



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS T REGULADORES
ESPLENICOS EN RATONES TRATADOS CON GABA E
INOCULADOS CON *CANDIDA ALBICANS*.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Paola Kathleen Raquel Ziegler Rivera

MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MISAEL GONZÁLEZ IBARRA

VOCAL: FERNANDO GARCÍA TAMAYO

SECRETARIO: PATRICIA ELVIRA BERRÓN RUIZ

1er. SUPLENTE: GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS

2° SUPLENTE: GUSTAVO OLVERA GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR, DEPTO. DE BIOLOGIA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

FERNANDO GARCIA TAMAYO

SUPERVISOR TÉCNICO :

MARIA GUADALUPE REYES GARCIA

SUSTENTANTE:

PAOLA KATHLEEN RAQUEL ZIEGLER RIVERA

C O N T E N I D O

I AGRADECIMIENTOS

II RESUMEN

III ANTECEDENTES

1. Las infecciones por *Candida albicans*
2. La respuesta defensiva contra la infección
3. Los macrófagos como un mecanismo defensivo
4. La inmunidad modulada por el sistema nervioso
5. Los linfocitos T reguladores
6. Los mecanismos de supresión de los linfocitos T reguladores

IV OBJETIVOS

V HIPÓTESIS

VI MATERIAL Y MÉTODOS

1. *Candida albicans*
2. Ratones
3. Inoculación del hongo
4. Dosis de GABA
5. Obtención del bazo.
6. Cuenta y ajuste celular
7. Tinción de los linfocitos
8. Lectura de la fluorescencia
9. Análisis de los resultados
10. Análisis estadístico

VII DISEÑO EXPERIMENTAL

VIII RESULTADOS

IX ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

X DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

XI CONCLUSIONES

XII BIBLIOGRAFÍA

XIII APÉNDICES

- a) Lista de Figuras
- b) Abreviaturas
- c) Soluciones y reactivos

I AGRADECIMIENTOS

- A mi madre, porque sin su apoyo, cariño y ejemplo jamás habría podido lograr este sueño. Gracias por ser esa luchadora de la vida que jamás se ha dejado vencer. Gracias por tus cálidos abrazos y por siempre tener las palabras necesarias en el momento oportuno, por curar cada enfermedad, por los te amo en el momento adecuado, por él no te rindas tu puedes en el momento exacto y por ser " mi gran amiga" "Tus brazos siempre se abrían cuando quería un abrazo. Tu corazón comprendía cuando te necesitaba. Tus ojos tiernos se endurecían cuando me hacia falta una lección. Tu fuerza y tu amor me guiaron y me dieron alas para volar"
- A mi hermano por ser el hombre, el niño, el amigo que es; por ser todo un ejemplo a seguir.
- A mi Juan, por ser mi cómplice mi mejor amigo, mi consejero, mi novio, sigue luchando amor; al final de la batalla verás la recompensa de tu lucha te amo yacías or ese cmpromiso que nos cumple amado "amor".
- A mis dos ángeles maravillosos mis abuelitos Raquel y Máximo que me criaron, educaron y forjaron en mi detalles y recuerdos tan especiales. Jamás los olvidaré; viven en mi corazón e iluminan mi espíritu.
- A todos mis tíos y tías sin excepción, pero en especial a mi tío José Luis, mi tío Sergio , Lulú y Tita.
- A mis primos por ser mis primeros mejores amigos; gracias Lalis, Octavio, Miguel y Sebastián.
- A mi cachorro (Fernando Pedraza Rivera) que tanto amo; siempre serás parte de mi alma, te amo. Gracias por venir a iluminar mi vida con tu conocimiento y hacer que yo me actualice gracias a ti.
- A mis amigos P3 por todas esas horas de diversión; los amo.

- A Luz Angélica: gracias por estar siempre a mi lado; por demostrarme que en la vida una verdadera amistad vence distancia, tiempo y lo que falte; sigamos en búsqueda de la felicidad
- A todos mis amigos de la Facultad de Química, por haber sido mis hermanos durante 5 años; por estudiar juntos, hacer equipo juntos y porque no, todos los enojos. Gracias Deja, Ana Karla, Lalo, Montse, Sabino, Grisel, Vincent, Israel, Marco, López.
- A mi cepario hermoso donde culmine mi Servicio Social: Prof: Alejandro Camacho, Profra. Anto y Lau mis fieles amigos y cómplices.
- A la UNAM, por forjar mi mente, alma espíritu, jamás podre pagarle todo lo que me ha brindado.
- A DGAPA, por el apoyo económico del proyecto IN-211311 y la beca que recibí, que tanto me ayudó.
- A la Dra. Francisca Hernández, Dr. Rubén López, Dra. Blanca Millán Chiu, Q.F.B Erika Córdoba, Biól. Elva Bazán Mora, por su enseñanza y apoyo respecto *Candida albicans* y su amistad.
- Al maravilloso laboratorio de inmunoterapia e ingeniería de tejidos; al Dr. Castell, Dr. Mike, a la M en C. Judit y a la Biól. Betty, por todo su apoyo enseñanza y cariño.
- A la Dra. Gabriela Piñón Zarate, por convertirse en una gran amiga y por todos sus consejos enseñanzas y por su bella amistad, te adoro.
- A Kata, Dany, Paty, Marlene, Leo, Karla, Rodrigo, Mayela, Paulina, Mical, Rosa, por hacer esos días de trabajo especiales, llenos de alegría; por el maravilloso congreso en Zacatecas y por ser mis grandes amigos.
- Al Q.F.B Carlos Castellanos, por el entrenamiento y el manejo del equipo de Citometría de flujo.

- A Barbara Moguel por su apoyo en el análisis estadístico y su amistad.
- A los doctores Fernando y Guadalupe, mis maravillosos asesores y tutores de tesis; mil gracias por todas esas horas de enseñanza y apoyo.
- A mis sinodales, por las correcciones y las sugerencias recibidas para mejorar esta tesis. Mil gracias por su tiempo y apoyo.

II RESUMEN

Desde hace más de 40 años se conoce que entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune existen numerosas interacciones bidireccionales que conservan en equilibrio sus respectivas funciones (Besedowsky, 1981). Las comunicaciones entre los tres sistemas se llevan a cabo a través de los ligandos y receptores compartidos para moléculas efectoras que pueden ser estimulantes o inhibitorias. El aumento unilateral y prolongado en la producción de algún neurotransmisor, hormona o citocina por las células de un sistema se acompaña generalmente de cambios simultáneos en la producción de varios otros mediadores de los otros dos sistemas, con la finalidad de conservar la homeostasis. Esos cambios simultáneos en los tres sistemas se observan principalmente en el curso de infecciones prolongadas o de enfermedades autoinmunes inflamatorias, crónicas que provocan una producción excesiva de citocinas o prostaglandinas (Teeling, 2007) por parte de los macrófagos del sistema inmune.

En el caso de las infecciones, las moléculas de los microorganismos, en general y de *Candida albicans* en lo particular, poseen patrones moleculares, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que estimulan diversas células del sistema inmune como los linfocitos, pero principalmente los macrófagos. Los PAMPs se unen a dos clases de receptores que expresan los macrófagos. (1) Los receptores parecidos a Toll (TLR), que se encuentran en la superficie de la membrana citoplásmica y (2) los receptores parecidos a NOD (NLR) que son sensores intracitoplasmáticos comunes a todas

las células y que participan, junto con la caspasa-1, en la formación de los inflamomas (Bortoluci, 2010). Como una consecuencia de la infección y de la estimulación de esos receptores, aumenta la producción de citocinas inflamatorias (Dotis, 2007) y la actividad de los linfocitos del sistema inmune.

Tanto la producción de citocinas como la actividad de los linfocitos se encuentran controladas por dos subpoblaciones de linfocitos T que son estimulados en el curso de las infecciones. La primera de esas dos subpoblaciones (la de los linfocitos TH17) está formada por células colaboradoras que facilitan la respuesta inflamatoria (De Luca, 2010), mientras que la otra subpoblación, la de los linfocitos T reguladores (Treg), está formada por células supresoras que modulan negativamente la respuesta inflamatoria (Kroetz, 2010; Loures, 2010). Del balance entre ellos depende, en líneas generales, el curso de la relación hongo-hospedero y el final o la prolongación de las reacciones inflamatorias.

En los últimos años se ha estudiado el efecto de algunos neurotransmisores inhibidores, como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) sobre la actividad supresora de los linfocitos T reguladores. Han sido importantes los trabajos que demuestran como el GABA aumenta la cantidad de linfocitos Treg en animales de laboratorio con enfermedades como la diabetes y neuropatías similares a la esclerosis múltiple, que son de naturaleza autoinmune (Bhat *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2011). En estos animales, el aumento de la supresión de la respuesta inmune responsable de la diabetes y de la esclerosis múltiple, se traduce en una mejoría. La bibliografía consultada no tiene referencias sobre trabajos que exploren las consecuencias que tiene la administración de GABA cuando disminuye la actividad inmunosupresora de los Treg en el caso de infecciones, particularmente en aquellas causadas por *Candida albicans*. Está justificado investigar este problema porque en los últimos años la candidiasis ha aumentado su incidencia y también se ha elevado el número de pacientes que reciben GABA como tratamiento anti-convulsivo o ansiolítico.

En este trabajo se estudian las proporciones de los linfocitos Treg en el bazo de los ratones que son inoculados intraperitonealmente con *Candida albicans* y que simultáneamente reciben un tratamiento profiláctico con el ácido gama-aminobutírico (GABA). Se propone que si la administración de GABA incrementa la población de linfocitos supresores Treg, los ratones que reciben un tratamiento con este neurotransmisor deben tener disminuida la respuesta inflamatoria defensiva contra las infecciones, de tal modo que, después de un reto intra-peritoneal con las levaduras, en ellos debe aumentar la formación de abscesos en los órganos abdominales, a causa de que los animales infectados deben tener disminuida su competencia inmunológica.

Para comprobar esta hipótesis de trabajo se utilizaron 4 grupos de ratones machos CD1, jóvenes. Los animales del grupo I recibieron inoculaciones con una suspensión de la levadura, durante 2 semanas; los del grupo 2 recibieron GABA durante ese mismo tiempo; los del grupo III recibieron tanto la levadura como el GABA y los del grupo IV no recibieron ningún tratamiento. Todos los animales se sacrificaron a los 15 días de iniciado el experimento y se les exploró el peritoneo para buscar la formación de abscesos; los linfocitos fueron separados del bazo de los ratones y teñidos con anticuerpos conjugados que reconocieron los marcadores de membrana CD4 y CD25, más el del factor de transcripción Foxp3 localizado en el citoplasma. La identificación de los linfocitos Treg se llevó a cabo en un citómetro de flujo. Los resultados, comparados con el grupo control, mostraron que 1) en los ratones inyectados solamente con el hongo no hubo formación de abscesos y solo se observó un aumento no significativo de la población de linfocitos Treg, 2) en los ratones inyectados con GABA solo se observó un ligero aumento no significativo en la cantidad de linfocitos Treg y 3) en los ratones que recibieron tanto la levadura como el neurotransmisor inhibitorio **sí** hubo formación de abscesos en el hígado, bazo y riñón, aunque los ratones no mostraban síntomas de estar enfermos, y las cantidades de linfocitos Treg se elevaron significativamente.

III ANTECEDENTES

1. Las infecciones por *Candida albicans*

Candida albicans (CA) es un hongo levaduriforme que habita como un comensal en todas las personas sanas. En ciertas circunstancias, como cuando existe una inmunodeficiencia o una inmunosupresión, la levadura adquiere características de un oportunista y provoca infecciones. Algunas de éstas pueden ser rebeldes al tratamiento. El hongo tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. Sus reservorios más importantes en el cuerpo son las membranas mucosas de la boca y el tubo digestivo, del aparato genital y del árbol respiratorio. *Candida albicans* también se encuentra como un comensal sobre la piel. En todas estas regiones anatómicas es posible observar el cambio del microorganismo que de comensal se convierte en patógeno cada vez que disminuyen las defensas del hospedero.

Ciertas condiciones del hongo o de su medio favorecen ese cambio de comensal a patógeno. Estos cambios pueden estar causados por la tolerancia a temperaturas mayores a 37°C y por alteraciones metabólicas como el aumento en la producción de ciertas enzimas. Uno de los factores que más facilitan la expresión de su patogenicidad es la adaptación al medio que generalmente presenta un menor potencial de reducción y variabilidad del pH según la región anatómica que ataque.

Candida albicans posee diversos factores de virulencia. A continuación se mencionan los más importantes. (a) Las adhesinas, que son proteínas con la capacidad de adherirse a las células del hospedero. (b) Varias proteínas propias de CA que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular (MEC) de células de mamíferos, tales como la fibronectina (FN), laminina, fibrinógeno y el colágeno I y IV . (c) La aglutinina (Als1p) de *Candida albicans* que es un miembro de una

familia de siete proteínas glicosiladas con homología por las α -aglutininas de *S. cerevisiae* y que se requieren para el reconocimiento célula-célula durante diferentes eventos del comensalismo. (d) La morfogénesis es otro factor de virulencia. Se refiere a la transición de (blastoconidio) a la formación de un pseudofilamento. CA es reversible, es decir, blastoconidio a pseudohifa o hifas en crecimiento. Todas las especies de *Candida*, poseen fase filamentosa excepto *Candida glabrata*. Así, estas especies son capaces de crecer en una forma isótropa (blastoconidios) o apical (pseudohifas) o sea que sus patrones de crecimiento son polimórficos. Con respecto a la morfogénesis, hay una larga historia de intentos para demostrar la relación entre la fase filamentosa de CA y su virulencia. Hasta ahora la mayor parte de los resultados sugieren que la presencia de hifas facilita la invasividad del hongo. (e) El contenido en varias enzimas como la aspartil proteinasa (SAP) y la fosfolipasa B (PLB) también ha sido asociado con la virulencia. (f) Los cambios bioquímicos y de la temperatura del medio ambiente también pueden provocar el oportunismo en *Candida albicans*. El hongo algunas veces soporta temperaturas mayores a los 37°C y una serie de cambios bioquímicos causados por las condiciones del hospedero. La adaptación a estos cambios influye en la producción de enzimas y en la adaptación a un medio que por lo general presenta variaciones en el pH y en el potencial de óxido-reducción de acuerdo a la región anatómica en la que se encuentre. (g) La disminución de las defensas del hospedero por inmunodeficiencias, enfermedades crónicas debilitantes, cambios hormonales del embarazo, desnutrición y prematuridad, pueden aumentar la susceptibilidad a las infecciones por el hongo, porque provocan que *C. albicans* se comporte como un oportunista. La colonización por *Candida albicans* puede llevar a la infección sistémica cuando el hospedero tiene varios factores de riesgo, como el uso de antibióticos de amplio espectro, esteroides u otros agentes inmunosupresores, *diabetes mellitus*, SIDA, depresión de las funciones fagocíticas o alteraciones locales del sistema gastrointestinal.

