólo infectados (panel superior), inyectados con 25 µg del anticuerpo control de isotipo F4-1D1 (panel intermedio) o 25 µg del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intravenosa al día -2 e infectados con 300 Tx de la cepa RH de *T.gondii* al día 0. Datos representativos de un pool de sangre de 2 ratones. n=4 ratones por grupo.

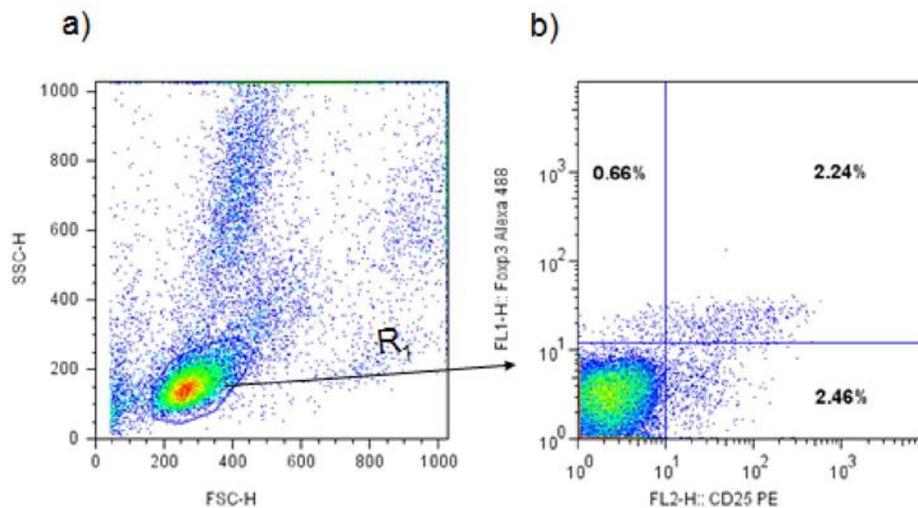


Figura 38. Análisis de una población total de linfocitos. De un panel de tamaño y granularidad (a), se seleccionan en otro panel (b) las células CD25 o FOXP3 dependiendo de los ejes. No se seleccionan exclusivamente (como en los demás análisis) aquellas células que sean CD4⁺.

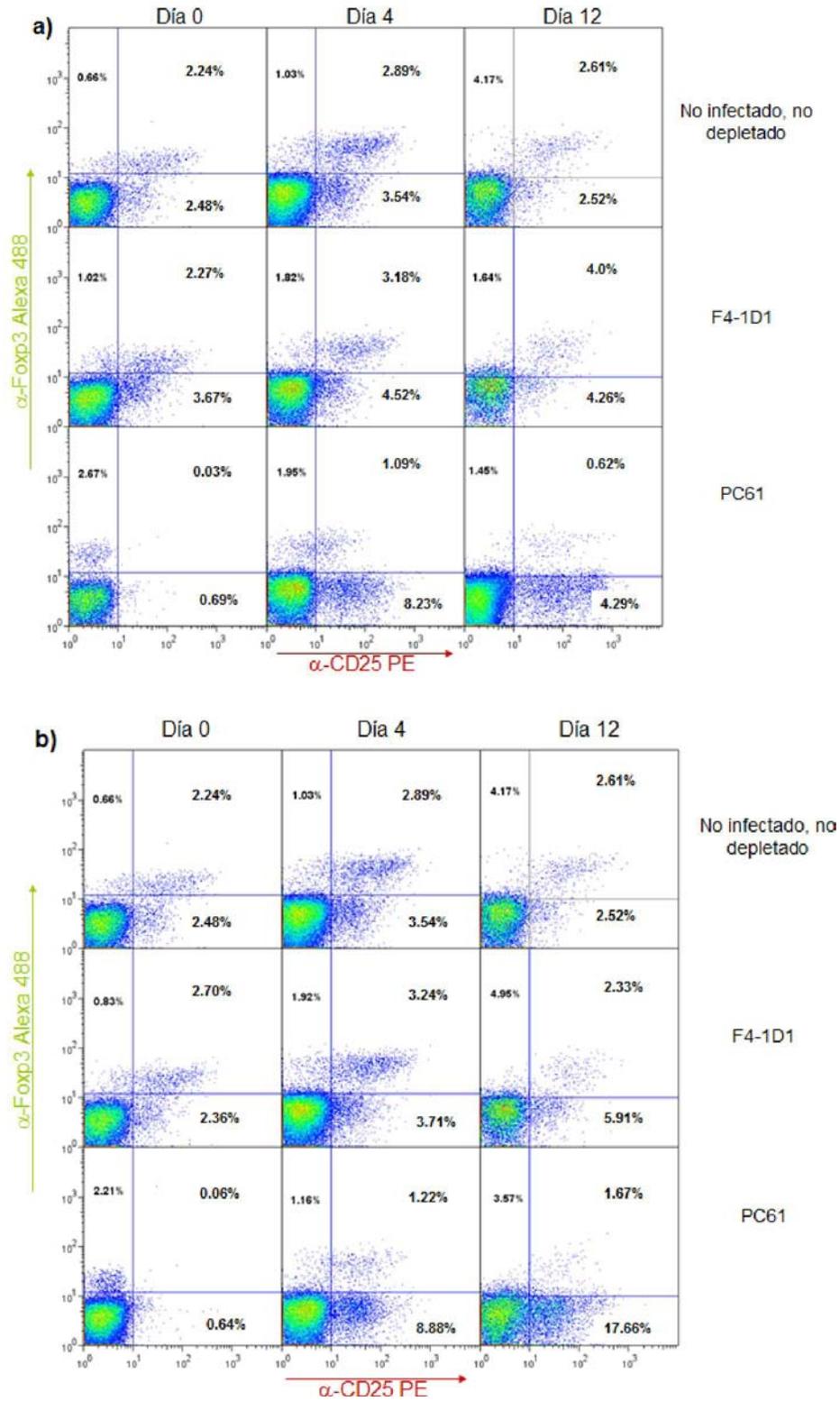


Figura 39. Cinética de la población total de linfocitos en sangre. Ratones BALB/c sólo infectados (panel superior), inyectados con 50 μ g (a) o 25 μ g (b) del anticuerpo control de isotipo F4-1D1 (panel intermedio) o 50 μ g (a) o 25 μ g (b) del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intravenosa al día -2 e infectados con 300 Tx de la cepa RH de *T.gondii* al día 0. Datos representativos de un pool de sangre de 2 ratones. n=4 ratones por grupo.

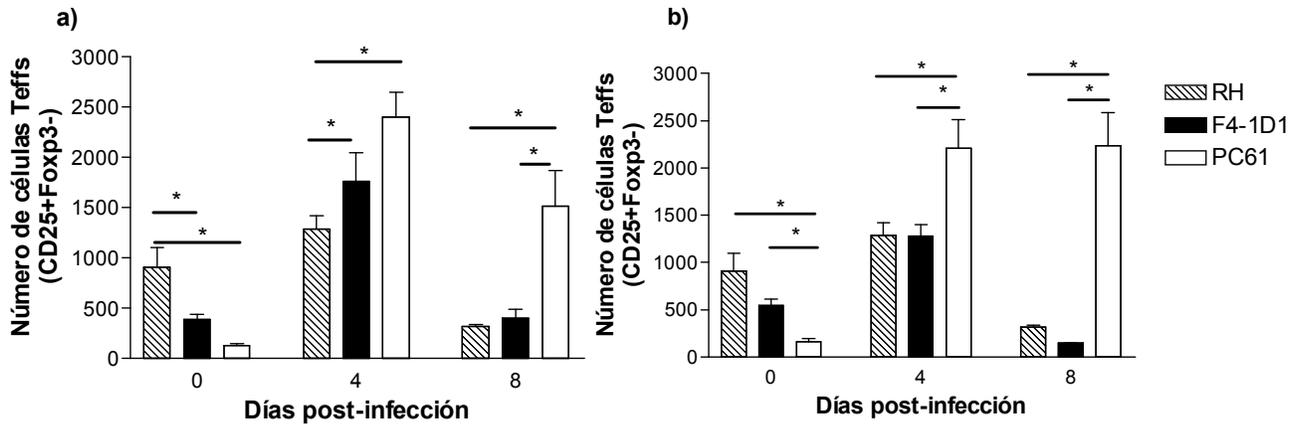


Figura 40. Número de células en la población CD25⁺Foxp3⁻ (Teffs). Las células fueron tomadas de la región CD25⁺Foxp3⁻ de un gating de linfocitos. (a) Células Teffs de ratones inyectados con 50 µg del anticuerpo PC61 o control de isotipo y (b) células Teffs de ratones inyectados con 25 µg de anticuerpo PC61 o F4-1D1. No se excluyeron únicamente las células CD4⁺ como en otros análisis. Datos tomados del pool de sangre de 2 ratones por grupo n=4 ratones. *p<0.05.

VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente proyecto se estudió el papel de las células Tregs durante la infección con *T. gondii* en el modelo murino. La técnica que utilizamos fue la depleción de células CD25⁺ por inyección del anticuerpo PC61.

Desde que se describió que la cadena α del receptor de IL-2 o CD25 es uno de los principales marcadores de superficie expresados en las células Tregs de manera constitutiva [200], se ha utilizado ampliamente el anticuerpo anti-CD25 PC61 (IgG1) o 7D4 (IgM) para depletar estas células y estudiar su función en otros modelos de infección, como en *Plasmodium berghei* [201], *Plasmodium yoelii* [202], *leishmania major* [203], *Schistosoma mansoni* [204], *Litomosoides sigmodontis* [205], *Mycobacterium tuberculosis* [206], *Trypanosoma cruzi* [207] y *Trypanosoma congolense* [208], entre otros.

Lo primero que se realizó fue cultivar el hibridoma PC61 que secreta el anticuerpo anti-CD25 *in vitro* en medio CDM, y lo purificamos por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se utilizó medio CDM sin suero para cultivar los hibridomas descritos porque los hibridomas PC61 y F4-1D1 son híbridos rata/ratón, lo que hace imposible crecerlos *in vivo*. Al ser medio CDM sin suero ni proteínas, se tiene la ventaja que el anticuerpo se puede purificar fácilmente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Los primeros ensayos con el anticuerpo PC61 se hicieron para determinar la dosis necesaria para depletar las Tregs. Se han descrito en la literatura diferentes dosis de anticuerpo para llevar a cabo la depleción. Amante et al., utilizaron una única dosis de 500 μg del anticuerpo PC61, 1 ó 14 días antes de infectar con *P. berghei* ANKA [209]. Méndez et al., inyectaron 1 mg de anticuerpo PC61 12 semanas después de una infección primaria y al momento de una infección secundaria con *L. major* [210]. Quinn et. al., inyectaron 100 μg del anticuerpo PC61 3 días antes de vacunar a ratones con BCG y 42 días antes de infectar con *M. tuberculosis* [211]. Couper et al., utilizaron 2 isotipos de

anticuerpo anti-CD25 inyectando 1 vez 750 μg del anticuerpo PC61 y 250 μg del anticuerpo 7D4 al momento de la infección con *Plasmodium yoelii* [212]. Como podemos observar, son muy variadas las estrategias experimentales utilizadas y es muy probable que al utilizar dosis muy altas de anticuerpo no sólo se depleten células Tregs, sino también Teffs [213]. Con base en todas las dosis anteriores, la estrategia en este trabajo fue depletar con concentraciones bajas de anticuerpo PC61. Al evaluar 100 ó 200 μg de anticuerpo, encontramos que la dosis de 200 μg del anticuerpo PC61 la que mantiene disminuido el porcentaje de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ por más tiempo (hasta 14 días), en comparación con la dosis de 100 μg .

Al depletar las células CD25^+ en nuestro modelo experimental con la cepa Me49 de *T. gondii* observamos disminución en el peso, aumento en la mortalidad y mayor número de quistes en el cerebro de ratones C57BL/6J en comparación con los controles. Lo anterior nos sugiere que las células Tregs están implicadas en la protección contra *T. gondii*. Debido a que la molécula CD25 es expresada por células Teffs entre otras [214], es probable que también se eliminen esas células, lo que hace difícil la interpretación de los resultados. Sumado a esto, también se sabe que no todas las células Tregs expresan el marcador CD25 [215;216]. Para poder disminuir la posibilidad de eliminar otras poblaciones que no sean Tregs, nosotros realizamos 2 estrategias: la primera fue inyectar una dosis baja de anticuerpo y la segunda fue inyectarlo 2 días antes de la infección. De esta manera se buscó aumentar la probabilidad de eliminar un mayor número de células Tregs que de células Teffs.

En 2006 Kohm et al., reportaron que la inyección de 500 μg del anticuerpo anti-CD25 (clona 7D4) elimina la mayoría de células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$, pero el porcentaje de células Foxp3^+ no disminuye [217], lo que demuestra que la inyección con el anticuerpo 7D4 no elimina las células Tregs. Cooper et al., hicieron un estudio más detallado de la población

CD4⁺Foxp3⁺ que se depleta con 750µg del anticuerpo anti-CD25 PC61 o 7D4 y observaron que con el anticuerpo 7D4 se elimina 6.04% de células CD4⁺Foxp3⁺ y con el PC61 31.9% de células CD4⁺Foxp3⁺ [218]. Lo anterior confirma que la depleción con una gran cantidad de anticuerpo (500 ó 750µg) elimina un porcentaje pequeño de células Foxp3⁺ y aunque no se menciona en estos artículos, también se deben eliminar otras poblaciones que expresen el marcador CD25. En nuestro trabajo demostramos que con una dosis de 200 µg del anticuerpo anti-CD25 PC61 por vía intraperitoneal, eliminamos cerca del 54% de células CD4⁺Foxp3⁺, inclusive, inyectando 50 µg del anticuerpo por vía intravenosa, eliminamos cerca del 50% de células Foxp3⁺ en la sangre. Por otra parte hay que hacer notar que la infección por sí misma tiene la capacidad de disminuir el porcentaje de las células CD4⁺Foxp3⁺; esto se demuestra en la Fig. 29b, donde los ratones infectados e inyectados con el control de isotipo al día 12 de la infección, muestran un porcentaje muy bajo de estas células. Lo anterior confirma que es, entre otras cosas, la ausencia de células Tregs lo que induce la mortalidad, el mayor número de quistes y la mayor baja de peso en los ratones depletados con el anticuerpo PC61.

Desde el inicio de nuestro estudio, quisimos conocer si las proporciones no sólo de células Tregs sino también de Teffs se veían disminuidas por la inyección del anticuerpo PC61. Al analizar las poblaciones celulares, notamos la eliminación casi total de las poblaciones CD25⁺ fueran o no Tregs. Sin embargo, observamos que 12 días después de la infección con *T. gondii* las Tregs siguen depletadas y no así de las células Teffs, pues hay recuperación notable de esta población (Fig. 30 y 31d). Esto lo podemos atribuir a que el anticuerpo PC61 elimina aquellas células que expresen altos niveles del CD25; esto es, las células Tregs. El anticuerpo PC61 puede seguir actuando desde el día en que se inyectó hasta 10 días después, cuando la población CD4⁺CD25⁺ se reestablece casi por completo, lo que probablemente evita la recuperación de las células Teffs que se

generan durante la infección y es imposible detectarlas por citometría de flujo del día cero al día 10. Para evitar esto podríamos seguir la estrategia de Amante et al., que consistió en depletar 14 días antes de infectar con *P. berghei* ANKA encontrando protección total. Con este experimento se tiene la ventaja de que el anticuerpo PC61 no está en circulación al momento de la infección y no se depletan células que se estén generando en ese periodo de tiempo (sean Teffs o Tregs). [219]. Esta sería una manera de confirmar que las Tregs participan en la protección de ratones C57BL/6J durante la infección con *T. gondii*.

Al momento de la realización de este trabajo Couper et al. [220], reportaron que la depleción con 1 mg del anticuerpo PC61 aumenta la susceptibilidad en ratones C57BL/6J machos infectados con la cepa Me49 de *T. gondii*. Ellos eliminan alrededor del 40% de células Foxp3⁺, pero reducen de manera significativa el número de células Teffs CD4⁺ que expresan el marcador CD25, lo que implica disminución de la producción de IFN- γ y la patología causada por la respuesta inmune tipo T_H1 tan fuerte que se genera por las células Teffs. Sin embargo, la ausencia de IFN- γ deteriora el control de la enfermedad y eleva la mortalidad durante la fase aguda de la infección. Ellos proponen que se use con precaución el anticuerpo anti-CD25 PC61 en modelos donde se produzca un alto nivel inflamatorio, como *T. gondii*, y que se tome en cuenta todo el repertorio de células T que se eliminan con la inyección del anticuerpo PC61, no sólo las células Tregs.

