



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Inmunoparasitología

Papel de las células T reguladoras en la respuesta inmune contra *Toxoplasma gondii* en el modelo murino

TESIS

Que para optar por el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

Biól. Jonadab Efraín Olguín Hernández

Director de tesis: Dr. Rafael Simitrio Saavedra Durán

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Comité tutor: Dr. Luis I. Terrazas Valdés, UBIMED FES Iztacala, UNAM

Dr. Pascal R. Hérion Scohy, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad Universitaria, México D.F. Enero de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

CONACYT: 102399, 102984, 152224 y 167799

DGAPA, UNAM: IN-200608, IN-209111, IN-210914 e IN213512

Agradecimientos

La vida nos lleva por caminos que no imaginamos y cuando menos lo esperamos, nos presenta personas que son parteaguas de lo que somos hoy. Cuando era niño quería ser piloto aviador. A los 7 años cambié los balones de futbol y los coches de plástico por herramientas automotrices y autopartes. Con el pasar de los años me di cuenta de mi amor por la música, de mi obsesión por ella.

En la prepa conocí la pasión hacia la biología representada en mi profesora de quinto año, la Biól. Irene Quiroz. Ella nos pidió una muestra de agua de panteón, que por cierto el viaje al panteón me sirvió para ir a visitar a mi Agustín. Cuando la profesora tomó una gota de la muestra de agua y la observó al microscopio, alcanzó a enfocar un rotífero; gritó de emoción, brincó de alegría y salió corriendo en busca de sus colegas que daban clase a otros grupos. Cuando noté su alegría dije: yo quiero apasionarme como ella. Siendo honesto, la primera mitad de mi carrera fue complicada, la pasión no llegaba. La necesidad de tener fe en algo sobrenatural iba en contra de las lecciones de selección natural y los miles de millones de años que el universo ha existido. Cuando estuve a punto de “tirar la toalla” porque la pasión no llegaba, conocí a dos personas que cambiaron mi perspectiva de la biología, del estudio de la vida. La primera persona es el Dr. Antonio Lazcano. Con sus lecciones de origen de la vida, con su visión histórica basada en ciencia y tomando en cuenta la religión, mis horizontes se abrieron, mi necesidad de cuestionar todo llegó a un nivel superior: la necesidad de la información. En consecuencia la pasión llegó. La segunda persona que cambió mi perspectiva de la ciencia y que me hizo apasionarme aún más, es el Dr. Rafael Saavedra. Él es mi maestro hasta la fecha, él me abrió las puertas de su laboratorio y aunque la anécdota del inicio y del final es complicada y la llevo guardada en el corazón, a él le debo lo que soy. Él es el parteaguas más significativo que he tenido en la vida, por él he conocido directa o indirectamente a la gran mayoría de personas que han formado y forman parte de mi vida hoy. Rafael me enseñó que en el laboratorio no se cree que un evento ocurre, sino que se demuestra con experimentos. Yo he extrapolado este fundamento y lo aplico a mi vida diaria. Me han dicho que en el trabajo de laboratorio y en la crítica soy igual que él, él lo ha confirmado. Me siento halagado.

Agradezco a mi universidad. La UNAM es una institución abierta, llena de espacios, llena de conocimiento, llena de vida. Desde que tengo noción quise formar parte de la UNAM, sin embargo ella, hoy, es parte fundamental de mí. No podría ser quien soy ni estar escribiendo esto sin el toque único que puso la UNAM en mí. Siempre que puedo invito a las personas que desconocen las dimensiones de mi universidad a que la conozcan, el resultado siempre es el mismo, las personas se maravillan así como yo lo hago siempre que estoy en casa, en Ciudad Universitaria.