Cuando CA se vuelve oportunista, produce infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas. La piel húmeda y las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección por *Candida* es frecuente. Sin embargo, las candidiasis más graves (candidiasis diseminadas) se observan en personas inmunosuprimidas o con enfermedades subyacentes que predisponen a sufrir esta infección. Durante el embarazo, la vejez o la infancia son frecuentes las candidiasis superficiales y lo mismo sucede en personas portadoras de prótesis dentales y en diabéticos.

En modelos de infecciones experimentales por CA provocadas en diversas cepas de ratones, se han logrado infecciones diseminadas gracias al uso de inmunosupresores que abaten al sistema inmune y de esa forma dejan que la blastoconidiosis se disemine. Durante décadas se han estudiado muchos modelos, en los cuales las variables que más influyen en los resultados son la dosis de blastoconidios/ml, tiempo de incubación, vía de administración, uso de inmunosupresores, uso de antibióticos, sexo de los ratones y edad de los mismos. Los cambios en alguna de estas variables se traducen en resultados diferentes. Así por ejemplo, los tiempos de incubación son muy diversos cuando se comparan unos respecto a otros, ya que van desde horas a un máximo de 15 días y, como una consecuencia, se obtienen valores diferentes cuando se estudian diversos aspectos de la respuesta del hospedero, como la estimulación para que aumente la producción de citocinas o la fagocitosis por los macrófagos.

2. La respuesta defensiva contra la infección

Los seres vivos se encuentran expuestos constantemente a diversos estímulos internos y externos. Algunos de ellos desencadenan señales de daño como los estímulos externos que provienen de los microorganismos que amenazan la integridad del hospedero (Baccala *et al.*, 2009; Schroder, 2010). Cuando esas señales externas son detectadas por las células del sistema inmune,

se inicia una respuesta compleja que tiene como finalidad eliminar la fuente de daño, sanar los tejidos lesionados y, eventualmente, restituir la homeostasis del organismo (Medzhitov, 2008). Esa respuesta inicial es inespecífica y forma parte de la inmunidad innata que nos proporciona inmunidad, es decir protección. También forman parte de esa respuesta defensiva inicial inespecífica todas aquellas que se inician a causa del daño a los tejidos, los cuales exponen varios patrones moleculares que en inglés se conocen como “damage associated molecular pattern” (DAMP). Tanto los DAMP como los PAMP pueden ser reconocidos por receptores y activan, inespecíficamente, vías de señalización que provocan un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias. Los receptores para el reconocimiento de esos patrones moleculares se conocen como PRR, del inglés “pattern recognition receptors”.

La inmunidad tiene un significado amplio en el ámbito médico y coloquialmente puede decirse que es la protección contra la enfermedad, o, más específicamente, inmunidad es protección contra moléculas como las toxinas, microorganismos y antígenos que provocan daño a un organismo hospedero. Depende de numerosos factores, unos que actúan específicamente y otros que son inespecíficos.

Las respuestas defensivas que proporcionan inmunidad se han clasificado en innatas y adaptativas y dependen de dos grandes conjuntos de mecanismos. Ambas respuestas están estrechamente relacionadas, de tal modo que normalmente existe una compleja red de interacciones entre ellas.

La inmunidad innata o natural la proporcionan varios conjuntos de células y las sustancias que ellas producen y liberan. Estas células están preparadas para responder con rapidez ante una agresión. Existen células que fagocitan (macrófagos, células dendríticas y neutrófilos), células que producen mucina o ácido clorhídrico, células que forman queratina o producen melatonina, etc. Todas ellas están repartidas por todo el cuerpo e infiltradas en diferentes sistemas.

En cambio, la inmunidad adaptiva la proporcionan varios conjuntos de células que pertenecen al sistema inmune, las cuales reconocen los antígenos y producen moléculas con la capacidad de discriminar entre lo propio y lo extraño. La respuesta de estas células tiene como finalidad eliminar los antígenos extraños, entre ellos algunos constituyentes de organismos patógenos (Abbas *et al.*, 2010). Y tiene como característica importante ser específica, poseer memoria, ser inducida y transferible.

La respuesta inmune innata se inicia de manera inmediata ante los daños causados por la invasión por microorganismos. Actúa como la primera línea de defensa y sus mecanismos son inespecíficos, aunque algunos de sus mecanismos inflamatorios son estimulados específicamente por estructuras comunes en grupos de microorganismos relacionados (Cinel & Opal., 2009; Abbas *et al.*, 2010). Esas estructuras comunes se conocen como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

La inflamación es uno de los mecanismos más importantes de la inmunidad innata y puede ser reforzado por la inmunidad adaptativa. La inflamación es una respuesta vascular, caracterizada por vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y extravasación de una serie de células y proteínas de la sangre. Las proteínas extravasadas se activan como los sistemas complemento y de la coagulación. Las células pertenecen a diversas estirpes como las de los endotelios, los monocitos, macrófagos, células dendríticas, células cebadas, neutrófilos, eosinófilos, células NK y varias más. La respuesta inflamatoria se inicia generalmente de una manera inespecífica, inmediatamente después del reconocimiento de los PAMPs o de otros patrones moleculares asociados al daño de tejidos (DAMPs) a través de una serie de receptores. Una vez que se activan las enzimas asociadas a esos receptores, dan lugar a la activación de diversas cascadas moleculares con diferentes funciones como la producción y liberación de

citocinas a las que se les atribuye la estimulación de otras células, algunas de ellas que proporcionan la inmunidad adaptativa (Cinel & Copal., 2009).

La inmunidad adaptativa depende de los linfocitos, que son células del sistema inmune con un alto grado de especialización y especificidad para reconocer los antígenos y que responden con la liberación de distintas moléculas. Los linfocitos y sus productos son responsables de las respuestas humoral y celular contra agentes externos, a través de la activación de linfocitos B productores de anticuerpos, por medio de la generación y activación de linfocitos T citotóxicos (Tc) CD8+, o de linfocitos T cooperadores (Th) CD4+ . Este tipo de inmunidad genera un conjunto de células linfoides con una vida media larga, que se conocen como linfocitos de la memoria inmunológica, lo que permite responder con mayor intensidad y rapidez ante la exposición posterior de una misma sustancia o microorganismo (Abbas *et al.*, 2010).

3. Los macrófagos como un mecanismo defensivo

La respuesta defensiva inespecífica forma parte de los mecanismos que nos proporcionan protección o inmunidad. Representa el primer sistema defensivo del organismo y es de especial significado frente a la protección del mismo ante infecciones y cáncer. Las células que mediatizan esta respuesta inespecífica, son los PMN neutrófilos, macrófagos y células NK, que son células que se caracterizan por activarse de forma inmediata siempre que cualquier sustancia extraña penetra en el organismo, como, por ejemplo ocurre, tras una herida o una infección. En este caso todas estas células se movilizan a dicho foco, reconocen y toman contacto con la sustancia extraña, que destruyen mediante el proceso de fagocitosis y/o citotoxicidad natural. En este tipo de respuesta participa también el complemento (C), que está formado por un conjunto de proteínas que se encuentran en el plasma. Los distintos componentes del complemento interactúan

en un determinado orden para ejercer su acción en la defensa del organismo y son responsables de la atracción quimiotáctica de numerosas células y de una amplificación de la respuesta inflamatoria. Probablemente la fagocitosis es el principal elemento que actúa como un mecanismo defensivo inespecífico. La fagocitosis se lleva a cabo en varias fases conocidas como aproximación, fagocitosis y lisis

Los mecanismos de defensa inespecíficos son un buen sistema de protección, aunque por lo general sus mecanismos defensivos se encuentra asociados a los de la respuesta específica del sistema inmune.

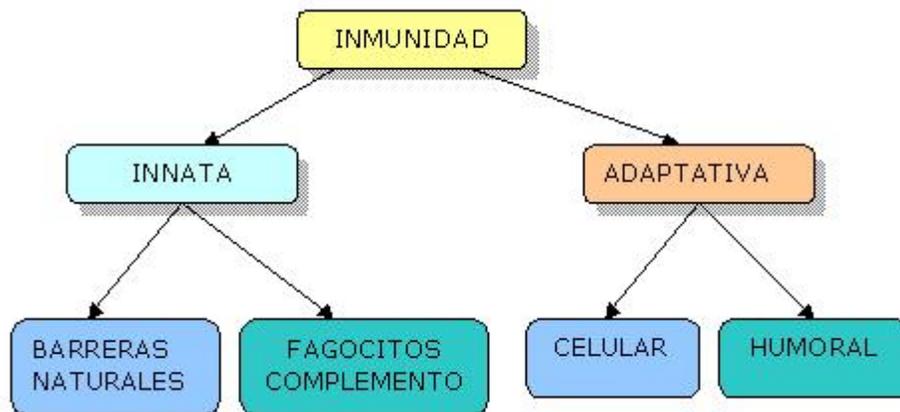


Figura 1. Principales factores que proporcionan inmunidad

Actualmente se denomina activación clásica del macrófago a la actividad inducida por exposición al IFN- γ , el TNF- α , o a inductores de éste, tales como ligandos de receptores tipo Toll (TLR), CpG DNA, poli (I-C), LPS, peptidoglicano y señales endógenas de HSP de 60 y 70 Kda. Estos macrófagos activados por esos factores se denominan M1 y tienen la capacidad de iniciar reacciones pro-inflamatorias, así como la lisis de microorganismos y parásitos y de células cancerosas. Los macrófagos M1 producen y secretan una amplia variedad de citocinas tales como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α , CCL3, CXL9 y CXCL10, así como la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) y generación de óxido

nítrico (NO). Son células que presentan antígenos y están al comienzo de la respuesta específica del sistema inmune.

4.-La inmunidad modulada por el sistema nervioso

La neuro-endocri-inmunología se dedica al estudio e investigación de los mecanismos de interacción y comunicación entre el sistema nervioso (central y autónomo) y los sistemas endocrino e inmunológico, que son responsables del mantenimiento homeostático del organismos, así como sus implicaciones clínicas (Solomon, 1998).

La comunicación entre estos sistemas utiliza un "lenguaje bioquímico" a través de moléculas producidas por esos mismos sistemas (como los neurotransmisores, las citocinas y las hormonas) y la expresión compartida de sus receptores.

De estos sistemas existentes en los vertebrados, en particular el inmune ha sido considerado hasta no hace mucho tiempo como un sistema de defensa esencialmente autónomo; sin embargo, a la vista de las más recientes investigaciones, han tenido que tenerse en cuenta las relaciones con los otros dos sistemas (neuroendocrino y nervioso), así como con el reticuloendotelial y el hematopoyético (Kelley, 2004). La modulación recíproca entre los linfocitos, las células productoras de hormonas y las neuronas y sus vías nerviosas, así como los efectos del estrés y otras variables psicológicas sobre los parámetros inmunológicos ha hecho postular que esa autonomía es más aparente que real (Infante y Peran, 1998a).

Existe una gran variedad de evidencias (experimental y natural, básica y clínica, animal y humana, *in vitro* e *in vivo*, médica y psiquiátrica) sobre la existencia de una comunicación bidireccional entre el sistema nervioso central y varios componentes del sistema inmunológico. Teleológicamente, tiene sentido

que estos dos sistemas estén unidos (Solomon, 2001). Ambos relacionan al organismo con el mundo externo y evalúan sus componentes como indemnes o peligrosos; sus funciones sirven de defensa y adaptación homeostática. Ambos poseen memoria, aprenden por la experiencia y contribuyen a la homeostasis. Los errores en la defensa pueden producir enfermedad como por ejemplo auto-inmunidad o alergias, por un lado y fobias o pánico, por el otro. Blalock (1984) se ha referido al sistema inmunológico como un "sexto sentido", remitiendo información sobre el ambiente al cerebro acerca de los aspectos celulares y ambientales accesibles por los cinco sentidos.

Las interacciones entre los tres sistemas cuentan a estas alturas con notables evidencias en cuanto al intercambio de información que se produce entre ellos. Entre ellas encontramos: 1) funciones localizadas en el cerebro que influyen en la respuesta inmune, 2) la existencia en la membrana de linfocitos y otras células del sistema inmune de receptores para una determinada cantidad de hormonas, neuropéptidos y neurotransmisores, 3) la inervación del timo, el bazo, los nódulos linfáticos o la médula ósea, que son controlados por fibras noradrenérgicas del sistema nervioso simpático y que están bajo el control del sistema nervioso autónomo. Las funciones del sistema inmune se ven afectadas cuando los mecanismos cerebrales encargados de la retroalimentación (*feedback*) están influidos por el estrés. Los estudios han mostrado cómo factores genéticos, el sistema neuroendocrino, el sistema nervioso, el sistema inmune, las emociones, la personalidad y la conducta, están implicados en las respuestas a las bacterias y las infecciones por virus (Shigenobu, 2001).

Robert Ader, que junto a Nicholas Cohen publicaron los primeros trabajos en los que se demostraba la inmunopresión por condicionamiento clásico al sabor dulce de la sacarina, comenta que en el futuro no podrá estudiarse independientemente el sistema inmune de otros sistemas corporales. Se ha hipotetizado que los efectos de determinados factores psicológicos median cambios en la función inmune y en el desarrollo de algunas enfermedades.

Actualmente se han propuesto estrategias para provocar cambios conductuales que influyen en la función del sistema inmune y en las enfermedades por hipersensibilidad que dependen del mismo (Ader, 2001).