Aunque sus resultados son muy semejantes a lo que nosotros describimos aquí, esto es, el aumento en la susceptibilidad durante la infección con *T. gondii*, sabemos que dosis muy altas de anticuerpo (1 mg) puede dificultar la interpretación de los resultados descritos y llevar a conclusiones erróneas como el aminorar la participación de las células Tregs durante la infección con *T. gondii*. Es muy claro que si inyectamos 1 mg de anticuerpo 2 días antes de la infección, todas aquellas células CD25⁺, sean Tregs o Teffs que se estén generando por la infección, van a ser eliminadas hasta que el anticuerpo se

elimine de la circulación sanguínea del ratón. Por esta razón, nosotros evaluamos una dosis baja de anticuerpo PC61 (200 µg) que pudiera eliminar en su mayoría las células Tregs. Al hacer el análisis de las poblaciones eliminadas por el anticuerpo PC61, observamos que hasta el día 12 permanece la depleción de Tregs y aumenta el porcentaje de células Teffs y es en este momento cuando comienza la mortalidad en los ratones. Esto nos sugiere que hay participación protectora de las células Tregs durante la infección con *T. gondii*.

Una alternativa para confirmar que existe participación de células Tregs durante la infección con *T. gondii*, es por transferencia adoptiva de células Tregs Foxp3^{EGFP+} a ratones infectados con *T. gondii*. Estas células Foxp3^{EGFP+} provienen de un ratón transgénico que expresa la proteína verde fluorescente junto con promotor Foxp3, por lo que todas aquellas células que expresen la EGFP, son Tregs y son funcionales. Esta estrategia tiene muchas ventajas ya que, se trabajaría únicamente con células Foxp3, que es el mejor marcador de las Tregs y ya no depletando con anticuerpo anti-CD25 PC61.

Con base en nuestro estudio con la cepa Me49 donde demostramos que las células Tregs participan en la protección de los animales, quisimos conocer cuál es el papel de las células Tregs durante la infección con una cepa tipo I, que es altamente virulenta. Los primeros resultados encontrados nos sugirieron que las Tregs participan de una manera adversa porque encontramos retraso en la mortalidad y pérdida de peso en los ratones depletados, comparados con los controles.

Mientras esta tesis se llevaba a cabo, Wei y Tabel publicaron que al depletar a ratones de células Tregs con una dosis muy baja de anticuerpo PC61, durante una infección letal con *Trypanosoma congolense* en la cepa de ratón susceptible BALB/c, se prevenía la parasitemia y la mortalidad; además de que su depleción era capaz de eliminar las células CD25^{high} de su sistema, consideradas Tregs por ellos. La dosis reportada es una sola inyección de 45 µg del anticuerpo PC61 por vía intravenosa [221]. Debido a la semejanza

en la letalidad entre la cepa RH y el modelo con *T. congolense*, quisimos conocer si ocurría algo semejante a lo publicado por ellos inyectando dosis muy bajas de anticuerpo. Al depletar con 25 ó 50 μg por vía intravenosa encontramos que la inyección aún con una dosis muy baja, elimina por completo tanto las células Tregs como Teffs, aunque los ratones inyectados con 25 μg recuperan más rápido ambas poblaciones que los depletados con 50 μg . En este experimento encontramos ligero retraso en la mortalidad en los ratones depletados en comparación con los controles y esto es dependiente de la dosis de anticuerpo utilizada. En nuestros experimentos también evaluamos una dosis de 100 μg por vía intravenosa y no encontramos protección ni modificación en las proporciones de células Tregs (datos no mostrados). Lo anterior confirma la protección únicamente con dosis bajas de anticuerpo PC61 por vía intravenosa.

Al hacer el análisis de la población total de linfocitos (como se explica en la Fig. 40) notamos un incremento muy grande en la población $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^-$ (células activadas). En nuestros análisis por FACS, siempre excluimos la población CD4^- . Notablemente existen otras poblaciones celulares que no son CD4^+ y que se activan durante la infección con la cepa RH de *T. gondii*. Se ha demostrado que los linfocitos T CD4^+ juegan un papel protector durante la infección con *T. gondii* produciendo altos niveles de IFN- γ e IL-2 pero, aunque los linfocitos T CD8^+ producen niveles intermedios de IFN- γ e IL-2 indetectable, es este IFN- γ el que genera protección durante la infección con *T. gondii*, haciendo de los linfocitos T CD8^+ los principales generadores de inmunidad *in vivo* durante esta infección [222]. Existe un papel sinérgico entre las células CD4^+ y CD8^+ , ya que la expansión, la acción efectora y protectora de células TCD8^+ es dependiente de las células TCD4^+ . En ausencia de las células CD4^+ se puede montar una respuesta efectora de células CD8^+ , pero no se mantiene por un periodo largo de tiempo [223].

También se ha demostrado que las células Tregs suprimen la activación, proliferación, diferenciación y función efectora de las células T CD8⁺ [224] y esto es mediado por la IL-2 [225].

No sólo existen estas dos poblaciones de células que expresan el TCR α/β , también existen otras poblaciones como los linfocitos T NK, que expresan el marcador único de las células NK: NK 1.1+ o CD161c. Las células TNK producen altos niveles de IL-4, IFN- γ y TNF [226]. Se ha demostrado también que en ausencia de linfocitos CD4⁺ durante la infección con *T.gondii*, hay expansión de células NK mediada por IL-12 que favorece la activación de linfocitos T CD8⁺ y por lo tanto se genera protección [227]; entonces las células NK juegan un papel importante durante la infección con *T. gondii*. También se ha demostrado que las células Tregs suprimen la proliferación de células NK por medio de TGF- β [228;229]

También existen linfocitos T $\gamma\delta$; constituyen del 2 al 5% del total de las células T [230]. Sin embargo se ha demostrado que estas células se expanden en algunas infecciones bacterianas (como *M. tuberculosis*) contribuyendo a la respuesta inmune contra ésta bacteria por su alta producción de IFN- γ [231]. Recientemente se reportó en la literatura que durante la infección con *M. tuberculosis* en humanos existe expansión de células T $\gamma\delta$ que producen IFN- γ independiente de presentación antigénica y de células T CD4⁺ y que, al depletar de células TCD4⁺, se hace notoria la expansión de la población $\gamma\delta$. Aún es más notoria la producción de IFN- γ por la población $\gamma\delta$ al depletar las células CD4⁺CD25⁺ (definidas por los autores como Tregs) y no por la población CD4⁺CD25⁻ (Teffs) [232]. Este reporte es de gran importancia porque se demuestra que las Tregs tienen la capacidad de suprimir y regular la expansión y producción de IFN- γ por otras poblaciones de linfocitos que no son CD4⁺.

Las células Tregs podrían suprimir a estas poblaciones celulares de linfocitos (T CD8⁺, T NK y/o T $\gamma\delta$) durante la infección con la cepa RH de *T. gondii* lo que puede provocar en parte, la alta virulencia de esta cepa. Cuando depletamos a nuestro ratones con dosis muy bajas de anticuerpo anti-CD25, claramente notamos la expansión de linfocitos CD4⁻ cuyo fenotipo no ha sido identificado hasta el momento. Estas poblaciones podrían estar implicadas en la protección de los ratones, ya que se favorece la sobrevivencia por más tiempo que en los controles. Pudiera ser necesario que al inicio de la infección se requiera de una respuesta T_H1 exacerbada, mediada por células T CD4⁺, T CD8⁺, T NK y T $\gamma\delta$ que favorezca la eliminación del parásito y que después aparezcan las células Tregs para controlar la respuesta inflamatoria y así evitar daño a lo propio.

Es notable la participación de las células Tregs durante la infección con *T. gondii* en los dos modelos de infección estudiados aquí. Sin embargo, por las diferencias en la virulencia entre cepas, podemos encontrar papeles opuestos entre una y otra cepa. Con la cepa Me49 las células Tregs participan sin lugar a duda en la protección de los animales, mientras que durante la infección con la cepa RH parece que las Tregs participan de manera adversa contra el parásito, evitando desde el principio que haya una respuesta T_H1 que pueda eliminar al parásito.