Agradezco a todas las personas que han estado conmigo a lo largo de mi formación académica. Agradezco a mi familia: Alfredo, Esther, Miriam, Jemily, a mi tía Alejandra, a mi prima Stephanie, por su apoyo, su compañía y sus consejos. Ellos están en mi corazón siempre, les amo. Hace poco hice un viaje fuera del país, donde me re-encontré con mi tío Luis y su familia; les agradezco sus palabras y su apoyo. Agradezco al club de caballeros, por tantas lecciones de póker, de palillos chinos, por tantas horas ocupadas mientras esperábamos clase en la licenciatura. Agradezco a Lalo, Fernando y Michelle por tantas aventuras en Ojo de agua, por la música y el Rock. Agradezco a Gaby Morales, por escucharme y apoyarme siempre. Agradezco a mi banda cafetalera: David, Jorge, Weter, Tieso, Karinna, Israel, Frany, Ñonri, entre muchos otros que llegaron y se fueron con el tiempo, con ellos aprendí el verdadero significado de la amistad y que la hermandad va más allá de lazos de sangre. Gracias por tanta música, tanto Rock, tanto Caifanes, los amo. Agradezco a la FES Iztacala; ahí conocí a uno de mis mejores maestros, el Dr. Ignacio “Nacho” Terrazas. Él me enseñó a no darme por vencido, él me apoya hasta las últimas consecuencias y sin importar nada, simplemente porque “para eso estamos”. Su visión de la ciencia me da ímpetu, entusiasmo y ejemplo para trabajar duro y con el corazón, haciendo lo que me gusta. También agradezco a la Dra. Miriam Rodríguez por sus consejos y su apoyo incondicional. En Iztacala tengo una parte de mi corazón, con mi mamá Imelda y mi mamá Yadira, con Bere, Diana, Emme, Memo, Juan y toda la banda del laboratorio 8 y del laboratorio 5. Gracias por su apoyo, sus palabras y su corazón. Con ustedes aprendí que la ciencia se hace mejor en hermandad, que la convivencia dentro de un laboratorio puede existir, que las respuestas a muchas preguntas científicas que yo genere las puede tener el vecino de enfrente y que si quito la barrera del “ego científico”, puedo desarrollar mejor el trabajo de laboratorio. En Iztacala conocí a una mujer única, que me abrió su corazón, me

recuerda que lo esencial es invisible a los ojos y que lo bueno de la vida llega en el momento adecuado. Estas lecciones las he aprendido mientras la tomo del brazo para caminar lentamente; gracias mi querida y bella Itzel.

Agradezco al personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas: A Erika Segura, Georgina Díaz y Jacqueline Fernández, por su apoyo, sus pláticas, sus chistes, sus regaños y ante todo, por sus consejos que fueron de gran utilidad y me dieron paz en momentos clave. También agradezco a Carlos Castellanos, Martín, Nancy, Ramón, Mónica, Rafa, Juanita, Mario, Lic. Carlos Martínez, y todos aquellos que siempre estuvieron al pendiente de mí y que, con una sonrisa, un chiste, un saludo o una palabra me hicieron feliz durante mi estancia en el Instituto. Agradezco a mis compañeros del laboratorio: Nohemí, Pablo, Adolfo, Cristina y Carlos, gracias por depositar su confianza en mí, gracias por su apoyo dentro y fuera del laboratorio, por todas esas comidas y las pláticas, por escucharme cuando tengo algo que decir (que es casi siempre), porque ustedes son mis hermanos académicos. Por último quiero agradecer a las personas que me dieron lecciones de vida muy particulares: a aprender a dar sin necesidad de recibir algo a cambio, a luchar por lo que quiero no importando quién o qué se ponga enfrente, a tener fe aunque sea intangible, a seguir caminando hasta el final. Dentro de este grupo de personas hago una mención especial a Agustín, mi abuelito. El ya no está físicamente conmigo, pero siempre me acompaña, él está hoy aquí conmigo, mientras redacto estos párrafos. La gran mayoría de personas que ya no están conmigo aún están en mis sueños y seguirán siendo eternos, mientras yo viva y mientras cuente su historia a través de mis generaciones.