Los hongos levaduriformes del género *Candida* son integrantes normales de la microbiota humana. Se mantienen como comensales a través de una compleja red de mecanismos homeostáticos, entre ellos, la fagocitosis y la inmunidad mediada por células de tipo tardío. Los linfocitos T y los macrófagos desempeñan un papel destacado ya que su déficit redonda en una mayor facilidad de *Candida* para adherirse a las células epiteliales. La frecuencia y gravedad de las infecciones dependen, sobre todo, del nivel de linfocitos T CD4⁺ en sangre. Las candidiasis son frecuentes en enfermos con recuentos inferiores a 400 linfocitos CD4/ μ l. Debe tenerse en cuenta que las mananas y las mananoproteínas de la pared celular de *Candida* son activadoras de los linfocitos T CD8⁺, al mismo tiempo que deprimen la actividad de los linfocitos T CD4⁺. Por consiguiente, las infecciones por *Candida* pueden potencializar el efecto inmunodepresor del VIH. Por esta razón, en pacientes VIH positivos, se ha propuesto la administración de tratamientos antifúngicos durante lapsos prolongados a fin de reducir el nivel de antígenos libres en sangre y tejidos, evitando un deterioro mayor de la inmunidad. La preservación de la función fagocitaria de los neutrófilos en los pacientes HIV positivos, así como la buena producción de anticuerpos contra el antígeno de 47 KDa de *Candida*, reducen la frecuencia de candidiasis diseminadas en condiciones habituales.

5. Los linfocitos T reguladores.

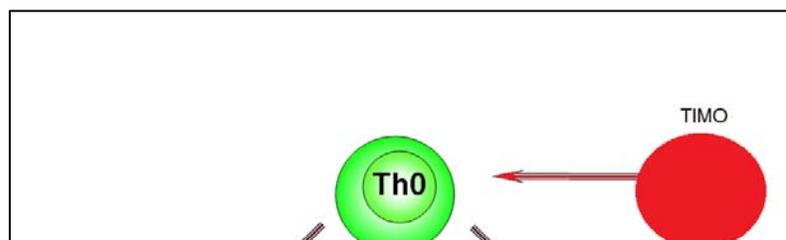
Los linfocitos T pueden ser células CD4⁺ ó CD8⁺. Cada una de estas dos subpoblaciones tiene marcadores de membrana distintos y lleva a cabo funciones que también son diferentes. Los linfocitos T reguladores generalmente son linfocitos T CD4⁺. Este tipo de células T tienen una actividad supresora y son

esenciales para mantener la tolerancia periférica, prevenir enfermedades autoinmunes y limitar las enfermedades inflamatorias crónicas. Se ha observado también que modulan las respuestas benéficas ya que suprimen la inmunogenicidad y limitan la inmunidad antitumoral. Por lo anterior se dice que tienen un efecto benéfico y otro deletéreo (Sakaguchi *et al.*, 2008; Vignali *et al.*, 2008). El sistema inmune normal produce células Treg CD4+, CD25 + y FOXP3+ que están comprometidas para suprimir respuestas inmunes en contra de antígenos propios (como las células tumorales y las células propias que han sido infectadas) y antígenos extraños (como los de las células de los injertos) y los CD8+ que junto con el Ag HLA Clase I presentan antígenos propios.

El timo normal produce linfocitos T autorreactivos potencialmente perjudiciales y que, por consiguiente, deben ser eliminados, lo cual sucede normalmente con la colaboración de las células epiteliales del timo llamadas “nodrizas”. Aquellos linfocitos T autorreactivos que se escapan del timo y pasan a la circulación, generalmente son controlados o suprimidos por los linfocitos Treg.

Los linfocitos Treg que se forman naturalmente en el timo expresan el factor de transcripción Forkhead box P3 (FOXP3), que regula el desarrollo y función de estas células. El FOXP3 induce la expresión de CD25 (cadena α del receptor de interleucina 2), de CTLA-4 y la proteína GITR, la cual reprime la producción de IL-2, IL-4 e IFN- γ . Los linfocitos Treg también pueden ser formados en la periferia a partir de linfocitos T CD4+ *naïve*. Se ha visto que en presencia de TGF- β , IL-2 y ácido retinoico, las células T *naïve* CD4 pueden adquirir el fenotipo característico de los linfocitos T reguladores (Sakaguchi *et al.*, 2008).

En la Figura 2.- se muestra el origen y los factores de transcripción que expresan los diferentes tipos de linfocitos.



En la Figura 2.- se muestra el origen y los factores de transcripción que expresan los diferentes tipos de linfocitos, modificado de Conroy *et al.*, 2008.

6. Los mecanismos de supresión de los linfocitos T reguladores.

Supresión por citocinas inhibitorias. Los linfocitos Treg producen IL-10, TGF- β e IL-35, las cuales bloquean las respuestas inmunes. Se ha observado que IL-10 suprime la inmunidad antitumoral y controla las respuestas inflamatorias inducidas por patógenos o daños ambientales. Específicamente, IL-10 actúa principalmente sobre las células presentadoras de antígenos (CPA) y linfocitos T (Vignali *et al.*, 2008). En los linfocitos T, IL-10 suprime la producción de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ por lo que se inhiben las respuestas tipo-TH1 y tipo-TH2. En las CPA, la IL-10 de los linfocitos Treg suprime la presentación de antígenos y la expresión de moléculas coestimuladoras. Estos efectos se deben a que, al unirse IL-10 con su receptor (IL-10R), se inhibe la activación del factor nuclear NF- κ B, que es un factor de transcripción que controla la expresión de muchas de las citocinas pro-inflamatorias que son inhibidas (Asadullah *et al.*, 2003). Por otra parte, el TGF- β es otra citocina que controla la respuesta inmune en contra de *M. tuberculosis*, suprime respuestas alérgicas y limita la inmunidad antitumoral al inducir anergia en células T efectoras. Por último, la IL-35 se ha visto que inhibe la proliferación

de los linfocitos T, aún no se tienen muchos estudios acerca de esta citocina (Vignali *et al.*, 2008).

Supresión por citolisis. La supresión de la respuesta inmune también la pueden llevar a cabo los Treg mediante la secreción de perforinas y granzimas, específicamente la granzima A dependiente de perforina y la granzima B parcialmente dependiente de perforina. Estas moléculas actúan provocando la lisis de las células blanco. También se conoce que los linfocitos Treg llevan a cabo otra forma de supresión citolisis, mediante la inducción de la apoptosis por activación de la caspasa-8, utilizando el ligando proteico conocido como “TNF-related apoptosis-inducing ligand” (TRAIL) ó CD253 (Vignali *et al.*, 2008), el cual es una molécula que pertenece a la familia de los Factores Necrosantes de Tumores (TNF).

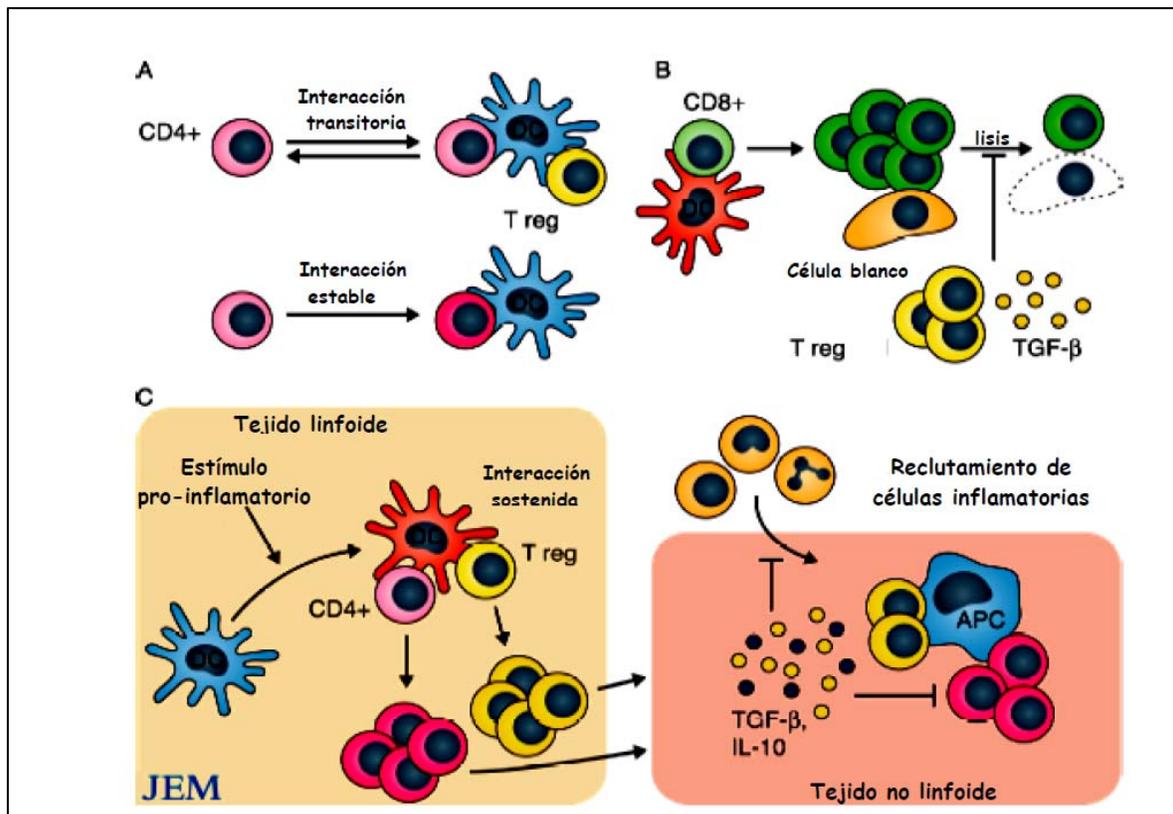
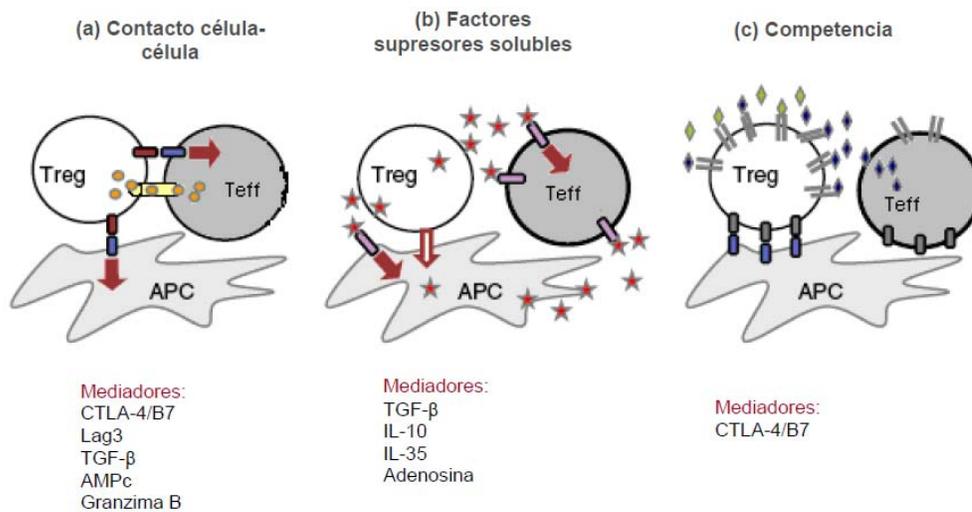


Figura 3.-Los mecanismos de supresión de los linfocitos T reguladores. A) En el tejido linfoide, la interacción de los linfocitos Treg con las células dendríticas (CD) ayuda a restringir su capacidad de formar complejos estables con células T auto-reactivas, dando como resultado interacciones transitorias entre el MHC y el TCR. Un estímulo inflamatorio activa a las CD, resultando así una interacción sostenida con células T. B) Los linfocitos Treg pueden inhibir la muerte celular mediada por CD8+, a través de la secreción de TGF- β . C) La sobre-estimulación y migración de APCs hacia tejido linfoide produce una expansión de células Treg y CD4+; por otra parte, y la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 ó TGF- β por los Treg, puede limitar las funciones de las células T e inhibir el reclutamiento de células mieloides inflamatorias. Tomado de Rudensky & Cannell, 2006.

Supresión por disrupción metabólica. Este tipo de mecanismo controla la disrupción metabólica de la célula T blanco. Se cree que la alta expresión de CD25 en células Treg está relacionada con el agotamiento de la interleucina IL-2 en el medio, lo cual provoca apoptosis en células T efectoras, ya que ellas requieren de IL-2 para sobrevivir, pero este hecho aún está en debate. Por otro lado, se han descrito otros mecanismos de disrupción metabólica que inducen la liberación de nucleósidos de adenosina, intracelular o extracelularmente. Cuando se expresan las ectoenzimas CD39 y CD73 se genera adenosina pericelular, la cual suprime la función de las células T efectoras a través de la activación del receptor 2A de adenosina, también inhibe la expresión de IL-6 y promueve la secreción de TGF- β , lo cual amplifica la generación de células Treg (Vignali *et al*, 2008).

Supresión mediante la modulación de la función o maduración de células dendríticas (CD). Además de su efecto directo sobre las células T efectoras, las Treg podrían también modular la maduración y/o función de algunas células dendríticas (CD). Se cree que las células Treg y las CD interactúan mediante la molécula inhibitoria CTLA-4, así mismo se cree que se induce la expresión de la enzima Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en las CD. Esta enzima es una molécula

que presenta funciones supresoras. También se ha visto que la interacción de una Treg con una CD regula negativamente las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Las células Treg también expresan la proteína LAG-3, que se une al MHC II en las CD inmaduras, lo cual induce una vía de señalización inhibitoria mediada por los motivos de activación de un inmunoreceptor basado en tirosina (ITAMs), cuya fosforilación suprime la maduración de las CDs y su capacidad inmunoestimuladora (Vignali *et al*, 2008).