El trabajo generado por el presente proyecto nos permite saber, que las células Tregs participan en la protección de los ratones durante la infección con la cepa Me49 de *T. gondii*, pero aún desconocemos los mecanismos por los cuales lo hacen. En la literatura se han propuesto algunos mecanismos de supresión de las Tregs sobre células Teffs por contacto (Fig. 10a, 10b y 10c) [233]. Uno de los mecanismos es dependiente de contacto directo: la célula Treg suprime la producción de IL-2 de la célula T efectora evitando que proliferen; este mecanismo no es mediado por citocinas y requiere la activación de la célula Treg por su TCR [234]. Otro mecanismo es por contacto indirecto, mediado por la célula presentadora de antígeno. En este caso, se requieren de 2 moléculas para suprimir; una

en la célula Treg y otra en la célula presentadora de antígeno. Se ha demostrado que las células Tregs expresan constitutivamente CTLA-4 que es un ligando natural de B7 en la APC y que, al unirse estas dos moléculas se desarrolla una señal capaz de suprimir células Teffs [119;235]. Otro mecanismo es donde la célula Treg condiciona primero a la APC y la vuelve supresora; por lo tanto ya no es necesaria la célula Treg, sino que por sí misma la APC suprime a la célula T efectora [236].

También existen mecanismos dependientes de citocinas e independientes del contacto directo entre la célula Treg y/o APC con la célula T efectora [119]. Estas citocinas son la IL-10 y el TGF- β . La IL-10 ha sido ampliamente documentada en la infección con *T. gondii* y si bien es cierto que la respuesta protectora contra el parásito es la T_H1, se sabe que la IL-10 es requerida como moduladora de una respuesta T_H1 exacerbada, pues ratones IL-10 knock-out mueren 2 semanas después de la infección con la cepa Me49 de *T. gondii* [237]. Se ha demostrado el papel de la IL-10 proveniente de las células Tregs, previniendo la proliferación de células Teffs CD4⁺ en distintos modelos de colitis [238;239] y en la tolerancia a transplantes de piel alogénicos [240], pero durante la infección con *T. gondii*, se ha demostrado que las células T_H1 Foxp3⁻ productoras de IFN- γ son, de manera sorprendente, las principales productoras de IL-10 y no las Tregs [241].

Con respecto al TGF- β , se han diferenciado *in vitro* células T con capacidad reguladora en presencia de anticuerpo anti-CD3, anti-CD28 y TGF- β . Estas células tienen el fenotipo de células Tregs (CD25⁺, GITR⁺, CTLA-4⁺ y Foxp3⁺) [242]. Por otra parte, se ha demostrado la participación del TGF- β en la supresión de células Teffs en modelos de colitis [243]. Probablemente esta citocina pudiera participar de alguna manera durante la infección con *T. gondii*.

Si clasificáramos a las Tregs con respecto a su participación en algunos modelos de infección, encontraríamos 2 grupos. El primero es donde las células Tregs se ven

implicadas en la patología [244] porque al eliminarlas del sistema, se favorece la supervivencia del hospedero y se elimina por completo el parásito [245-247]. Esto es, las células Tregs en estos modelos favorecen la supervivencia del parásito suprimiendo la respuesta efectora y permiten en algunos casos, el desarrollo de la infección crónica o la muerte del hospedero, como con *Plasmodium berghei* NK65 [248], *Litomosoides sigmodontis* [249], *Plasmodium yoelii* [250] y *Trypanosoma congolense* [121]. En el otro grupo encontraríamos que las células Tregs no participan ni en la protección ni en la patología, como el caso de *Trypanosoma cruzi* [153] o *Mycobacterium tuberculosis* [131;132].

Al comparar en general la participación de las células Tregs en *T. gondii* con otros modelos de infección, podemos decir que de manera completamente diferente a lo descrito anteriormente, durante la infección con la cepa Me49 de *T.gondii*, las células Tregs participan en la protección de ratones, mientras que en la cepa RH parecen participar de manera adversa beneficiando la patología y disminuyendo la respuesta efectora contra el parásito, lo que se refleja en la mortalidad tan rápida causada por la infección.

VIII. APÉNDICE

1. Soluciones Utilizadas

1.1. Generales

- **Dulbecco's PBS (DPBS)**

NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM y KH₂PO₄ 1.2 mM

- **Solución de lisis de eritrocitos**

NH₄Cl 39 mM, KHCO₃ 2.5 mM y EDTA.2Na 0.02 mM

- **Heparina**

Se utilizan 10,000U en 10 ml de agua mQ (SIGMA-ALDRICH®).

1.2. En cultivos celulares

- **Tripsina-EDTA**

0.05% de tripsina, 0.53 mM de EDTA

- **Medios de cultivo**

- **CDM**

El medio CDM (CD Hybridoma medium) se adquiere ya preparado de Gibco™. Se suplementa con L-glutamina 8 mM al momento de usar.

- **DMEM**

El medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco™) se prepara de acuerdo a las instrucciones del distribuidor, disolviendo en agua mQ, ajustando tanto la concentración de NaHCO₃ a 3.7g/l, como el pH con NaCl. Se esteriliza en doble filtro Millipore® de 0.22 µm bajo presión positiva de N₂ y se guarda en alícuotas de 500 ml a 4°C en oscuridad. Se

conserva por dos meses aproximadamente. Al momento de utilizarlo se suplementa de acuerdo a la siguiente tabla.

Suplementos	medio completo, 10%	Volumen para preparar 100 ml	Medio 1%	Volumen para preparar 100 ml	Marca
Suero fetal bovino (FCS)	10% v/v	10 ml	1% v/v	1 ml	Gibco™
L-glutamina	2 mM	1 ml	2 mM	1 ml	Gibco™
Aminoácidos no esenciales (MEM NEAA)	0.1 mM	1 ml	0.1 mM	1 ml	Gibco™
Piruvato de sodio	1 mM	1 ml	1 mM.	1 ml	Sigma™
Medio DMEM		87 ml		96 ml	Gibco™

▪ **Medio de congelación**

80% de medio DMEM completo, 10% de FCS (Gibco™) y 10% de Dimetil-sulfóxido (DMSO, SIGMA™).

1.3. En precipitación

• **Sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄**

Se utiliza al 45% (m/v)

• **PBS pH 7.8**

NaH₂PO₄ 0.02 M y NaCl 0.15 M. pH 7.8

1.4. En electroforesis

- **Acrilamida**

100 ml se preparan con 30% de acrilamida (m/v), 0.89% de bis-acrilamida (m/v).

Se filtra por membrana de 0.22 μm (Millipore®) y se guarda a 4°C en oscuridad

- **PBS 1 M pH 6.8**

12.1 g de TRIZMA Base disueltos en 80 ml de agua mQ. El pH se ajusta a 6.8 con HCl 6 N, se afora a 100 ml con agua mQ y se filtra por membrana de 0.22 μm (Millipore®), se autoclavea y se guarda a 4°C.

- **PBS 1 M pH 8.8**

36.33 g de TRIZMA Base y se disueltos en 160 ml de agua mQ. El pH se ajusta a 8.8 con HCl 6 M, se afora a 200 ml con agua mQ y se filtra por membrana de 0.22 μm (Millipore®), se autoclavea y se guarda a 4°C.

- **SDS al 10% (m/v)**

10 g de SDS disueltos agua mQ autoclaveada. Se afora a 100 ml; se filtra por membrana de 0.22 μm (Millipore®), se esteriliza en autoclave y se guarda a 4°C.

- **Buffer de muestra (β -mercaptoetanol)**

Para preparar 25 ml de este buffer 2X, se utilizan 1.25 g de SDS, 3.125 ml de Tris 1 M pH 6.8, 2.5 ml de β -mercaptoetanol, 2.5 mg de azul de bromurofenol, 5 ml de glicerol y se afora a 25 de agua mQ. La manipulación de este buffer se hace en una campana de flujo laminar teniendo precaución con el azul de bromurofenol (la tinción es muy fuerte). Se guarda en alícuotas de 900 μl a -20°C.

- **TEMED**

N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (BIO-RAD™)

- **Persulfato de amonio**

Persulfato de amonio al 10% (m/v, (BIO-RAD™).