Una vez, hace muchos años, leí que Salomón, el rey más inteligente que han tenido los judíos, escribió: “Porque mucha sabiduría trae mucha aflicción, y quien añade ciencia, añade dolor”. Esto lo escribió en un libro llamado Eclesiastés, en el capítulo 1, versículo 18. Sin embargo, yo me quedo con una frase que asegura Juan el apóstol, Jesús dijo:

“...Y conocerás la verdad, y la verdad te hará libre”. Juan 8:32

Efraín Olguín. Diciembre del 2015

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
1. Introducción	4
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>.....	4
1.1.1. Estadios de <i>T. gondii</i>	4
1.1.2. Ciclo de vida	7
1.1.3. Epidemiología de la toxoplasmosis	9
1.1.4. Estructura poblacional de <i>T. gondii</i>	13
1.1.5. Susceptibilidad y resistencia a la toxoplasmosis murina.....	14
1.1.6. Respuesta inmune	19
1.2. Células T reguladoras.....	21
1.2.1. Células Tregs naturales.....	23
1.2.2. Células Tregs adaptativas	24
1.2.3. Mecanismos de supresión.....	26
1.3. El IFN-γ.....	30
1.3.1. El receptor del IFN- γ y su señalización	33
1.3.2. Apoptosis inducida por IFN- γ	34
2. Antecedentes directos	36
2.1. Participación de las células Tregs durante la infección con <i>T. gondii</i>	36
2.2. Justificación	39
3. Hipótesis y objetivos	41
3.1. Hipótesis.....	41
3.2. Objetivos	41
3.2.1. Objetivo general.....	41
3.2.2. Objetivos particulares.....	41
4. Materiales y métodos.....	42
4.1. Ratones.....	42
4.2. Parásitos e infección de ratones.....	42
4.2.1. Obtención de quistes	42
4.2.2. Infección por la vía oral	42

4.2.3.	Infección por la vía intraperitoneal	43
4.3.	Obtención de sangre	43
4.4.	Obtención de células de bazo	43
4.5.	Citometría de flujo	44
4.5.1.	Inmunofluorescencia en células de sangre	44
4.5.2.	Inmunofluorescencia en células de bazo	44
4.5.3.	Determinación intranuclear de factores de transcripción	45
4.5.4.	Determinación de citocinas intracelulares	45
4.5.5.	Enriquecimiento de células CD4 provenientes de ratones F_{oxp3}^{EGFP}	46
4.5.6.	Sorting de células Tregs	47
4.5.7.	Cuantificación de citocinas en suero y en sobrenadantes de cultivo	47
4.5.8.	Determinación de la viabilidad de las células Tregs	48
4.5.9.	Determinación de números absolutos	49
4.5.10.	Citómetros	49
4.5.11.	Anticuerpos	50
4.6.	Transferencia adoptiva de células Tregs	51
4.7.	Cultivos celulares	51
4.7.1.	Hibridomas	51
4.7.2.	Células de bazo estimuladas con α-CD3	52
4.8.	Purificación de anticuerpos monoclonales	52
4.8.1.	Electroforesis desnaturizante y reductora	53
4.8.2.	Tinción de geles con azul de Coomassie	53
4.8.3.	Neutralización de IFN-γ <i>in vivo</i>	54
4.9.	Obtención de intestinos	54
4.9.1.	Histología de intestinos	54
4.10.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	55
4.10.1.	Obtención de RNA de ileon	55
4.10.2.	Obtención de DNA de intestino y cerebro	55
4.10.3.	RT-PCR para determinar citocinas en intestino	56
4.10.4.	PCR para determinar carga parasitaria en intestino y cerebro	56
4.10.5.	Geles de agarosa	57
4.11.	Análisis estadístico	58
4.12.	Soluciones utilizadas	58

5. Resultados	64
5.1. Papel de las células Tregs en la modulación de la respuesta inmune durante la infección con <i>T. gondii</i> en la cepa de ratón B6	64
5.2. Papel del IFN-γ en la reducción de las células Tregs durante la infección con <i>T. gondii</i> en la cepa de ratón BALB/c	91
5.2.1. Mecanismos que inducen la disminución de células Tregs por el IFN-γ	102
5.2.2. La IL-7 mantiene a las células Tregs en los ratones IFN-γ KO infectados	105
6. Discusión	115
Bibliografía.....	131