En la Figura 4.- se muestran los diferentes mecanismos de supresión que utilizan los linfocitos Treg para controlar la actividad de las células efectoras de la respuesta inmune

Las células T que ejercen una función reguladora (Treg) derivan del timo y modulan muchos aspectos de la respuesta inmune. Esas células se llaman linfocitos T reguladores naturales (nTreg). Sin embargo, no todas las células Treg

se desarrollan en el timo (Bluestone y Abbas, 2003). Muchos subtipos de células T reguladoras funcionales se forman fuera del timo. Ellas son inducidas por las células dendríticas, por lo que se denominan linfocitos T reguladores inducidos (iTreg) y, lo mismo que los linfocitos nTreg, suprimen las respuestas de los linfocitos auto-reactivos y modulan negativamente las funciones fisiológicas de los linfocitos T normales cuando se reconocen los antígenos extraños.

No obstante, no todas las células T reguladoras ejercen función supresora ya que ha sido demostrada la existencia de linfocitos Tregs con una función estimulante pro-inflamatoria (Kryczek *et al.*, 2011). Las Tregs se activan de forma antígeno específico aunque su función efectora es antígeno no-específico (Dasu *et al.*, 2008). La especificidad de unión al antígeno de los linfocitos Treg a través de su TCR podría ser seleccionado dentro de la glándula del timo cuando las células inmaduras Treg están bajo la influencia de las citocinas, las hormonas y neurotransmisores. Los linfocitos Tregs pueden ejercer sus funciones supresoras sobre otras células inmunes (Dinesh *et al.*, 2010) por la liberación de citocinas, mediante el contacto célula-célula, mediante la inducción de citotoxicidad o mediante anergia en células presentadoras de antígenos.

Las células Treg a las que se les induce la actividad supresora se conocen como células Treg por "adaptación" o "inducidas" (iTreg). Estas últimas son linfocitos naïve periféricos CD4 Foxp3⁺ o CD8 Foxp3⁺, que se desarrollan en el periferia sobre la presentación de antígenos sub-inmunógenos, durante la inflamación crónica o la homeostasis normal de los intestinos (Pillai *et al.*, 2007; Curotto de Lafaille y Lafaille, 2009). La inducción de células T reguladoras parece ser importante en la tolerancia a antígenos extraños, tales como las bacterias comensales en el intestino (Haribhai *et al.*, 2011). Las funciones de las iTreg son esenciales y complementarias a la función reguladora de nTregs. Naturales o inducidas, las células T reguladoras tienen distintos orígenes y características específicas, ya que ejercen sus funciones a través de distintos mecanismos.

Las células Treg Inducida (iTreg) puede tener un papel importante en la tolerancia a antígenos extraños, tales como las bacterias comensales en el intestino (Haribhai *et al.*, 2011), y sus funciones son complementarios a la función reguladora de las nTregs. Una excelente revisión sobre el papel de la auto-reactividad como el factor decisivo en el desarrollo de Treg en el timo se acababa de publicar (Hsieh *et al.*, 2012).

7.- El efecto de GABA sobre los linfocitos

GABA es un aminoácido que en el sistema nervioso ejerce un efecto inhibitorio a dosis bajas (1mM). Sin embargo, en los últimos 7 años se ha demostrado que también ejerce un efecto inhibitorio sobre los linfocitos (Tian *et al.*, 2004; 2011), los macrófagos (Reyes-García *et al.*, 2007) y células dendríticas (Bhat *et al.*, 2009), debido a que estas células producen receptores tipo A de GABA, así como también producen este aminoácido. En el caso de los linfocitos, GABA ejerce un efecto inmunomodulador.

Los receptores tipo A para GABA se expresan normalmente sobre la membrana de los adipocitos y de varias células que participan en la respuesta del sistema inmune, tales como los macrófagos y los linfocitos T (Alan *et al.*, 2006). Desde hace años se propuso que el neurotransmisor se puede unir a esos receptores y que de este modo participa en la neuromodulación del sistema inmune (Devoino *et al.*, 1992). Esas proposiciones iniciales han sido confirmadas posteriormente. Así por ejemplo, nuestros estudios demostraron que la estimulación de los receptores para GABA en los macrófagos reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias (Reyes García *et al.*, 2007), mientras otros autores comprobaron que, en el caso de los linfocitos T, el GABA reduce las reacciones inflamatorias que dependen de ellos (Tian *et al.*, 2004). Por esas dos razones se ha estudiado, en modelos animales, la posibilidad de que GABA atenúe el curso de varias enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2 ,

la artritis reumatoide inducida por el colágeno y la encefalomiелitis autoinmune experimental (Bhat *et al.*, 2009).

Se han realizado varios experimentos para conocer los mecanismos por los cuales el GABA influye sobre la respuesta inflamatoria que depende de los linfocitos T y macrófagos. Hasta ahora parece evidente, en el caso de los macrófagos y según resultados que todavía no publicamos, que el GABA influye sobre la expresión de los receptores TLR en los macrófagos estimulados por endotoxinas y que existe una correlación entre ese efecto y la disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias. En el caso de los linfocitos, se han encontrado pruebas de que el efecto inmunomodulador del GABA se lleva a cabo a través de un aumento en la actividad de los linfocitos T reguladores. Nosotros demostramos la disminución de las citocinas responsables de la inflamación (Reyes-García *et al.*, 2007) y trabajamos sobre la expresión de los diferentes TLR, mientras Tian y otros autores (2011) encontraron que el GABA aumentaba la población de los linfocitos T reguladores que están encargados de suprimir las respuestas inflamatorias del sistema inmune.

Los resultados iniciales habían probado que el GABA es un modulador de la actividad citotóxica de los linfocitos T (Bjurstöm *et al.*, 2008). Pero en otros experimentos se pudo demostrar que, en los ratones C57BL/6 a los cuales se les daba a beber agua que contenía GABA (2 mg/ml) durante 4 semanas, se observa un aumento significativo ($P < 0.01$) en la cantidad de linfocitos T reguladores esplénicos CD4, Foxp3+, así como una reducción del tejido adiposo y de la infiltración del mismo por los macrófagos (Tian *et al.*, 2011). De este modo, los resultados obtenidos han permitido sugerir que el GABA puede ser utilizado como un medicamento anti-inflamatorio complementario en algunas enfermedades degenerativas de evolución crónica.

Por otra parte, nosotros también hemos explorado la posibilidad de que la inhibición de las reacciones inflamatorias represente un riesgo y facilite la invasividad oportunista de algunos microorganismos comensales, como la

Candida albicans. Nuestros resultados (Reyes-García *et al.*, 2012) no permiten hasta ahora sostener con certeza esta hipótesis. Sin embargo, nuestros experimentos han mostrado que *in vitro*, cuando la *Candida albicans* se cultiva en un medio que contiene GABA, la presencia del neurotransmisor aumenta al menos dos parámetros utilizados frecuentemente para medir su virulencia, como la formación de tubos germinativos y la expresión del mRNA de la fosfolipasa B. Todo esto sugiere que todavía no está completa la información sobre la influencia del GABA como un neuroinmunomodulador, su potencial terapéutico y los riesgos que implica su administración durante periodos prolongados.

IV OBJETIVOS

1. Objetivo principal

Conocer los efectos que tiene la administración exógena de GABA sobre las cantidades de linfocitos Treg CD4/CD25/Foxp3 esplénicos y sobre la susceptibilidad del animal para desarrollar una candidosis en ratones.

2. Objetivos particulares

- a. Establecer las condiciones de aislamiento, crecimiento, inoculación y virulencia de la cepa de *Candida albicans* que se va a utilizar.
- b. Estandarizar un modelo de infección experimental por *Candida albicans* en ratones CD1.
- c. Conocer la dosis de GABA que puede influir sobre el desarrollo de la candidiasis experimental en el ratón.

- d. Estandarizar las diluciones de los antisueros conjugados que se van a utilizar para teñir los linfocitos esplénicos de los ratones.

V HIPÓTESIS

La administración exógena de GABA debe aumentar las cantidades de linfocitos Treg, los cuales tienen un efecto supresor sobre la respuesta específica del sistema inmune y sobre la actividad fagocítica inespecífica de los macrófagos. Por consiguiente, los ratones tratados con GABA e infectados con *Candida albicans* deben tener aumentadas sus cantidades de linfocitos Treg y van a formar múltiples abscesos peritoneales que contienen el hongo.

VI MATERIAL Y MÉTODOS.

1.- *Candida albicans*.

La cepa de *Candida albicans* utilizada en este trabajo (FM910, recalcitrante) se obtuvo de un aislado clínico proveniente de un paciente; se identificó previamente mediante tinciones en fresco con azul de lactofenol y de Gram, filamentación en suero humano, producción de clamidoconidios y pruebas bioquímica, manteniéndola conservada en aceite mineral. Esta cepa fue proporcionada por la Dra. Francisca Hernández Hernández del Laboratorio de Micología Médica en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. Una alícuota de la cepa se cultivó en medio agar dextrosa Sabouraud por 24 horas a 37°C y la pureza del cultivo se comprobó mediante tinción al fresco con azul de lactofenol y tinción de Gram. Luego se resuspendió en solución salina isotónica, para ajustarla a 1×10^9 levaduras, según

la escala 5 de McFarlan. De esta suspensión se hizo una segunda dilución en SSI para obtener una concentración final de 1×10^8 células/ml y 100 μ l de ella fue utilizada para inocular a los ratones.

2. Ratones.

Se utilizaron 2 lotes de 20 ratones CD1, machos, entre 6 y 8 semanas de edad, con un peso aproximado de 25 gramos, adquiridos en Harlan Laboratories Mexico. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, con comida y agua *ad libitum* y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se revisaron diario para comprobar que estuvieran sanos durante el experimento, eliminando cualquier ratón con síntomas de enfermedad.

3.- Inoculación del hongo

Los ratones fueron separados en 4 grupos, según el tratamiento recibido. Los animales del grupo I recibieron 4 dosis de la suspensión de CA (en los días 2, 5, 9 y 12 del experimento) más 10 dosis de GABA (en los días 1 a 5 y del 8 al 12), vía IP. Los del grupo II solo recibieron la levadura; los del grupo III recibieron solo el tratamiento con GABA y los del grupo IV no recibieron tratamiento.

4.- Dosis de GABA

El aminoácido GABA (Sigma-Aldrich, México) se disolvió en PBS estéril a una concentración de 50 mM. Ella, se diluyó a 17.4 mM y 14.9 mM para poner una dosis de 500 mg/kg (100 μ l) que se inyectó a los ratones, por vía IP, durante los días 1 a 5 y 8 a 12 del experimento.

5.- Obtención del bazo.

Todos los ratones fueron sacrificados a los 15 días de iniciado el experimento, para extraerles el bazo, separar sus linfocitos y usarlos en la citometría de flujo. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se sumergieron en alcohol al 70% y se llevaron a la campana de flujo laminar. Ahí, se les abrió el abdomen y se exploró el peritoneo en busca de abscesos antes de diseccionar el bazo. Después de obtener este órgano, se colocó en hielo para profundirlo con 5 ml de PBS enfriada. Las células se recolectaron con la misma jeringa usada durante la perfusión y se pasaron a un tubo de 15 ml que contenía una malla de organza. Después de filtrar las células, se lavaron 2 veces en PBS centrifugándolas a 2,000 rpm x 5 min a 4°C. Finalmente se resuspendieron en 1 ml de PBS.

6.- Cuenta y ajuste celular.

Una alícuota de la suspensión de las células del bazo (20 μ l) se mezcló 1:2 con azul tripano y luego se pasó la mezcla a una cámara de Neubauer. Las células viables se contaron, por duplicado, en 6 campos distintos usando un microscopio invertido, con el objetivo de 40X. Se calculó el volumen que contenía 500,000 linfocitos, se tomó ese volumen necesario de la suspensión celular y se adicionó en los viales correspondientes para su tinción, ajustando el volumen final a 25 μ l.

7.- Tinción de los linfocitos.

La tinción de los marcadores de superficie e intracelulares de los linfocitos T reguladores obtenidos del bazo de los ratones CD1 se hizo con anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos que identifican CD4, CD25 y el factor de transcripción Foxp3 de ratón, utilizando un kit comercial (Biolegend). Para la tinción de CD4 y CD25 se usó un coctel de 2 anticuerpos marcados con alofococianina (APC) y ficoeritrina (PE), respectivamente. Tres microlitros de la mezcla de anticuerpos se disolvieron en 50 μ l totales de solución de tinción y 25

□l de ella se adicionaron a cada vial que contenía los linfocitos del bazo. La suspensión se agitó manualmente y se incubó durante 20 minutos en la oscuridad. Enseguida, se lavaron las células con 500 □l de solución de tinción, centrifugando a 2,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y retirando el sobrenadante (SN).

Para la tinción de Foxp3, las células ya tenidas en su superficie recibieron 500 □l de solución de fijación/permeabilización y se incubaron a 20 minutos en la oscuridad; se centrifugaron a 2,000 rpm y se les retiro el SN. A continuación, se lavaron con 500 □l de solución de tinción, centrifugando como antes, retirando nuevamente el sobrenadante. Luego se lavaron con 500 □l de solución de permeabilización, lavando como ya se indicó. En seguida, se resuspendieron en 100 □l de solución de permeabilización, incubando en la oscuridad durante 15 min, quitando SN y resuspendiéndolas en 100 □l de solución de permeabilización. Después, se les adicionaron los 25 µl de solución de anticuerpo anti Foxp3, marcado con Alexa Fluor 488 y se incubaron en la oscuridad durante 30 min. Se lavaron 2 veces con solución de tinción, como arriba. Finalmente, las células se resuspendieron y se les agregaron 200 □l de solución de fijación, se taparon con papel aluminio y se guardaron en refrigeración hasta leer su fluorescencia en el citómetro de flujo (3 días después).

8.- Lectura de la fluorescencia.

La fluorescencia sobre la membrana e intracelular de CD4, CD25 y Foxp3 en los linfocitos esplénicos de los 4 grupos de animales se hizo utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur y el programa Cell Quest, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Para ello, se usaron como controles negativos linfocitos del bazo de ratones sin tratamiento, como controles positivos otra alícuota de esos mismos linfocitos teñidos con CD4, CD25 y Foxp3. Los linfocitos de los otros grupos experimentales, teñidos en la misma forma, se adquirieron después, durante cada experimento. Primero, los linfocitos se excitaron con el laser azul y el violeta y se ajustó su fluorescencia y su ubicación

en el cuadrante negativo, midiendo la difracción de la fluorescencia (forward scatter, FSC) y la reflexión de la luz (side scatter, SSC) de cada laser. En seguida se ajustaron la fluorescencia y la posición de las células positivas, compensando las fluorescencias que se solapan, mediante los canales FL4 (CD4), FL2 (CD25) y FL3 (Foxp3) y se adquirieron las fluorescencias respectivas.