- **Isobutanol saturado**

A aproximadamente 10 ml de isobutanol se le agrega agua mQ hasta saturar. El isobutanol queda en la capa superior.

- **Buffer de electrodos**

Para preparar 5 L de este buffer, se agregan 15 g de TRIZMA Base, 72 g de glicina y 5 g de SDS. Se almacena a 4°C.

- **Composición del gel de corrida (al 10%)**

10 ml de acrilamida-bisacrilamida, 12 ml de agua, 7.5 ml de Tris 1 M pH 8.8 y 0.3 ml de SDS al 10%.

- **Composición del gel concentrador**

1.7ml de acrilamida-bisacrilamida, 9.1 ml de agua, 1.6 ml de Tris 1 M pH 6.8 y 0.125 ml de SDS al 10%.

- **Marcadores de peso molecular (MPM)**

Mark12™ Unstained Standard (Invitrogen™) 1X. Se utilizan 15 µl por electroforesis según el proveedor.

- **Solución de enjuague**

Ácido acético al 7% (v/v).

- **Solución de lavado**

Ácido acético al 5% (v/v) y metanol al 10%(v/v).

- **Azul de Coomassie**

Azul de Coomassie R250 al 1% (m/v).

1.5. En inmunofluorescencia

1.5.1. Anticuerpos utilizados

Los anticuerpos utilizados en nuestro estudio se describen en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Fluorocromo	Proveedor	Clona isotipo	µl x muestra
αCD3	FITC	BD	145-2C11 IgG1 hámster	0.2 µl x muestra
	Cy5	Caltag	500A2 IgG1 hámster	0.1 µl x muestra
	PE	Caltag	CT-CD3 IgG2a rata	0.25 µl x muestra
αCD4	FITC	Caltag	RM4-5 IgG2a rata	0.1 µl x muestra
	PE	Caltag	RM4-5 IgG2a rata	0.1 µl x muestra
	TC	Caltag	RM4-5 IgG2a rata	0.25 µl x muestra
		Invitrogen	RM4-5 IgG2a rata	0.25 µl x muestra
αCD25	FITC	RSD	PC61 IgG1 rata	9 µl x muestra
	PE	Caltag	PC61 5.3 IgG1 rata	2.5 µl x muestra
	PE	Miltenyi	7D4 IgM Kappa rata	1 µl x muestra
	APC	Caltag	PC61 5.3 IgG1 rata	0.5 µl x muestra
αFoxp3	AlexaFluor-488	BioLegend	150D IgG1 rata	0.5 µl x muestra
	AlexaFluor-488	eBioscience	FjK-16s IgG2a rata	0.5 µl x muestra
	PE	eBioscience	FjK-16s IgG2a rata	1 µl x muestra

- **Solución de lavado**

DPBS con 1% (v/v) de FCS y 0.1% (v/v) de NaN₃

1.5.2. Foxp3

- **KIT Foxp3 (Anti-mouse/rat Foxp3 staining set, eBioscience™)**

- **Solución de fijación**

Por cada ml de buffer concentrador agregar 3 ml de buffer diluyente

- **Solución de permeabilización**

El buffer de permeabilización está a una concentración 10X, se requiere a 1X por muestra; se diluye con agua mQ.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. **Montoya, J.G. and Liesenfeld, O.**, Toxoplasmosis. *Lancet* 2004. **363**: 1965-1976.
2. **Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A.**, Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998. **11**: 267-299.
3. **Frenkel, J.K.**, Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today* 1988. **4**: 273-278.
4. **Jones, T.C. and Hirsch, J.G.**, The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* 1972. **136**: 1173-1194.
5. **Kohler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D., and Roos, D.S.**, A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 1997. **275**: 1485-1489.
6. **Darde, M.L., Bouteille, B., and Pestre-Alexandre, M.**, Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 1992. **78**: 786-794.
7. **Sibley, L.D. and Boothroyd, J.C.**, Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 1992. **359**: 82-85.
8. **Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J.P., Darde, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., and Sibley, L.D.**, Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2007. **104**: 14872-14877.
9. **Darde, M.L.**, Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanita* 2004. **40**: 57-63.
10. **Mondragon, R., Howe, D.K., Dubey, J.P., and Sibley, L.D.**, Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J. Parasitol.* 1998. **84**: 639-641.
11. **Howe, D.K., Honore, S., Derouin, F., and Sibley, L.D.**, Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997. **35**: 1411-1414.

12. **Ajzenberg,D., Cogne,N., Paris,L., Bessieres,M.H., Thulliez,P., Filisetti,D., Pelloux,H., Marty,P., and Darde,M.L.,** Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J.Infect.Dis.* 2002. **186**: 684-689.

13. **Liesenfeld,O.,** Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J.Infect.Dis.* 2002. **185 Suppl 1**: S96-101.

14. **Radke,J.R., Striepen,B., Guerini,M.N., Jerome,M.E., Roos,D.S., and White,M.W.,** Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 2001. **115**: 165-175.

15. **Howe,D.K., Summers,B.C., and Sibley,L.D.,** Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect.Immun.* 1996. **64**: 5193-5198.

16. **Sukthana,Y.,** Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends Parasitol.* 2006. **22**: 137-142.

17. **Velasco-Castrejon,O., Salvatierra-Izaba,B., Valdespino,J.L., Sedano-Lara,A.M., Galindo-Virgen,S., Magos,C., Llausas,A., Tapia-Conyer,R., Gutierrez,G., and Sepulveda,J.,** [Seroepidemiology of toxoplasmosis in Mexico]. *Salud Publica Mex.* 1992. **34**: 222-229.

18. **Siegel,S.E., Lunde,M.N., Gelderman,A.H., Halterman,R.H., Brown,J.A., Levine,A.S., and Graw,R.G., Jr.,** Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood* 1971. **37**: 388-394.

19. **Aliberti,J., Reis e Sousa, Schito,M., Hieny,S., Wells,T., Huffnagle,G.B., and Sher,A.,** CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat.Immunol.* 2000. **1**: 83-87.

20. **Aliberti,J., Valenzuela,J.G., Carruthers,V.B., Hieny,S., Andersen,J., Charest,H., Reis e Sousa, Fairlamb,A., Ribeiro,J.M., and Sher,A.,** Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat.Immunol.* 2003. **4**: 485-490.

21. **Scanga,C.A., Aliberti,J., Jankovic,D., Tilloy,F., Bennouna,S., Denkers,E.Y., Medzhitov,R., and Sher,A.,** Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J.Immunol.* 2002. **168**: 5997-6001.

22. **Yarovinsky,F. and Sher,A.**, Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 2006. **36**: 255-259.
23. **Gazzinelli,R.T., Hakim,F.T., Hieny,S., Shearer,G.M., and Sher,A.**, Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J.Immunol.* 1991. **146**: 286-292.
24. **Gazzinelli,R.T., Hieny,S., Wynn,T.A., Wolf,S., and Sher,A.**, Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993. **90**: 6115-6119.
25. **Black,C.M., Catterall,J.R., and Remington,J.S.**, In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J.Immunol.* 1987. **138**: 491-495.
26. **Murray,H.W., Rubin,B.Y., Carriero,S.M., Harris,A.M., and Jaffee,E.A.**, Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J.Immunol.* 1985. **134**: 1982-1988.
27. **Suzuki,Y., Orellana,M.A., Schreiber,R.D., and Remington,J.S.**, Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988. **240**: 516-518.
28. **Sibley,L.D., Adams,L.B., Fukutomi,Y., and Krahenbuhl,J.L.**, Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. *J.Immunol.* 1991. **147**: 2340-2345.
29. **Adams,L.B., Hibbs,J.B., Jr., Taintor,R.R., and Krahenbuhl,J.L.**, Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J.Immunol.* 1990. **144**: 2725-2729.
30. **Liesenfeld,O., Kosek,J., Remington,J.S., and Suzuki,Y.**, Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J.Exp.Med.* 1996. **184**: 597-607.
31. **Aliberti,J.**, Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat.Rev.Immunol.* 2005. **5**: 162-170.

32. **Suzuki,Y., Sher,A., Yap,G., Park,D., Neyer,L.E., Liesenfeld,O., Fort,M., Kang,H., and Gufwoli,E.,** IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J.Immunol.* 2000. **164**: 5375-5382.