Resumen

Las células T reguladoras (Tregs) son una subpoblación de linfocitos T-CD4⁺ que se encargan de mantener la homeostasis de la respuesta inmune durante el desarrollo de algunas enfermedades infecciosas. Durante la toxoplasmosis murina, las células Tregs disminuyen en porcentaje y en número como consecuencia de varios eventos que incluyen: disminución en la producción de la IL-2 por células CD4⁺, muerte celular y transformación en el fenotipo. Sin embargo, existe discrepancia al concluir si la disminución de células Tregs es la causa de la susceptibilidad o si es necesaria para generar resistencia. En el presente proyecto se demostró que la reconstitución de células Tregs por medio de transferencia adoptiva, disminuye la respuesta inmune exacerbada T_h1 y prolonga la sobrevivencia de los ratones infectados, pero como consecuencia, hay una mayor carga parasitaria. También se demostró que, sumado a las causas descritas que generan la disminución de células Tregs durante la toxoplasmosis, el IFN- γ juega un papel primordial, ya que es la citocina que orquesta la muerte celular y la transformación en el fenotipo de las células Tregs. Por último se demostró un mecanismo alternativo que implica directamente a la IL-7 en el sustento de las células Tregs aun con una baja producción de IL-2 por células CD4⁺. Se concluyó por lo tanto que la disminución de células Tregs en la fase aguda de la infección es necesaria, pero no debe ser drástica para que exista control sobre la respuesta inmune exacerbada y sea favorecida la sobrevivencia del hospedero. El papel de las células Tregs durante la toxoplasmosis murina es controlar la respuesta inmune inflamatoria, por lo tanto, debe existir el balance entre una eficiente respuesta inmune y su control por las células Tregs. Finalmente se concluyó que la disminución exacerbada de las células Tregs durante la toxoplasmosis es un indicador de la susceptibilidad.

Abstract

Regulatory T (Treg) cells are a subpopulation of CD4⁺ lymphocytes that are responsible of immune homeostasis during infectious diseases. During murine toxoplasmosis a reduction in the percentage and number of Treg cells has been described as a consequence of a set of events that include: a low IL-2 production by CD4⁺ cells, cellular death and phenotypic transformation. However, there is a discrepancy in the conclusions about if Treg cells reduction causes susceptibility or is this necessary for induce resistance. In the present project was shown that reconstitution of Treg cells by adoptive transfer down-modulate the exacerbated T_H1 immune response and increases the survival of infected mice, but as a consequence increased parasite load exist. It was also shown that, besides the events that cause Treg cells reduction, IFN- γ plays a major role, because is the cytokine who orchestrates the cellular death and the phenotypic transformation. Finally, it was also shown an alternative mechanism that implies directly to IL-7 in the maintenance of Tregs cells even with low IL-2 production by CD4⁺ cells. It was concluded that reduction of Tregs in the acute phase of infection is necessary, but this reduction must not be exacerbated so that the down-modulation of the immune response still exists, and the survival of the host is favored. The role of Treg cells during murine toxoplasmosis is down-modulate the inflammatory immune response, hence, a balance between an efficient immune response and its modulation by Treg cells must exist. Further, exacerbated reduction of Treg cells is a hallmark of susceptibility during toxoplasmosis.

Abreviaturas

ANOVA	Análisis de varianza
CBA	Ensayo de perlas por citometría
CCR-5	Receptor de quimiocinas 5
CDM	Medio definido químicamente
CTLA-4	Antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos-4
DC	Células dendríticas
DPBS	Solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco
FACS	Separación de células con base en la fluorescencia
Foxp3	Factor de transcripción “forkhead/winged-helix box P3”
GITR	Factor-Receptor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
LAG-3	Gen de activación de linfocitos-3
LD ₁₀₀	Dosis letal para el 100% de la población
LXA ₄	Lipoxina A-4
MACS	Separación celular activada magnéticamente
NK	Células asesinas naturales
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa
PMA	Forbol 12-miristato 14-acetato
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
T _h 1	Células cooperadoras de clase 1 (inflamatorias)
TLR-11	Receptor tipo Toll-11
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tregs	Células T reguladoras

1. Introducción

1.1. *Toxoplasma gondii*

T. gondii es un protozooario intracelular obligado, causante de la toxoplasmosis (1,2). Pertenece al phylum Apicomplexa, el cual es caracterizado por la presencia de un complejo de organelos secretores que incluyen roptrias, micronemas y gránulos densos que en conjunto forman el complejo apical (Fig. 1) (1,2) y también por la presencia de un organelo endosimbiótico llamado apicoplasto. Además de *T. gondii*, en el phylum Apicomplexa se incluyen patógenos de humanos y de animales como *Eimeria*, *Plasmodium*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium* y *Neospora* (3), los cuales en su mayoría presentan una fuerte especificidad hacia un hospedero. Sin embargo, *T. gondii* tiene un amplio rango de hospederos, pudiendo infectar animales de sangre caliente (4).