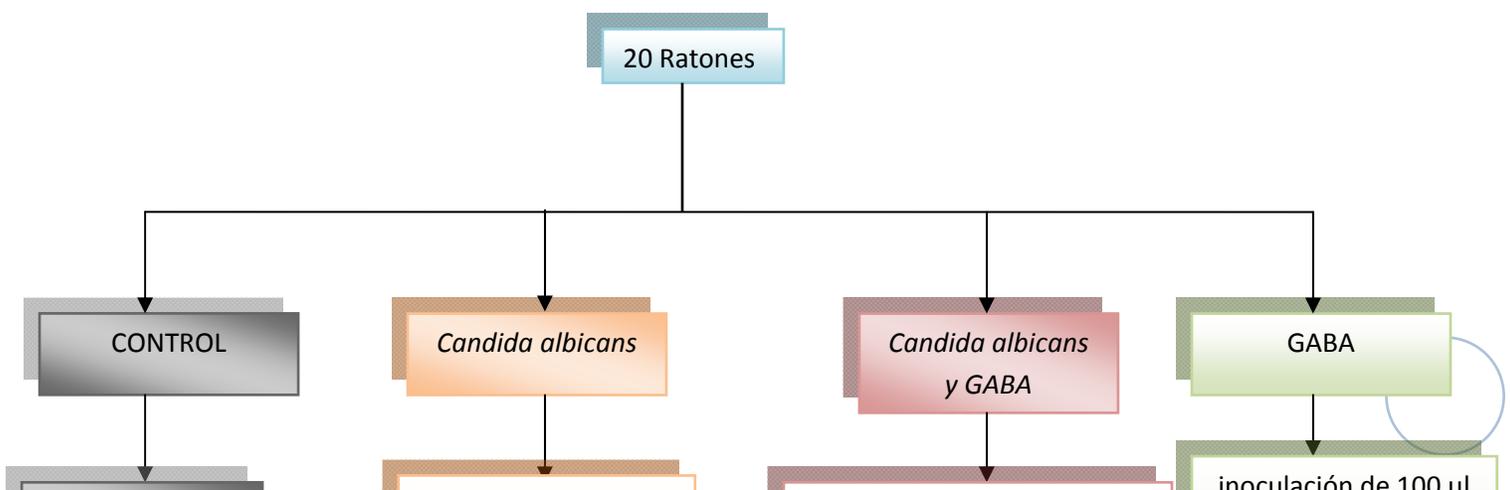
3.- Análisis de resultados.

Los resultados de la fluorescencia obtenida en cada muestra se analizaron con el programa Flowjo, versión 8.7, midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada fluorocromo.

10.- Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos con el programa FlowJo de cada muestra de linfocitos se analizaron con el programa Prism version 5.0 (San Diego, CA, USA) y la prueba estadística de Anova de una vía. La significancia estadística se estableció en $p < 0.05$.

VII DISEÑO EXPERIMENTAL



VIII RESULTADOS

i) Abscesos

Después del sacrificio de cada grupo de ratones se observó el peritoneo y la cavidad peritoneal en busca de diseminación de blastoconidios en forma de abscesos. La figura 5 muestra una sola fotografía del abdomen de los ratones de los 4 grupos. Los abscesos se encontraron tanto en el peritoneo (Fig.5D) como en el hígado (Fig. 6A), bazo y riñón de la cavidad peritoneal, únicamente en los

ratones que habían recibido las inyecciones de *Candida albicans* y simultáneamente habían sido tratados con GABA. No hubo abscesos en pulmones ni en cerebro. De los abscesos obtenidos se tomaron muestras para una tinción de Gram y también se hicieron retrocultivos en agar Dextrosa Sabouraud, los cuales mostraron que no había crecimiento *Candida albicans*. Las colonias obtenidas en el agar fueron blancas, convexas, opacas y de diferentes tamaños (Fig.6B), con presencia de Blastoconidios unicelulares Gram+ (Fig. 6C). Además, se hicieron cultivos de los abscesos en suero humano a 37 °C durante 3 horas, los cuales demostraron que los abscesos contenían la misma *Candida albicans* que había sido inyectada al ratón (Fig. 6D).

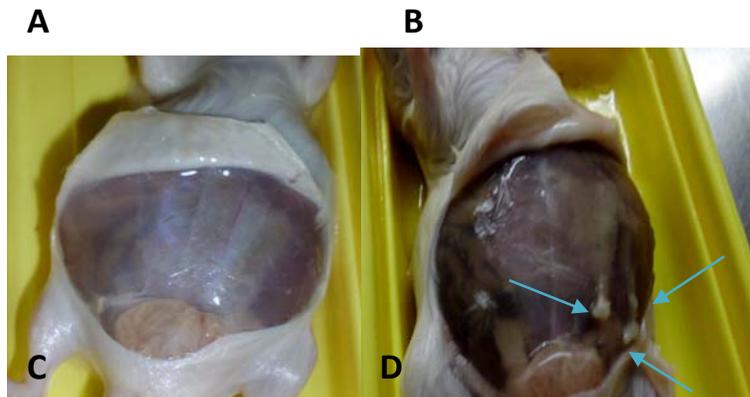


Figura 5. Los 4 paneles muestran fotografías del peritoneo de algunos ratones. En el cuadro A se muestra el de un ratón sin tratamiento, es decir un control negativo. En el Cuadro B se muestra al peritoneo de un ratón que fue tratado solamente con GABA, el cual se ve aparentemente sano y no tiene úlceras ni abscesos. En el Cuadro C se muestra al peritoneo de un ratón tratado únicamente con *Candida albicans* y se puede observar que no tiene ni un absceso provocado por la levadura. Finalmente en el Cuadro D se muestra el peritoneo de un ratón tratado con C.

albicans + GABA, el cual muestra evidencia de los abscesos que fueron estudiados posteriormente.

ii) **Retrocultivos**

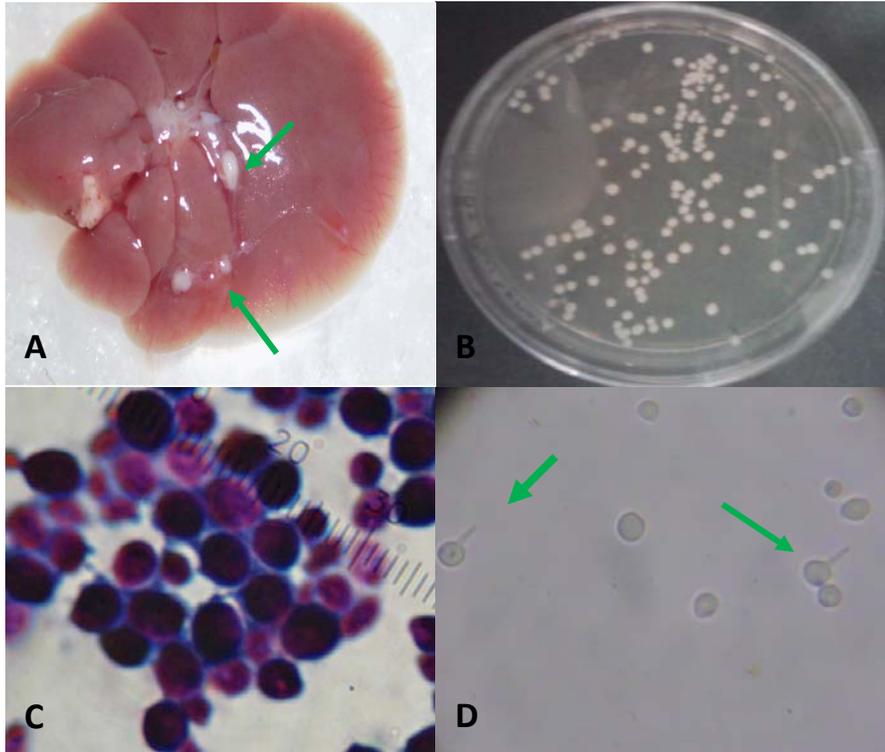


Figura 6. Panel de imágenes sobre el efecto que produjo GABA al facilitar la aparición de una Candidosis diseminada. En A se muestra la aparición de abscesos en el hígado. B retrocultivo del líquido del absceso. C muestra por tinción de Gram y D la presencia de tubos germinativos.

iii) **Fluorescencia en los linfocitos del bazo**

a) **CD4+/CD25+**

Las medidas de la fluorescencia media (IMF) de las poblaciones de linfocitos T CD4+ que expresaron CD25 sobre la membrana aparecen en la Fig. 7 y en la Tabla 1 siguientes. Los valores de la media, error estándar y desviación estándar de estas mismas marcas se incluyen en la Tabla 2. Los valores de IMF mostraron que solamente cuando se administró GABA a los ratones infectados con *Candida albicans* se observó un aumento significativo de los linfocitos Treg CD4+ CD25+.

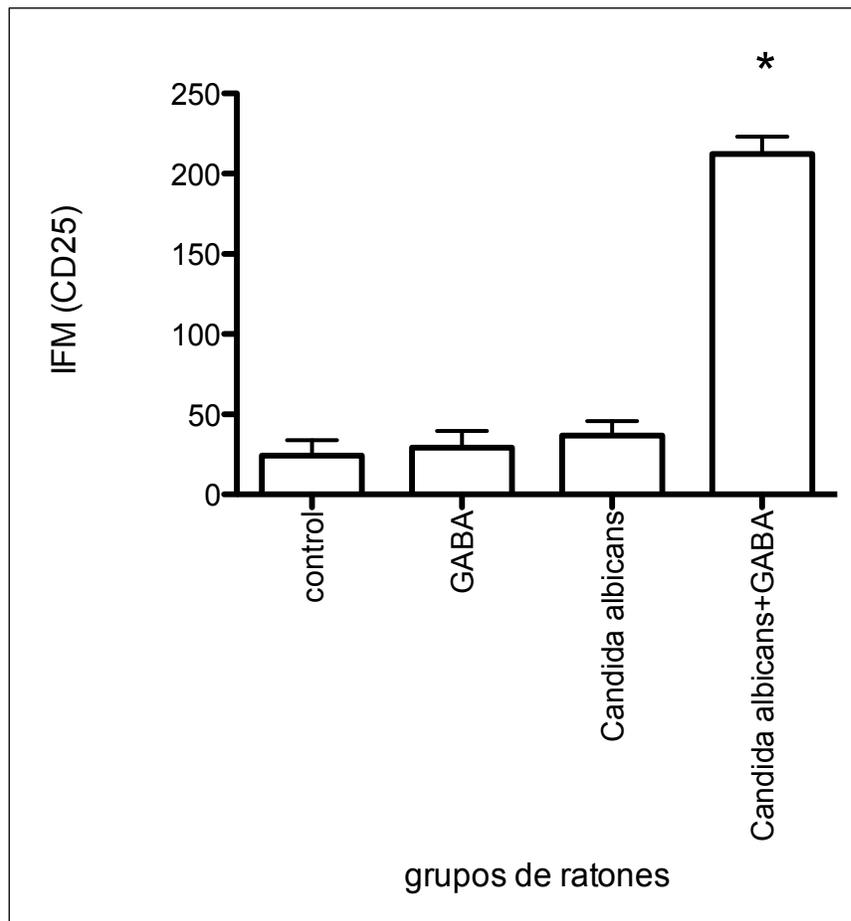


Figura 7. Media y error estándar de los IMF de los linfocitos T CD25+.

* = $p < 0.0001$.

Tabla 1. Valores del IFM en los linfocitos T del bazo CD4+/CD25+

No.	CONTROL	GABA	CANDIDA	CANDIDA + GABA
1	22.5	18.9	58.3	190
2	23.9	16.5	68.3	224
3	12.3	8.9	35.9	186
4	8.35	80	27.6	192
5	8.14	24.7	14.8	233
6	70	26.1	15.5	249

Tabla 2. Media, error estándar y desviación estándar de la fluorescencia de los linfocitos esplénicos CD4+/CD25+.

	CONTROL	GABA	CANDIDA	CANDIDA + GABA
Media	24.18	29.18	36.73	212.3
Error estándar	9.58	10.47	9.08	10.82
Desviación estándar	23.47	25.65	22.26	26.51

b) **Foxp3+**

Las medidas de la fluorescencia media (IMF) de las poblaciones de linfocitos T CD4+ que expresaron el Factor de Transcripción Foxp3 en el citoplasma aparecen en la Fig. 8 y en la Tabla 3 siguientes. Los valores de la media, del error estándar y la desviación estándar del marcaje con Foxp3 se presentan en la Tabla 4. Muestran que solamente cuando se administró GABA a los ratones infectados con la *Candida albicans* se observó un aumento significativo de los linfocitos Treg CD4+ Foxp3+.

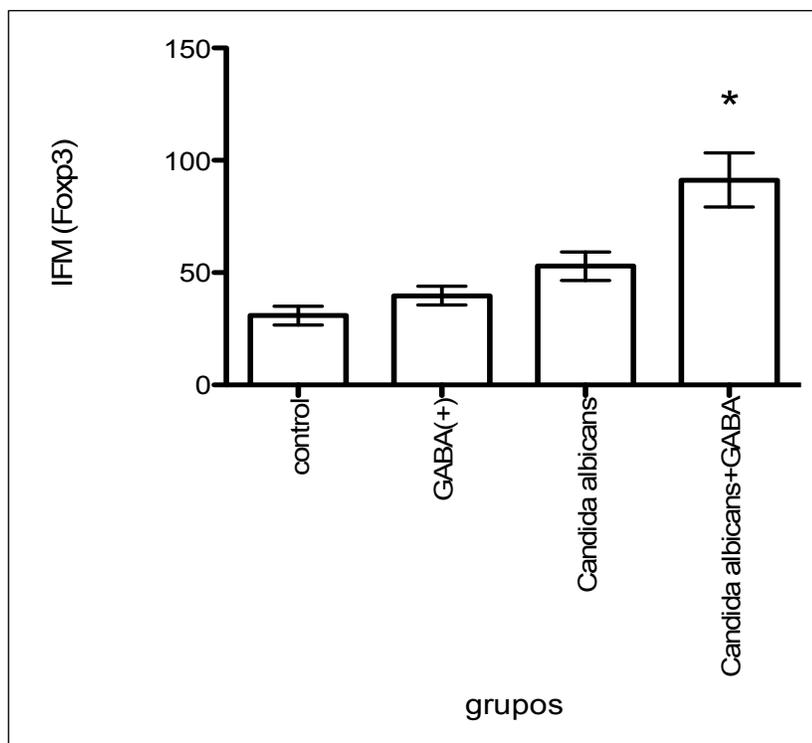


Figura 8. Media y error estándar de los IMF de los linfocitos T Foxp3+.