33. **Gazzinelli,R.T., Wysocka,M., Hieny,S., Scharton-Kersten,T., Cheever,A., Kuhn,R., Muller,W., Trinchieri,G., and Sher,A.,** In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J.Immunol.* 1996. **157**: 798-805.

34. **Buzoni-Gatel,D., Debbabi,H., Mennechet,F.J., Martin,V., Lepage,A.C., Schwartzman,J.D., and Kasper,L.H.,** Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 2001. **120**: 914-924.

35. **Jankovic,D., Kullberg,M.C., Feng,C.G., Goldszmid,R.S., Collazo,C.M., Wilson,M., Wynn,T.A., Kamanaka,M., Flavell,R.A., and Sher,A.,** Conventional Tbet(+)*Foxp3*(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J.Exp.Med.* 2007. **204**: 273-283.

36. **Sibley,L.D., Weidner,E., and Krahenbuhl,J.L.,** Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 1985. **315**: 416-419.

37. **Kang,H., Remington,J.S., and Suzuki,Y.,** Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *J.Immunol.* 2000. **164**: 2629-2634.

38. **Mosier,D.E.,** A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science* 1967. **158**: 1573-1575.

39. **Germain,R.N.,** Special regulatory T-cell review: A rose by any other name: from suppressor T cells to Tregs, approbation to unbridled enthusiasm. *Immunology* 2008. **123**: 20-27.

40. **Corthay,A.,** How do regulatory T cells work? *Scand.J.Immunol.* 2009. **70**: 326-336.

41. **Nishizuka,Y.,** A novel experimental system of organ-localized autoimmune diseases in the mouse. *Acta Pathol.Jpn.* 1982. **32 Suppl 1**: 211-222.

42. **Sakaguchi,S., Fukuma,K., Kuribayashi,K., and Masuda,T.,** Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J.Exp.Med.* 1985. **161**: 72-87.
43. **Miyara,M. and Sakaguchi,S.,** Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol.Med.* 2007. **13**: 108-116.
44. **Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M.,** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 1995. **155**: 1151-1164.
45. **Fontenot,J.D., Gavin,M.A., and Rudensky,A.Y.,** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 2003. **4**: 330-336.
46. **Hori,S., Nomura,T., and Sakaguchi,S.,** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003. **299**: 1057-1061.
47. **Brunkow,M.E., Jeffery,E.W., Hjerrild,K.A., Paeper,B., Clark,L.B., Yasayko,S.A., Wilkinson,J.E., Galas,D., Ziegler,S.F., and Ramsdell,F.,** Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat.Genet.* 2001. **27**: 68-73.
48. **Nishimura,E., Sakihama,T., Setoguchi,R., Tanaka,K., and Sakaguchi,S.,** Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int.Immunol.* 2004. **16**: 1189-1201.
49. **Wildin,R.S., Ramsdell,F., Peake,J., Faravelli,F., Casanova,J.L., Buist,N., Levy-Lahad,E., Mazzella,M., Goulet,O., Perroni,L., Bricarelli,F.D., Byrne,G., McEuen,M., Proll,S., Appleby,M., and Brunkow,M.E.,** X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat.Genet.* 2001. **27**: 18-20.
50. **Ziegler,S.F.,** FOXP3: of mice and men. *Annu.Rev.Immunol.* 2006. **24**: 209-226.
51. **Baecher-Allan,C. and Anderson,D.E.,** Regulatory cells and human cancer. *Semin.Cancer Biol.* 2006. **16**: 98-105.

52. **Chatila,T.A.**, Role of regulatory T cells in human diseases. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2005. **116**: 949-959.
53. **Mills,K.H.**, Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat.Rev.Immunol.* 2004. **4**: 841-855.
54. **Battaglia,M. and Roncarolo,M.G.**, Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells. *Inflamm.Allergy Drug Targets.* 2006. **5**: 157-165.
55. **Zenclussen,A.C.**, Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin.Immunopathol.* 2006. **28**: 31-39.
56. **Barrat,F.J., Cua,D.J., Boonstra,A., Richards,D.F., Crain,C., Savelkoul,H.F., Waal-Malefyt,R., Coffman,R.L., Hawrylowicz,C.M., and O'Garra,A.**, In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J.Exp.Med.* 2002. **195**: 603-616.
57. **Kemper,C., Chan,A.C., Green,J.M., Brett,K.A., Murphy,K.M., and Atkinson,J.P.**, Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003. **421**: 388-392.
58. **Weiner,H.L.**, Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes.Infect.* 2001. **3**: 947-954.
59. **Adorini,L., Giarratana,N., and Penna,G.**, Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin.Immunol.* 2004. **16**: 127-134.
60. **Battaglia,M., Stabilini,A., and Roncarolo,M.G.**, Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005. **105**: 4743-4748.
61. **Apostolou,I. and von Boehmer,H.**, In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J.Exp.Med.* 2004. **199**: 1401-1408.
62. **Kretschmer,K., Apostolou,I., Hawiger,D., Khazaie,K., Nussenzweig,M.C., and von Boehmer,H.**, Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat.Immunol.* 2005. **6**: 1219-1227.

63. **Levings,M.K., Gregori,S., Tresoldi,E., Cazzaniga,S., Bonini,C., and Roncarolo,M.G.**, Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 2005. **105**: 1162-1169.
64. **Jonuleit,H., Schmitt,E., Schuler,G., Knop,J., and Enk,A.H.**, Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 2000. **192**: 1213-1222.
65. **Yamazaki,S., Iyoda,T., Tarbell,K., Olson,K., Velinzon,K., Inaba,K., and Steinman,R.M.**, Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J.Exp.Med.* 2003. **198**: 235-247.
66. **Mahnke,K., Schmitt,E., Bonifaz,L., Enk,A.H., and Jonuleit,H.**, Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol.Cell Biol.* 2002. **80**: 477-483.
67. **Jonuleit,H., Schmitt,E., Steinbrink,K., and Enk,A.H.**, Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2001. **22**: 394-400.
68. **Becker,C., Stoll,S., Bopp,T., Schmitt,E., and Jonuleit,H.**, Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med.Microbiol.Immunol.* 2006. **195**: 113-124.
69. **McNeill,A., Spittle,E., and Backstrom,B.T.**, Partial depletion of CD69^{low}-expressing natural regulatory T cells with the anti-CD25 monoclonal antibody PC61. *Scand.J.Immunol.* 2007. **65**: 63-69.
70. **Read,S., Malmstrom,V., and Powrie,F.**, Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 2000. **192**: 295-302.
71. **Takahashi,T., Tagami,T., Yamazaki,S., Uede,T., Shimizu,J., Sakaguchi,N., Mak,T.W., and Sakaguchi,S.**, Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J.Exp.Med.* 2000. **192**: 303-310.
72. **McHugh,R.S., Whitters,M.J., Piccirillo,C.A., Young,D.A., Shevach,E.M., Collins,M., and Byrne,M.C.**, CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002. **16**: 311-323.

73. **Huang,C.T., Workman,C.J., Flies,D., Pan,X., Marson,A.L., Zhou,G., Hipkiss,E.L., Ravi,S., Kowalski,J., Levitsky,H.I., Powell,J.D., Pardoll,D.M., Drake,C.G., and Vignali,D.A.,** Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004. **21**: 503-513.

74. **Liu,W., Putnam,A.L., Xu-Yu,Z., Szot,G.L., Lee,M.R., Zhu,S., Gottlieb,P.A., Kapranov,P., Gingeras,T.R., Fazekas de St,G.B., Clayberger,C., Soper,D.M., Ziegler,S.F., and Bluestone,J.A.,** CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J.Exp.Med.* 2006. **203**: 1701-1711.

75. **Seddiki,N., Santner-Nanan,B., Martinson,J., Zaunders,J., Sasson,S., Landay,A., Solomon,M., Selby,W., Alexander,S.I., Nanan,R., Kelleher,A., and Fazekas de St,G.B.,** Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J.Exp.Med.* 2006. **203**: 1693-1700.

76. **Walunas,T.L., Lenschow,D.J., Bakker,C.Y., Linsley,P.S., Freeman,G.J., Green,J.M., Thompson,C.B., and Bluestone,J.A.,** CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994. **1**: 405-413.

77. **Wing,K., Onishi,Y., Prieto-Martin,P., Yamaguchi,T., Miyara,M., Fehervari,Z., Nomura,T., and Sakaguchi,S.,** CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008. **322**: 271-275.