1.1.1. Estadios de *T. gondii*

Se han descrito 3 estadios dentro del ciclo de vida de *T. gondii*: taquizoíto, bradizoíto (quiste) y esporozoíto (ooquiste).

El taquizoíto (del griego *Tachos*, rápido) es el estadio de *T. gondii* que se multiplica rápidamente después de penetrar una célula hospedera (1) y que se asocia con la fase aguda de la infección. El taquizoíto tiene un tamaño de 2x6 μm (Fig. 1). Una característica morfológica es su parecido a una media luna (Fig. 1). No presenta medios de locomoción como cilios, flagelos o pseudópodos, pero se puede desplazar por ondulación, rotación y difusión (1). El taquizoíto puede infectar cualquier célula de su hospedero (1). Se divide de manera asexual, por un mecanismo llamado endodigenia, que es similar a la fisión binaria,

donde 2 células hijas ocupan todo el citoplasma de la célula madre que termina por desaparecer (5).

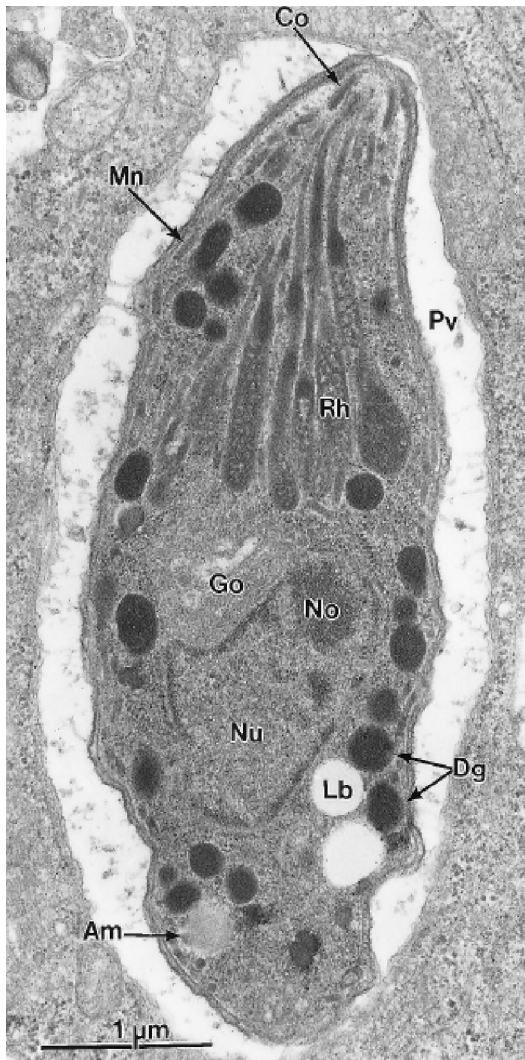


Fig. 1. Micrografía ultraestructural de un taquizoíta de *T. gondii*. Se pueden observar algunos organelos característicos del phylum Apicomplexa que incluyen: micronemas (Mn), roptrias (Rh) y gránulos densos (Dg). Estos organelos se encuentran en la región apical. Así mismo se observan otros organelos como el aparato de Golgi (Go), núcleo (Nu) y nucleolo (No). Micrografía tomada de la referencia (2)

El bradizoíta (del griego *brady*, lento) es el estadio del parásito que persiste durante toda la vida del hospedero dentro una estructura conocida como quiste. El quiste se asocia con la etapa crónica de la infección, pero se conoce que la formación de quistes comienza desde los 3 días post-infección (dpi) (1). Los quistes varían en tamaño, desde 5 μm de diámetro hasta más de 100 μm de diámetro (Fig. 2). Entre mayor sea el tamaño de un quiste, mayor número de bradizoítos presentará. Aunque los quistes se pueden encontrar en cualquier

tejido, tienen mayor presencia en tejidos neuronales y musculares (1,6). Una de las diferencias ultra-estructurales que nos permite distinguir entre el bradizoíto y el taquizoíto, es que los bradizoítos presentan su núcleo en la parte posterior del parásito, mientras que los taquizoítos lo presentan en la parte central (Fig. 1).