* = $p < 0.0001$.

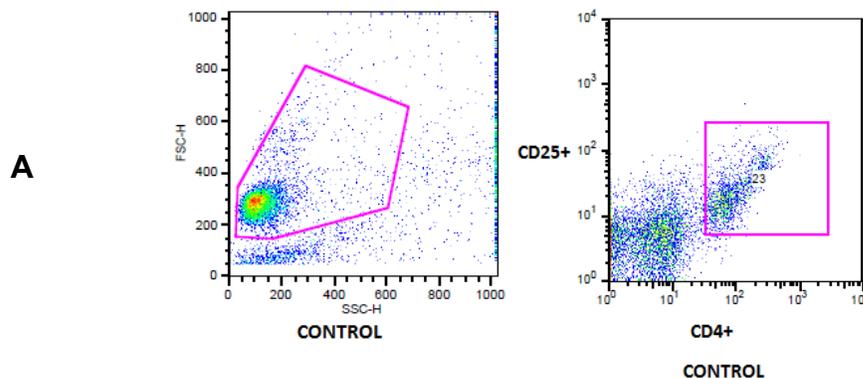
Tabla 3. Valores del IFM de Foxp3 en los linfocitos T del bazo

No.	CONTROL	GABA	CA	CA + GABA
1	16.2	37.2	46.7	42.1
2	29.8	36.5	34.5	90.3
3	27.6	29.9	46.4	96.7
4	44.3	30.3	59.8	110
5	40.5	54.7	50.4	129
6	26.9	49.6	79.6	79.1

Tabla 4. Valores de la media, error estándar y desviación estándar de la IFM de Foxp3.

	CONTROL	GABA	CANDIDA	CA + GABA
MEDIA	30.88	39.70	52.90	91.20
EE	4.15	4.18	6.29	12.07
DE	10.16	10.24	15.40	29.57

Linfocitos población total y dobles positivos CD4+ CD25+.



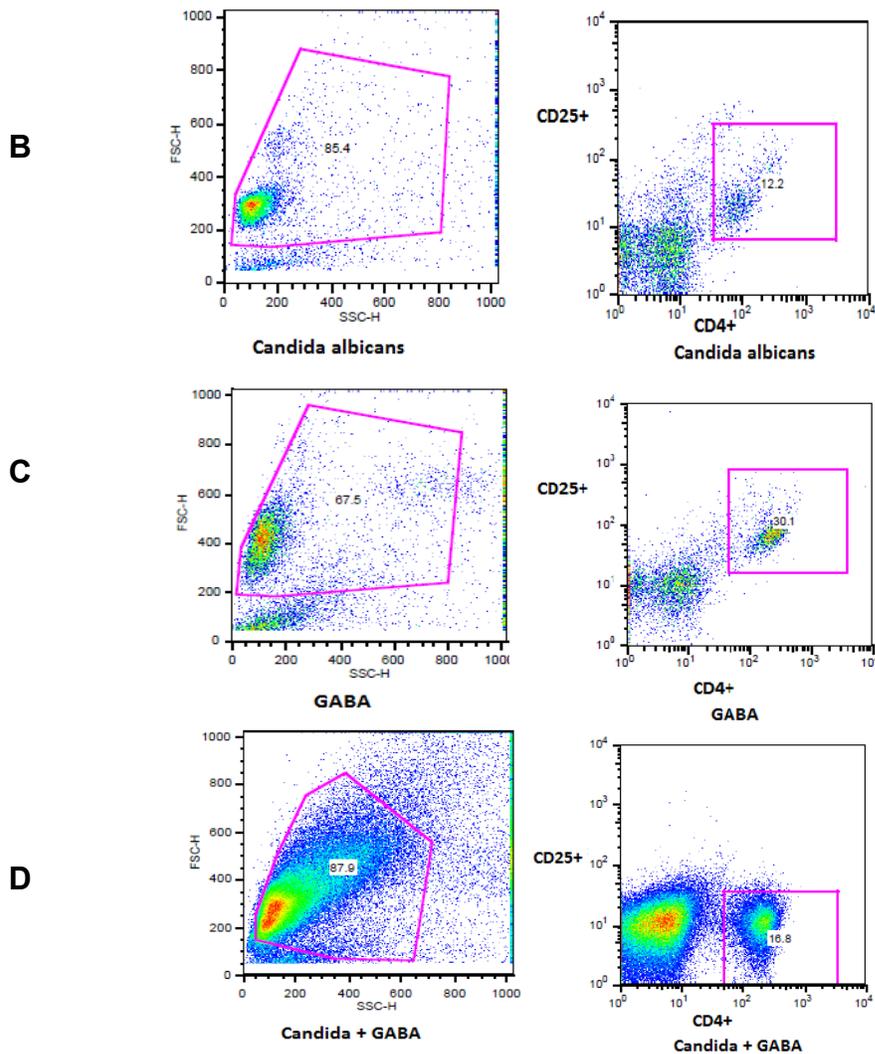
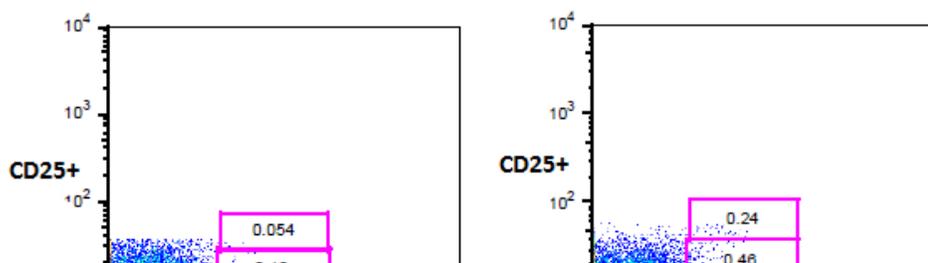


Figura 9. En el panel anterior se muestran los gráficos de citometría realizados, en el cual se observa como varía el número de linfocitos CD4+CD25+, de acuerdo al tratamiento que recibe cada grupo de los ratones. La población más grande de linfocitos doble positivos se encontró en los cuadrantes A y C, recordando así que los linfocitos maduros siempre expresan su proteína de superficie CD4, mientras que CD25+ es un receptor transmembranal de tipo I, presente en células Treg activadas.

Triples positivos CD4+CD25+FOXP3



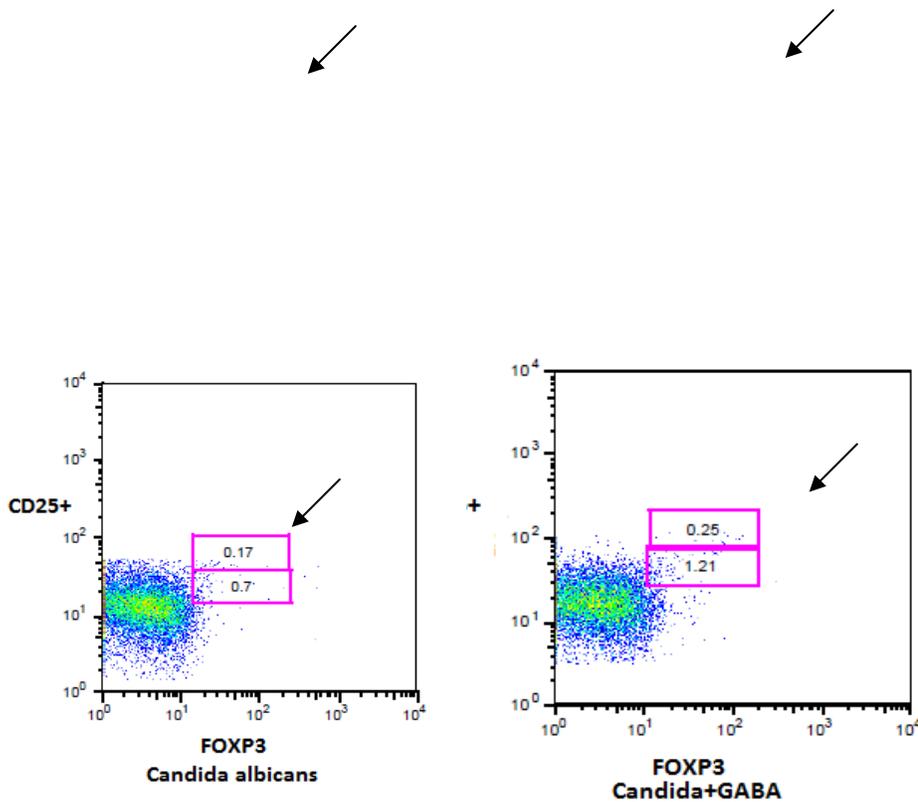
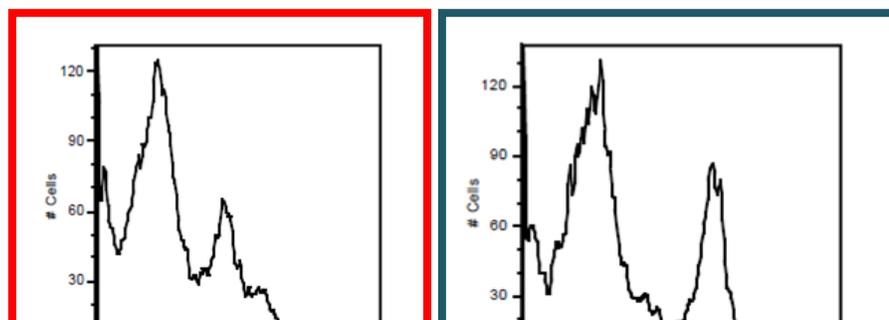


Figura 10. En el panel anterior se muestran cuatro dotplots provenientes de una tinción tiple positiva, para obtener el fenotipo exacto de los linfocitos Treg. La tinción consistió en el uso de tres marcadores, de los cuales dos fueron membranales (CD4+ y CD25+) y uno intracelular (Foxp3). La expresión de FOXP3 high se requiere para el desarrollo de células T reguladoras ya que controla específicamente este destino celular. Se puede apreciar que existen diferencias entre las poblaciones de linfocitos Treg según los diversos tratamientos que recibieron los ratones.

Histogramas Foxp3



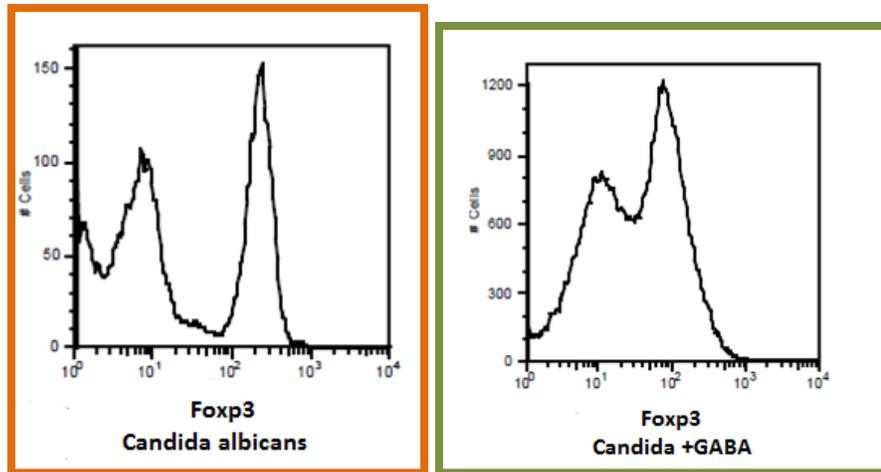


Figura 11. Histogramas de la expresión de Foxp3 en linfocitos esplénicos hecho a partir de la región positiva para CD4+ CD25+ tomando en cuenta todas las células dobles positivas del dotplot. La línea horizontal representa la región positiva de cada histograma, en rojo se marca el grupo control, en azul el grupo GABA, en naranja el grupo *Candida albicans* y en verde el grupo de *Candida + GABA*. Los grupos experimentales se ven desplazados hacia la derecha con respecto al grupo control, lo cual indica un aumento en la expresión de FOXP3; cabe señalar que el grupo más positivo a Foxp3 es el grupo *Candida albicans*, aunque el grupo que aumenta más el número de células positivas para Foxp3 es el de *Candida + GABA*.

Evaluación del inmunofenotipo de linfocitos T reguladores.

Después de evaluar la expresión de CD4+ CD25+ en las células esplénicas e identificar el cambio en las subpoblaciones de las mismas en los diversos

tratamientos, se evaluó la expresión del factor de transcripción Foxp3. En todos los análisis realizados se estudió la población de los linfocitos control contra los 3 grupos de tratamiento. Cuando evaluamos la expresión del gen Foxp3 en condiciones basales (sin ningún tratamiento), el Factor Foxp3 tiene una expresión reducida en las poblaciones y más fuertemente expresada en el tratamiento de *C. albicans* + GABA; sin embargo, este patrón de expresión se modifica en cada uno de los tratamientos.

IX ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

i) Resultados del análisis de varianza de una vía y prueba de Dunnett para los IFM de los linfocitos CD25+.