78. **Nocentini,G., Giunchi,L., Ronchetti,S., Krausz,L.T., Bartoli,A., Moraca,R., Migliorati,G., and Riccardi,C.,** A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997. **94**: 6216-6221.

79. **Triebel,F., Jitsukawa,S., Baixeras,E., Roman-Roman,S., Genevee,C., Viegas-Pequignot,E., and Hercend,T.,** LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J.Exp.Med.* 1990. **171**: 1393-1405.

80. **Fernandez,I., Zeiser,R., Karsunky,H., Kambham,N., Beilhack,A., Soderstrom,K., Negrin,R.S., and Engleman,E.,** CD101 surface expression discriminates potency among murine FoxP3+ regulatory T cells. *J.Immunol.* 2007. **179**: 2808-2814.

81. **Yamaguchi,T., Hirota,K., Nagahama,K., Ohkawa,K., Takahashi,T., Nomura,T., and Sakaguchi,S.,** Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity*. 2007. **27**: 145-159.

82. **Aerts,N.E., Dombrecht,E.J., Ebo,D.G., Bridts,C.H., Stevens,W.J., and De Clerck,L.S.,** Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008. **251**: 109-115.
83. **Fontenot,J.D., Rasmussen,J.P., Williams,L.M., Dooley,J.L., Farr,A.G., and Rudensky,A.Y.,** Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005. **22**: 329-341.
84. **Fontenot,J.D., Dooley,J.L., Farr,A.G., and Rudensky,A.Y.,** Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J.Exp.Med.* 2005. **202**: 901-906.
85. **Sakaguchi,S.,** Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 2004. **22**: 531-562.
86. **Betelli,E., Dastrange,M., and Oukka,M.,** Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005. **102**: 5138-5143.
87. **Tivol,E.A., Borriello,F., Schweitzer,A.N., Lynch,W.P., Bluestone,J.A., and Sharpe,A.H.,** Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995. **3**: 541-547.
88. **Waterhouse,P., Penninger,J.M., Timms,E., Wakeham,A., Shahinian,A., Lee,K.P., Thompson,C.B., Griesser,H., and Mak,T.W.,** Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* 1995. **270**: 985-988.
89. **Shull,M.M., Ormsby,I., Kier,A.B., Pawlowski,S., Diebold,R.J., Yin,M., Allen,R., Sidman,C., Proetzel,G., Calvin,D., and .,** Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992. **359**: 693-699.
90. **Wan,Y.Y. and Flavell,R.A.,** Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005. **102**: 5126-5131.
91. **Piccirillo,C.A. and Shevach,E.M.,** Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J.Immunol.* 2001. **167**: 1137-1140.

92. **Thornton,A.M. and Shevach,E.M.**, CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J.Exp.Med.* 1998. **188**: 287-296.
93. **Shevach,E.M., McHugh,R.S., Piccirillo,C.A., and Thornton,A.M.**, Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol.Rev.* 2001. **182**: 58-67.
94. **Lim,H.W., Hillsamer,P., Banham,A.H., and Kim,C.H.**, Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.* 2005. **175**: 4180-4183.
95. **Ghiringhelli,F., Menard,C., Terme,M., Flament,C., Taieb,J., Chaput,N., Puig,P.E., Novault,S., Escudier,B., Vivier,E., Lecesne,A., Robert,C., Blay,J.Y., Bernard,J., Caillat-Zucman,S., Freitas,A., Tursz,T., Wagner-Ballon,O., Capron,C., Vainchencker,W., Martin,F., and Zitvogel,L.**, CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J.Exp.Med.* 2005. **202**: 1075-1085.
96. **Misra,N., Bayry,J., Lacroix-Desmazes,S., Kazatchkine,M.D., and Kaveri,S.V.**, Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J.Immunol.* 2004. **172**: 4676-4680.
97. **Thornton,A.M. and Shevach,E.M.**, Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J.Immunol.* 2000. **164**: 183-190.
98. **Mellor,A.L. and Munn,D.H.**, IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat.Rev.Immunol.* 2004. **4**: 762-774.
99. **Fallarino,F., Grohmann,U., You,S., McGrath,B.C., Cavener,D.R., Vacca,C., Orabona,C., Bianchi,R., Belladonna,M.L., Volpi,C., Santamaria,P., Fioretti,M.C., and Puccetti,P.**, The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J.Immunol.* 2006. **176**: 6752-6761.
100. **Tang,Q., Boden,E.K., Henriksen,K.J., Bour-Jordan,H., Bi,M., and Bluestone,J.A.**, Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur.J.Immunol.* 2004. **34**: 2996-3005.
101. **Kingsley,C.I., Karim,M., Bushell,A.R., and Wood,K.J.**, CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J.Immunol.* 2002. **168**: 1080-1086.

102. **Nakamura,K., Kitani,A., Fuss,I., Pedersen,A., Harada,N., Nawata,H., and Strober,W.,** TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J.Immunol.* 2004. **172:** 834-842.
103. **Piccirillo,C.A., Letterio,J.J., Thornton,A.M., McHugh,R.S., Mamura,M., Mizuhara,H., and Shevach,E.M.,** CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J.Exp.Med.* 2002. **196:** 237-246.
104. **Huber,S., Schramm,C., Lehr,H.A., Mann,A., Schmitt,S., Becker,C., Protschka,M., Galle,P.R., Neurath,M.F., and Blessing,M.,** Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J.Immunol.* 2004. **173:** 6526-6531.
105. **Chen,W., Jin,W., Hardegen,N., Lei,K.J., Li,L., Marinos,N., McGrady,G., and Wahl,S.M.,** Conversion of peripheral CD4+. *J.Exp.Med.* 2003. **198:** 1875-1886.
106. **Fontenot,J.D., Rasmussen,J.P., Gavin,M.A., and Rudensky,A.Y.,** A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 2005. **6:** 1142-1151.
107. **Grossman,W.J., Verbsky,J.W., Barchet,W., Colonna,M., Atkinson,J.P., and Ley,T.J.,** Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 2004. **21:** 589-601.
108. **Zhao,D.M., Thornton,A.M., DiPaolo,R.J., and Shevach,E.M.,** Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006. **107:** 3925-3932.
109. **Baecher-Allan,C., Viglietta,V., and Hafler,D.A.,** Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J.Immunol.* 2002. **169:** 6210-6217.
110. **Valencia,X., Stephens,G., Goldbach-Mansky,R., Wilson,M., Shevach,E.M., and Lipsky,P.E.,** TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006. **108:** 253-261.
111. **Pasare,C. and Medzhitov,R.,** Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003. **299:** 1033-1036.
112. **Shevach,E.M. and Stephens,G.L.,** The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat.Rev.Immunol.* 2006. **6:** 613-618.

113. **Ko,K., Yamazaki,S., Nakamura,K., Nishioka,T., Hirota,K., Yamaguchi,T., Shimizu,J., Nomura,T., Chiba,T., and Sakaguchi,S.**, Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 2005. **202**: 885-891.
114. **Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R.**, Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 2002. **20**: 197-216.
115. **Doganci,A., Eigenbrod,T., Krug,N., De Sanctis,G.T., Hausding,M., Erpenbeck,V.J., Haddad,e., Lehr,H.A., Schmitt,E., Bopp,T., Kallen,K.J., Herz,U., Schmitt,S., Luft,C., Hecht,O., Hohlfeld,J.M., Ito,H., Nishimoto,N., Yoshizaki,K., Kishimoto,T., Rose-John,S., Renz,H., Neurath,M.F., Galle,P.R., and Finotto,S.**, The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J.Clin.Invest* 2005. **115**: 313-325.
116. **Sutmuller,R.P., den Brok,M.H., Kramer,M., Bennink,E.J., Toonen,L.W., Kullberg,B.J., Joosten,L.A., Akira,S., Netea,M.G., and Adema,G.J.**, Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J.Clin.Invest* 2006. **116**: 485-494.
117. **Peng,G., Guo,Z., Kuniwa,Y., Voo,K.S., Peng,W., Fu,T., Wang,D.Y., Li,Y., Wang,H.Y., and Wang,R.F.**, Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 2005. **309**: 1380-1384.
118. **Belkaid,Y.**, Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat.Rev.Immunol.* 2007. **7**: 875-888.
119. **Hisaeda,H., Maekawa,Y., Iwakawa,D., Okada,H., Himeno,K., Kishihara,K., Tsukumo,S., and Yasutomo,K.**, Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat.Med.* 2004. **10**: 29-30.
120. **Taylor,M.D., LeGoff,L., Harris,A., Malone,E., Allen,J.E., and Maizels,R.M.**, Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J.Immunol.* 2005. **174**: 4924-4933.
121. **Wei,G. and Tabel,H.**, Regulatory T cells prevent control of experimental African trypanosomiasis. *J.Immunol.* 2008. **180**: 2514-2521.
122. **Miyara,M., Amoura,Z., Parizot,C., Badoual,C., Dorgham,K., Trad,S., Nochy,D., Debre,P., Piette,J.C., and Gorochoy,G.**, Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 2005. **175**: 8392-8400.

123. **Zenclussen,A.C., Gerlof,K., Zenclussen,M.L., Sollwedel,A., Bertoja,A.Z., Ritter,T., Kotsch,K., Leber,J., and Volk,H.D.**, Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *Am.J.Pathol.* 2005. **166**: 811-822.
124. **Tenorio,E.P., Olguin,J.E., Fernandez,J., Vieyra,P., and Saavedra,R.**, Reduction of Foxp3+ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J.Biomed.Biotechnol.* 2010. **2010**: 786078.
125. **Pina-Vazquez,C., Saavedra,R., and Herion,P.**, A quantitative competitive PCR method to determine the parasite load in the brain of *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Parasitol.Int.* 2008. **57**: 347-353.
126. **Maloy,K.J. and Powrie,F.**, Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat.Immunol.* 2001. **2**: 816-822.
127. **Waldmann,T.A.**, The multichain interleukin-2 receptor: from the gene to the bedside. *Harvey Lect.* 1986. **82**: 1-17.
128. **Amante,F.H., Stanley,A.C., Randall,L.M., Zhou,Y., Haque,A., McSweeney,K., Waters,A.P., Janse,C.J., Good,M.F., Hill,G.R., and Engwerda,C.R.**, A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am.J.Pathol.* 2007. **171**: 548-559.
129. **Couper,K.N., Blount,D.G., de Souza,J.B., Suffia,I., Belkaid,Y., and Riley,E.M.**, Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3+ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J.Immunol.* 2007. **178**: 4136-4146.
130. **Mendez,S., Reckling,S.K., Piccirillo,C.A., Sacks,D., and Belkaid,Y.**, Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J.Exp.Med.* 2004. **200**: 201-210.
131. **Quinn,K.M., McHugh,R.S., Rich,F.J., Goldsack,L.M., de Lisle,G.W., Buddle,B.M., Delahunt,B., and Kirman,J.R.**, Inactivation of CD4+ CD25+ regulatory T cells during early mycobacterial infection increases cytokine production but does not affect pathogen load. *Immunol.Cell Biol.* 2006. **84**: 467-474.
132. **Quinn,K.M., Rich,F.J., Goldsack,L.M., de Lisle,G.W., Buddle,B.M., Delahunt,B., and Kirman,J.R.**, Accelerating the secondary immune response by inactivating

CD4(+)CD25(+) T regulatory cells prior to BCG vaccination does not enhance protection against tuberculosis. *Eur.J.Immunol.* 2008. **38**: 695-705.

133. **Couper,K.N., Blount,D.G., Wilson,M.S., Hafalla,J.C., Belkaid,Y., Kamanaka,M., Flavell,R.A., de Souza,J.B., and Riley,E.M.,** IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS.Pathog.* 2008. **4**: e1000004.
134. **Shin,K., Horigome,A., Yamauchi,K., Yaeshima,T., and Iwatsuki,K.,** Orally administered lactoperoxidase ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by up-regulating colonic interleukin-10 and maintaining peripheral regulatory T cells. *Int.Immunopharmacol.* 2009. **9**: 1387-1393.
135. **Kohm,A.P., McMahon,J.S., Podojil,J.R., Begolka,W.S., DeGutes,M., Kasprovicz,D.J., Ziegler,S.F., and Miller,S.D.,** Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J.Immunol.* 2006. **176**: 3301-3305.
136. **Baumgart,M., Tompkins,F., Leng,J., and Hesse,M.,** Naturally occurring CD4+Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J.Immunol.* 2006. **176**: 5374-5387.
137. **Nie,C.Q., Bernard,N.J., Schofield,L., and Hansen,D.S.,** CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress CD4+ T-cell function and inhibit the development of *Plasmodium berghei*-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. *Infect.Immun.* 2007. **75**: 2275-2282.
138. **Couper,K.N., Lanthier,P.A., Perona-Wright,G., Kummer,L.W., Chen,W., Smiley,S.T., Mohrs,M., and Johnson,L.L.,** Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J.Immunol.* 2009. **182**: 3985-3994.
139. **Casciotti,L., Ely,K.H., Williams,M.E., and Khan,I.A.,** CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells. *Infect.Immun.* 2002. **70**: 434-443.
140. **Rudensky,A.Y. and Campbell,D.J.,** In vivo sites and cellular mechanisms of T reg cell-mediated suppression. *J.Exp.Med.* 2006. **203**: 489-492.
141. **Murakami,M., Sakamoto,A., Bender,J., Kappler,J., and Marrack,P.,** CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002. **99**: 8832-8837.

142. **Godfrey,D.I., MacDonald,H.R., Kronenberg,M., Smyth,M.J., and Van Kaer,L.,** NKT cells: what's in a name? *Nat.Rev.Immunol.* 2004. **4**: 231-237.
143. **Combe,C.L., Curiel,T.J., Moretto,M.M., and Khan,I.A.,** NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. *Infect.Immun.* 2005. **73**: 4913-4921.
144. **Konigshofer,Y. and Chien,Y.H.,** Gammadelta T cells - innate immune lymphocytes? *Curr.Opin.Immunol.* 2006. **18**: 527-533.
145. **Lee,J., Choi,K., Olin,M.R., Cho,S.N., and Molitor,T.W.,** Gammadelta T cells in immunity induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination. *Infect.Immun.* 2004. **72**: 1504-1511.
146. **Li,L. and Wu,C.Y.,** CD4+ CD25+ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to M tuberculosis antigen ESAT-6. *Blood* 2008. **111**: 5629-5636.
147. **Paust,S., Lu,L., McCarty,N., and Cantor,H.,** Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004. **101**: 10398-10403.
148. **Annacker,O., Pimenta-Araujo,R., Burlen-Defranoux,O., Barbosa,T.C., Cumano,A., and Bandeira,A.,** CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J.Immunol.* 2001. **166**: 3008-3018.
149. **Uhlig,H.H., Coombes,J., Mottet,C., Izcue,A., Thompson,C., Fanger,A., Tannapfel,A., Fontenot,J.D., Ramsdell,F., and Powrie,F.,** Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J.Immunol.* 2006. **177**: 5852-5860.
150. **Rao,P.E., Petrone,A.L., and Ponath,P.D.,** Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *J.Immunol.* 2005. **174**: 1446-1455.
151. **Fantini,M.C., Becker,C., Tubbe,I., Nikolaev,A., Lehr,H.A., Galle,P., and Neurath,M.F.,** Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 2006. **55**: 671-680.

152. **Long, T.T., Nakazawa, S., Onizuka, S., Huaman, M.C., and Kanbara, H.**, Influence of CD4+CD25+ T cells on Plasmodium berghei NK65 infection in BALB/c mice. *Int.J.Parasitol.* 2003. **33**: 175-183.

153. **Kotner, J. and Tarleton, R.**, Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of Trypanosoma cruzi infection in mice. *Infect.Immun.* 2007. **75**: 861-869.

IX. ABREVIATURAS

C-18	Ciclofilina-18
CTLA-4	Antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos-4
DCs	Células dendríticas
Foxp3	Factor de transcripción “forkhead/winged-helix box P3”
GITR	Factor-Receptor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides
IFN- γ	Interferón gamma
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
LAG-3	Gen de activación de linfocitos-3
LD ₅₀	Dosis letal 50%
LD ₁₀₀	Dosis letal absoluta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Teffs	Células T efectoras
TGF-b	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo toll
TNF-a	Factor de necrosis tumoral alfa
Tregs	Células T reguladoras
Tsup	Células T supresoras
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
DPBS	Amortiguador salino de fosfatos de Dulbecco