One-way analysis of variance (IMF – CD25)				
P value	< 0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	4			
F	83.11			
R squared	0.9257			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	0.1766			
P value	0.9813			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			

ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	150000	3	50010	
Residual (within columns)	12040	20	601.8	
Total	162100	23		
Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	
control vs GABA	-5.000	0.3530	No	
control vs <i>Candida albicans</i>	-12.55	0.8861	No	
control vs <i>Candida albicans</i> +GABA	-188.2	13.28	Yes	

ii) Resultados del análisis de varianza de una vía y prueba de Dunnett para los IFM de los linfocitos Foxp3+.

One-way analysis of variance (IMF-Foxp3)					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				

Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	12.88				
R squared	0.6589				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	7.679				
P value	0.0531				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	12740	3	4247		
Residual (within columns)	6596	20	329.8		
Total	19340	23			
Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant P < 0.05	Summary	
control vs GABA(+)	-8.817	0.8409	No	ns	
control vs <i>Candida albicans</i>	-22.02	2.100	No	ns	
control vs <i>Candida albicans</i> +GABA	-60.32	5.753	Yes	***	.

X DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Al comparar los resultados del presente trabajo con los que han sido reportados previamente por otros autores, se puede observar que algunos de ellos coinciden y otros son diferentes. Las diferencias seguramente dependen de las desigualdades en los modelos experimentales utilizados. Los experimentos *in vivo* sobre animales de diferentes especies, género y edad, son tan comunes como los experimentos *in vitro* sobre células cultivadas. También existen diferencias en las dosis y los tiempos de exposición a *Candida albicans*. Por otra parte, algunos de nuestros experimentos son originales y no existen antecedentes sobre ellos, como es el caso del efecto del GABA como un facilitador de la formación de abscesos por un hongo oportunista como *Candida albicans*.

Los resultados muestran claramente como los ratones que durante dos semanas recibieron simultáneamente *Candida albicans* y GABA, tienen un aumento significativo en la fluorescencia específica que depende de los anticuerpos anti-CD25 y anti-Foxp3 de los linfocitos T CD4 que fueron obtenidos del bazo. Las células que expresaban estos marcadores fueron calificadas como linfocitos Treg supresores de la inmunidad específica (Schmidt et al., 2012).

Sin embargo, no se pudo observar, como se esperaba, que esas mismas subpoblaciones de linfocitos T también aumentarían significativamente en los animales inyectados solamente con GABA o solamente con blastoconidios de *Candida albicans*. Nuestros resultados solo revelan un aumento moderado de los mismos cuando los ratones se encuentran en esas condiciones experimentales, mientras que la literatura consultada refiere que tanto GABA como la infección por *Candida albicans* provocan por sí solas un aumento franco de los linfocitos Treg. Es posible que la administración de dosis más elevadas de GABA puedan incrementar los valores obtenidos con el presente modelo experimental.

Nuestros experimentos preliminares, para deprimir la inmunidad de los ratones mediante la inyección de varias dosis de dexametasona, no facilitaron la diseminación de los blastoconidios inyectados en el peritoneo. No hubo formación de abscesos ni fueron positivos los retrocultivos del líquido peritoneal o de extractos de órganos. En cambio, resultó una sorpresa porque no había publicaciones al respecto, que la administración de GABA permitiera la conversión de las levaduras comensales en hongos invasivos oportunistas que provocaban la formación de abscesos. Es posible que el efecto inmunosupresor provocado por el aumento de los linfocitos Treg haya sido potenciado por las dosis de GABA administradas, cuyo efecto inhibitor de la inmunidad ya ha sido reportado por otros autores.

El debilitamiento de la fagocitosis y de la respuesta inmune a causa las citocinas producidas por los Treg y por las dosis de GABA administradas pudo facilitar la invasividad del hongo y la formación de los abscesos. No obstante,

llamó la atención que todos esos animales con abscesos peritoneales no perdieron peso y mostraban la apariencia clínica de estar sanos. Es probable que la actividad inhibidora de la inmunidad haya reducido la cantidad de los linfocitos pro-inflamatorios TH17. Sin embargo, también es necesario investigar a fondo el estado de los macrófagos peritoneales en los animales sometidos a estas mismas condiciones experimentales. En este sentido, nosotros estamos estudiando las muestras de los macrófagos obtenidos de estos animales, cuyos resultados son parte del proyecto original, mucho más amplio que el de esta tesis.

Algunos resultados de trabajos realizados *in vitro* realizados por otros autores no coinciden con nuestra hipótesis porque muestran el efecto promotor de los Treg sobre la respuesta defensiva que depende de Th17 (Pandiyan *et al.*, 2011). Otros (Marijnissen *et al.*, 2012) señalan que *Candida albicans* polariza hacia Th17 la respuesta de los linfocitos Treg/Th17 y que esto agrava las lesiones por hipersensibilidad en algunos modelos animales. Pero otros autores presentan puntos de vista diferentes. Así por ejemplo, van de Veerdonk *et al.*, (2010) concluyen que la población de linfocitos Treg se expande en las infecciones e inhibe o suprime las respuestas pro- inflamatorias TH1 y Th17. La observación anterior les permitió sugerir que, por una parte, los linfocitos Treg disminuyen la capacidad del sistema inmune para controlar la infección por *Candida albicans* pero que, por el otro lado, los Treg aumentan la resistencia del hospedero a la re-infección.

Como se puede deducir de las diferencias entre todos los comentarios anteriores, todavía existen controversias respecto a las proporciones y las funciones de los linfocitos Treg en el animal inyectado con *Candida albicans* solamente. Las discrepancias entre los resultados mencionados apoyan la importancia de nuestro estudio.

No obstante, se debe aceptar que, en estos últimos cinco años, el mejor conocimiento de las bases moleculares de la respuesta defensiva contra la *Candida albicans* han convertido este tema en un capítulo sumamente complejo

de las relaciones entre los hospederos y sus hongos oportunistas (actualmente *Candida albicans* se considera patógeno primario). Esto es particularmente cierto cuando se tiene en cuenta la influencia de factores inespecíficos como la fagocitosis por los neutrófilos (Destin *et al.*, 2009), las citocinas producidas por las subpoblaciones de macrófagos M1 y M2 (Lefevre *et al.*, 2010), la expresión de los receptores parecidos a Toll (Sutmuller *et al.*, 2006) y la participación de los inflammasomas (Tomalka *et al.*, 2011) en la defensa de las mucosas contra *Candida albicans*.

Es natural que la diversidad de los comentarios anteriores desborde los objetivos del presente trabajo. Pero al mismo tiempo, exige darle una continuidad a esta línea de investigación. Aunque desde su inicio se propuso el desarrollo de experimentos con diversas variables, los resultados de unos pocos experimentos no pueden contestar tantas preguntas.

Después de analizar los resultados obtenidos hasta ahora es necesario diseñar nuevos experimentos para obtener una visión más amplia de los cambios que deben ocurrir entre los mecanismos defensivos específicos e inespecíficos en el curso de las infecciones. Más importante aún es el estudio de las interacciones neuro-inmunológica para sostener el equilibrio entre las respuestas pro- y anti-inflamatorias en el curso de la candidiasis. Esas interacciones son fundamentales tanto para sostener la coexistencia con los comensales como para re-ajustar la homeostasis y asegurar la sobrevivencia aún cuando el hospedero sea invadido por oportunistas.

Los promedios de células Treg en los tres grupos restantes, incluyendo los animales sanos, fueron valores inferiores y muy similares. Así que nuestros resultados sugieren que, de alguna manera, el neurotransmisor utilizado estimula la proporción de linfocitos Treg. Nosotros no exploramos en este trabajo el estado de los linfocitos pro-inflamatorios Th17 ni de los macrófagos, pero por la bibliografía consultada, se puede suponer que la actividad de ellos estuvo reducida (Awasthi , Kuchroo, 2009).

El aumento de las Treg observado en los animales inoculados con *Candida albicans* más el tratamiento con GABA son factores que rompen el equilibrio que normalmente debe existir entre los comensales y sus hospederos. Trabajos recientes (Rowe *et al.*, 2011) han explorado esta situación al estudiar la susceptibilidad a patógenos intracelulares en un modelo de ratonas embarazadas que, fisiológicamente, tienen aumentada la población de sus linfocitos Treg. Los resultados confirmaron que la expansión de las cantidades de linfocitos Treg Foxp3+ a causa del embarazo aumenta la susceptibilidad a las infecciones diseminadas por *Listeria*. Los resultados son una muestra de lo delicado que debe ser el trabajo supresor de las Treg para mantener la homeostasis, ya que si bien el aumento de las Treg es un riesgo por la susceptibilidad a las infecciones, por otro lado ese mismo aumento es necesario para mantener la tolerancia inmune a los antígenos fetales. Cuando experimentalmente se llega a detener esa expansión, se tiene el riesgo de abortos espontáneos o pre-eclampsia (Santner-Nanan *et al.*, 2009).

Aunque no existe literatura al respecto, se puede sugerir que las Treg sostienen un balance similar que permite la convivencia entre los hongos comensales y el hospedero. Creemos que la administración del GABA puede ser un factor que altera ese equilibrio y facilita la invasividad del hongo. En favor de este punto de vista están nuestros resultados que revelan la formación de abscesos en los animales inoculados con *Candida albicans* que simultáneamente recibieron GABA. Los cultivos del líquido de los abscesos fueron positivos y permitieron recuperar Blastoconidios y pseudohifas iguales a las que habían sido inyectadas.

Existen numerosos ejemplos de ese trabajo modulador de los linfocitos Treg y de los riesgos que se presentan cuando su número se eleva, aún cuando esto suceda en condiciones fisiológicas o lleve asociados beneficios para la salud del hospedero. Así por ejemplo, se puede mencionar los resultados recientes de Zhang y colaboradores (Zhang *et al.*, 2011) sobre niños en los cuales es común la presencia de *Pneumococcus* en la nasofaringe y que ellos continúen siendo portadores de los mismos durante largos periodos de tiempo. En esos niños se

propone que el aumento en la cantidad de los linfocitos Treg supresores de la inmunidad es un factor que impide las reacciones inflamatorias relacionadas al daño tisular y la autoinmunidad, aunque también contribuye a mantener la cronicidad de la infección.

Trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio utilizando cultivos de macrófagos a los cuales se les adiciona GABA (Reyes-García *et al.*, 2007) han mostrado que el neurotransmisor disminuye la capacidad de los macrófagos para producir interleucinas pro-inflamatorias. GABA ha sido propuesto como parte de un sistema GABAnergico autónomo que tienen los macrófagos para modular negativamente sus respuestas pro-inflamatorias (Reyes-García y Garcia-Tamayo, 2009). Estos resultados permiten sugerir que GABA puede promover el predominio de las subpoblaciones de macrófagos M2, los cuales tienen una actividad anti-inflamatoria para facilitar la reparación de los tejidos que han sido dañados por infecciones.

Si se acepta que las infecciones (candidiasis, por ejemplo) implican una reacción inflamatoria que de una manera fisiológica estimula un incremento de linfocitos Treg como un mecanismo amortiguador, se debe pensar que el añadir experimentalmente el GABA a un animal de laboratorio o el administrarlo como tratamiento a una persona enferma va a potencializar la respuesta fisiológica de los Treg. Esta situación puede agravar la supresión de la respuesta inmune. En los resultados, la suma de esos dos factores inhibidores provocó la formación de múltiples abscesos que contenían *Candida albicans*, pero los animales no estaban en malas condiciones y no murieron durante el experimento, lo cual hace pensar que debe existir un mecanismo amortiguador alterno probablemente apoyado por la interrelación Treg/Th17.

Los resultados presentados en la bibliografía consultada se pueden relacionar con los del presente trabajo experimental. El aumento observado en la subpoblación de los linfocitos Treg implica un aumento paralelo en la producción de las citocinas TGF- β e IL-10. En los animales que recibieron GABA y estaban

infectados por *Candida albicans*, esas citocinas son las responsables de estimular el predominio de los macrófagos M2 que tienen una actividad anti-inflamatoria. Nosotros sugerimos que éste puede haber sido la situación de los ratones de nuestro experimento, que mostraron la expansión de las cantidades de Treg y de la colonización de tejidos sanos por *Candida albicans*, aunque ninguno de ellos mostró síntomas de inflamación ni pérdida de peso. Nuevamente mencionamos que es necesario investigar el grado en que el incremento de los Treg reduce la actividad de los linfocitos pro-inflamatorios Th17.

Los resultados obtenidos son originales y las discusiones que promueven pueden ser como una nueva ventana para analizar las relaciones hospedero-comensal en el marco de las relaciones neuro-inmunológicas. Sin embargo, hacen falta más estudios para aumentar nuestro conocimiento sobre la patogenicidad de *Candida albicans*. Nosotros trabajamos actualmente sobre esta línea de investigación con el objetivo a largo plazo de obtener resultados que, a través de la neuroinmunomodulación, nos permitan controlar la invasividad de las levaduras sin necesidad de atacarla con antimicóticos.

XI CONCLUSIONES

1. La administración simultánea de GABA y *Candida albicans* en ratones CD1 aumenta significativamente las cantidades de linfocitos esplénicos T CD4 que expresan CD25 y Foxp3.
2. En los ratones que recibieron solamente GABA o la *Candida albicans* sin ningún tratamiento asociado, los aumentos de los Treg no fueron significativos.

3. Todos los ratones que aumentaron sus cantidades de linfocitos Treg formaron abscesos en el hígado y en la cavidad peritoneal; las muestras tomadas de todos esos abscesos fueron positivas para *Candida albicans*.
4. Los animales con abscesos y los Treg aumentados se encontraron en buenas condiciones generales, sin pérdida de peso y sin señales de una reacción inflamatoria intensa.
5. Se sugiere que GABA puede modular las interacciones entre los mecanismos pro- y anti-inflamatorios. Son necesarios nuevos estudios para conocer el efecto de GABA sobre el equilibrio entre los linfocitos Treg/Th17 y las posibles ventajas que podría tener la administración de este neurotransmisor inhibitorio como un auxiliar terapéutico en los casos de candidiasis diseminada.

XII BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787–93.

Ader, R. (2003). Conditioned immunomodulation: Research needs and directions. *Brain, Behavior & Immunity*, 17, 51-57.

Ader R. Y Cohen N. (1975). Behaviorally conditioned immunopression. *Psychosomatic Medicine*, 37, 333-340.

Ader, R. Y Cohen N. (1993). Psychoneuroimmunology: Conditioning and stress. *Annual Review of Psychology*, 44, 53-85.

Ader, R.; Felten D. L. Y Cohen N. (2001). *Psychoneuroimmunology* (3rd ed.). San Diego, CA: Academic Press.

Algarra, I., Ortega, E., Serrano, M.J., Alvarez de Cienfuegos, G.Gaforio, J.J. (2002) Suppression of splenic macrophage *Candida albicans* phagocytosis following in vivo depletion of natural killer cells in immunocompetent BALB/c mice and T-cell-deficient nude mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 33, 159–163.

Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Natural Immunology*, 2, 675–680.

Arribas, J.R., Hernandez-Albujar, S., Gonzalez-Garcia, J.J., Pena, J.M., Gonzalez, A., Canedo, T., Madero, R., Vazquez, J.J. & Powderly, W.G. (2000) Impact of protease inhibitor therapy on HIV-related.

Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 2009, 21 : 489-498.

Akira Shizuo, Uematsu Satoshi, Takeuchi Osamu, Pathogen recognition and Innate immunity, 2006, *Cell*, Vol. 124, 783-801pp.

Ateman, A.; SINGH, A.; KRAL, T Y SOLOMON, S. (1989). The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrine Reviews* 10, 92-112.

Balish, E., Jensen, J., Warner, T., Brekke, J. & Leonard, B. (1993) Mucosal and disseminated candidiasis in gnotobiotic SCID mice. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 31, 143–154.

Banchereau, J. & Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245–252.

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Rev Immunol*. 2003, 3: 253-7.

Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: The third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:652–7

Beno, D.W., Stover, A.G. & Mathews, H.L. (1995) Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8+ lymphocytes. *Journal of Immunology*, 154, 5273–5281.

Bhattacharya Palash, Gopisetty Anupama, Ganesh Balaji B., Sheng Jian Rong, Prabhakar Bellur, GM-CSF-induced, bone-marrow-derived dendritic cell

Blalock, J.E. (1984) The immune system as a sensory organ. *Journal of Immunology* 132, 1067-1070.

Bovbjerg, D.H. (2003). Conditioning, cancer, and immune regulation. *Brain, Behavior & Immunity*, 17, 58-61.

Bower ,J.E.; Kemeny, M.E.; Taylor, S.E., Fahey, J.L. (2003). Finding positive meaning and its association with natural killer cell cytotoxicity among participants in a bereavement-related disclosure intervention. *Annals of Behavioral Medicine*, 25, 146-155.

Capuron, L. Y Dantzer, R. (2003). Cytokines and depression: The need for a new paradigm. *Brain, Behavior and Immunity*, 7, 119-124.

Can expand natural Tregs and induce adaptive Tregs by different mechanisms, 2011, *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 89, 235-249.

Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse *Trends Immunol.* 2004;25:323–7. 2.

Destin KG, Linden JR, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM. Oxidative burst and phagocytosis of neonatal neutrophils confronting *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Early Hum Dev* 2009, 85 : 531-535

Ellerbroek, P.M., Ulfman, L.H., Hoepelman, A.I. & Coenjaerts, F.E.(2004) riptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium. *Cell Microbiology*, 6, 581–592.

Farah, C.S., Elahi, S., Pang, G., Gotjamanos, T., Seymour, G.J., Clancy, R.L. & Ashman, R.B. (2001) T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. *Infection and Immunity*, 69, 6110–6118.

Farah, C.S., Elahi, S., Drysdale, K., Pang, G., Gotjamanos, T., Seymour, G.J., Clancy, R.L. & Ashman, R.B. (2002) Primary role for CD4(+) T lymphocytes in recovery from oropharyngeal candidiasis. *Infection and Immunity*, 70, 724–731

Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, *et al.* Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2004,199: 303–13. 30

Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol.* 2000;165: 6107–15.

Gangi Eryn, Vasu Chenthamarakshan, Cheatem Donald, Prabhakar Bellur S., IL-10 producing CD4+CD25+ regulatory T cells play a critical role in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced suppression of experimental autoimmune thyroiditis, 2005, The Journal of Immunology, Vol. 174, 7006-7013.

Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. Nat Immunol. 2003;4:337–42. 31.

Kroetz*† and George S. Deepe Jr. CCR5 Dictates the Equilibrium of Proinflammatory IL-17+ and Regulatory Foxp3+ T Cells in Fungal Infection The Journal of Immunology ., 2010;184 - 5224-5231

Lefevre L, Gales A, OLAGNIER D, Bernad J, Perez L, Burcelin R, Valentin A, Auwerx J, Pipy B, Coste A. PPAR γ ligands swichted high fat diet-induced macrophage M2b polarización toward M2a thereby improving intestinal Candida elimination. PLoSone 2010, 5 : e12828.

Leitner Judith, Grabmeier-Pfistershammer Katharina, Steinberger Peter, Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes, 2010, Immunology Letters, 128 : 89-97.

Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. Science. 2008;320: 1220–4.

Maldonado RA, Irvine DJ, Schreiber R, Glimcher LH. A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. Nature. 2004;431:527–32.

Mauri C, Ehrenstein MR. The ‘short’ history of regulatory B cells. Trends Immunol. 2008;29:34–40. 47.

Marijnissen RJ, Koenders MI, van de Veerdonk FL, Dulos J, Netea MG, Boots AMH, Joosten LAB, van den Berg WB. Exposure to *Candida albicans*

polarizes a T-cell driven arthritis model towards Th17 responses, resulting in a more destructive arthritis. *PLoSOne*, 2012, 7, e38889.

Murphy Kenneth, Travers Paul, Walport Mark, Janeway's Immunobiology, 2008, Garland Science, 7^a ed., EUA, 887pp.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145–73. 5. Lanzavecchia A, Sallusto F. Antigen decoding by T lymphocytes: From synapses to fate determination. *Nat Immunol*. 2001, 2:487–92.

Pandiyani P, Conti HR, Zheng L, Peterson AC, Mathern DR, Hernández-Santos N, Edgerton M, Gaffen SL, Lenardo MJ. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity* 2011, 34 : 422-434.

Reyes-García MG, Hernández-Hernández F, Hernández-Tellez B, García-Tamayo F. GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulates their IL-6/IL-12 production. *J Neuroimmunol*. 2007, 188 : 64-8.

Rowe JH, Ertelt JM, Aguilera MN, Farrar MA, Way SS. Foxp3⁺ regulatory T cell expansion required for sustaining pregnancy compromises host defense against prenatal bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 2011, 10 : 54-64.

Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanam R. Systemic increase in the ratio between Foxp3⁺ and IL-17-producing CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol* 2009, 183 : 7023-30.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005;6: 345–52. 32.

Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martín P, Yamaguchi T. Regulatory T cells : how they suppress immune responses? *Int Immunol*. 2009, 21 : 1105-11.

Sakabe K, Kawashima I, Urano R, Seiki K, Itoh T. Effects of sex steroids on the proliferation of thymic epithelial cells in a culture model: a role of protein kinase C. *Immunol Cell Biol*. 1994, 72: 193-9.

Savino W, Villa-Verde DM, Alves LA, Dardenne M. Neuroendocrine control of the thymus. *Ann N Y Acad Sci*. 1998, 840: 470-9.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cell expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995, 155: 1151-64.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008, 133: 775-87.

Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 2012, 3 : 51.

Sutmuller RPM, den Brok MHMGM, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LWJ, Kullberg B-J, Joosten LA, Akira S, Netea MG, Adema GJ. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2006, 116 : 485-494.

Suto A, Nakajima H, Ikeda K, Kubo S, Nakayama T, Taniguchi M, Saito Y, Iwamoto I. CD4+CD25+ T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms. *Blood*. 2002, 99: 555-60.

Takayama Y, Tanaka K, Murata S. Modest cortex and promiscuous medulla for thymic repertoire formation. *Trends Immunol*. 2008, 29: 251-55.

Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, Hall BA, Fitzgerald KA, Hise AG. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2011, 7, e1002379.

Van de Veerdonk FL, Netea MG. T-cell subsets and antifungal host defenses. *Curr Fungal Infect Rep* 2010, 4 : 238-243.

Wang C, Dehghani B, Li Y, Kaler LJ, Vandenbark AA, Offner H. Oestrogen modulated experimental autoimmune encephalomyelitis and interleukin-17 production via programmed death 1. *Immunology*. 2009, 126: 329-35.

Zhang O, Leong SC, McNamara PS, Mubarak A, Malley R, Finn A. Characterisation of regulatory T cells in nasal associated lymphoid tissue in children : relationships with pneumococcal colonization. *PloSPathog* 2011, 7 : e1002175.

Zivković I, Rakin A, Petrović-Djergović D, Miljković B, Mičić M. The effects of chronic stress on thymus innervations in the adult rat. *Acta Histochem*. 2005, 106: 449-58.

Zoller AL, Schnell FJ, Kersh GJ. Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration. *Immunology*. 2007, 121: 207-15.

Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, Ramonda R, Iaccarino L, Doria A. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev*. 2011, 10: 305-10.

Zhao JX, Zeng YY, Liu Y. Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2007, 75 : 71-81.

Zago CA, Bortoluci KR, Sardihna LR, Prete FD, Castillo-Méndez SI, Freitas do Rosario AP, Hiyane MI, Muxel SM, Rodríguez-Málaga SM, Abrahamsohn IA, Álvarez JM, D'Império Lima MR. Anti-IL-12 treatment impairs the expansion of T (reg) cell population during acute malaria and enhances the Th1 cell response at the chronic disease. *PLoS One*. 2012, 7 (1): e29894.

XIII APÉNDICES

a) Lista de Figuras

Figura 1: Principales factores que proporcionan inmunidad.

Figura 2.- Diferenciación de los linfocitos en sus diferentes subpoblaciones.

Figura 3. Mecanismos de supresión de los linfocitos T reguladores.

Figura 4- Clasificación de los mecanismos supresores de los Treg.

Figura 5. Fotografías del peritoneo de algunos ratones.

Figura 6. Imágenes sobre el efecto que produjo GABA.

Figura 7. Media y error estándar de los IMF de los linfocitos T CD25+.

Figura 8. Media y error estándar de los IMF de los linfocitos T Foxp3+.

Figura 9. Gráficos de citometría con las variaciones de los linfocitos CD4+CD25+.

Figura 10. Gráficos de citometría con una tinción triple positiva para CD4, CD25 y Foxp3

Figura 11. Histogramas de la expresión de Foxp3, de la región positiva para CD4/CD25.

b) Lista de Abreviaturas

Als 1p aglutinina

APC Aloficocianina

C Complemento

CA *Candida albicans*

CD Célula dendrítica

CD marcador de diferenciación (“cluster of differentiation”)

Células NK células asesinas naturales

CPA Célula presentadora de antígenos

CXC Quimiocina CXC

DAMPs Patrones Moleculares Asociados a Daños

DNA Ácido desoxirribonucleico

Foxp3 Factor de transcripción "Forkhead box P3"

GABA Ácido gama-aminobutírico

HSP Proteína de choque térmico

IFN γ Interferón gama

IL Interleucina

LPS Lipopolisacárido

M1y M2 Subpoblación de macrófagos

MEC Matriz Extra Celular

MHC Complejo Mayor de Histocompatibilidad

NF κ B Factor Nuclear de transcripción κ B

NOD Dominios de oligomerización a nucleótidos

PAMP Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PBS Solución amortiguadora de fosfatos

PE Ficoeritrina

PLB Fosfolipasa B

PMN Leucocitos polimorfonucleares

PRR Receptores para el Reconocimiento de Patrones

SAP aspartilproteasa

SIDA Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

SN Sobrenadante

Tc Linfocitos T citotóxicos

TGF β Factor Transformador del Crecimiento beta

Th Linfocitos T colaboradores

TH17 una subpoblación de los linfocitos T cooperadores

TLR Receptores parecidos a Toll

TNF-Factor Necrosante de Tumores

TRAIL inductor de apoptosis (“TNF-related apoptosis-inducing ligand”)

Treg Linfocito T regulador

c) Soluciones y reactivos

Agar Dextrosa de Sabouraud.

Compuesto	(g/litro)
Dextrosa	40.0
Peptona de Caseína	5.0
Digerido Pancreático	5.0
Agar Bacteriológico	15.0

Medio de cultivo para *Candida albicans*. Se agregaron 65 g del medio en un litro de agua destilada con un pH ajustado de 7. Se calentó con agitación suave hasta su completa disolución y se dejó hervir durante un minuto, siempre evitando el sobrecalentamiento. Se esterilizó en autoclave a 121°C (15 libras de p

resión) durante 15 minutos, dejándose enfriar a una temperatura entre 45-50°C. Posteriormente se virtió en cajas Petri estériles de 90 mm; se realizó una prueba de esterilización y se guardaron a 4°C.

Solución de Hanks (sin Ca²⁺ ni Mg²⁺).

Compuesto	(g/litro)
NaCl	8.0
KCl	0.4
Na ₂ HPO ₄	0.046
KH ₂ PO ₄	0.06
Glucosa	1.0
NaHCO ₃	0.35

Una vez disueltos todos los componentes de aforó la solución; se verificó el pH de la misma, el cual debe de estar entre 7.2-7.4, para después ser esterilizado por filtración y conservado a temperatura ambiente.

Solución de fijación

PBS 1x al 0.5% de paraformaldehido.

Adicionar 0.5% de paraformaldehido, calentando a 56 °C, durante 60 minutos, sin dejar ebulir. Agregar 2 gotas de NaOH 1M para disolver. Dejar enfriar y guardar a 4°C.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

NaCl	27 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Agua destilada	1 L
Ajustar pH a 7.2 – 7.4	

Una vez disueltos todos los componentes de aforó la solución; se verificó el pH de la misma, el cual debe de estar entre 7.2-7.4, para después ser esterilizado por filtración y conservado a temperatura ambiente.

Etanol al 70%.

Alcohol etílico.....70 mL.

Agua destilada (c.s.p.).....100 mL.

Mezclar las 70 partes de alcohol con 30 partes de agua destilada.

Guardar a temperatura ambiente, el frasco debe estar bien tapado.