Por otro lado, es importante mencionar que no se conocen los mecanismos de conversión que inducen la transformación de taquizoítos en bradizoítos. Se ha propuesto que el estrés inducido por los niveles de pH, o por productos del sistema inmune como los intermediarios reactivos de oxígeno e incluso drogas o medicamentos, pueden ser la causa de la conversión (5). Recientemente se ha propuesto que esta transformación puede ser un mecanismo de persistencia evolutiva, donde el parásito se transforma de taquizoíto a bradizoíto hasta que se encuentra en regiones del hospedero donde haya células que tengan una vida media alta, como lo son las células músculo-esqueléticas maduras, o las neuronas en el cerebro (7).

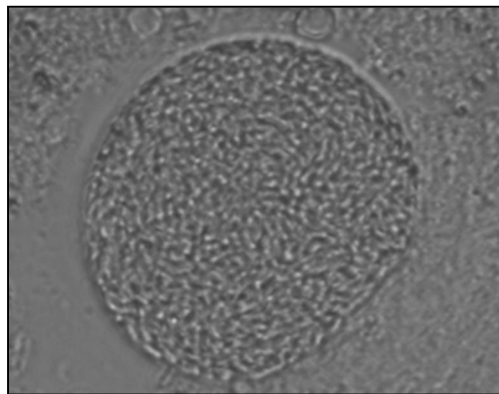


Fig. 2. Quiste de *T. gondii*. En el interior del quiste se pueden observar los bradizoítos. Quiste obtenido del macerado del cerebro de un ratón B6 a los 30 dpi.

El esporozoíto existe dentro de una estructura llamada ooquiste. Los ooquistes tienen una forma esférica de aproximadamente 10x12 μm de diámetro (Fig. 3). Cada ooquiste contiene 2 esporoquistes y cada esporoquiste contiene 4 esporozoítos; en total 8 esporozoítos por cada ooquiste (Fig. 3). Se conoce que el número de ooquistes, esporoquistes y esporozoítos es un criterio para la clasificación de los coccidios en género *Eimeria* o *Isospora*, donde *T. gondii* tiene un ciclo de vida tipo *Isospora* (1). Se mencionarán más detalles del ooquiste dentro de la descripción del ciclo de vida de *T. gondii*.

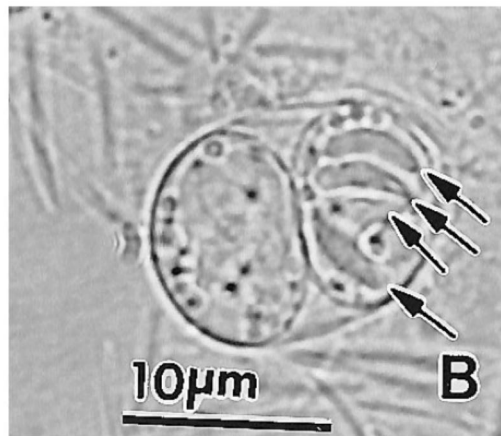


Fig. 3. Ooquiste de *T. gondii*. En el interior del ooquiste se observan 2 esporoquistes con 4 esporozoítos (derecha, flechas), lo que define el ciclo de vida tipo *Isospora* de *T. gondii*. Imagen tomada de la referencia (2)

1.1.2. Ciclo de vida

Las especies que pertenecen al orden Felidae son los hospederos definitivos de *T. gondii* (8). Sin embargo, en la presente tesis se referirá al gato como el hospedero definitivo debido a su cercanía con los hábitos cotidianos del humano (9). La transmisión congénita de *T. gondii* en los gatos domésticos puede ocurrir, pero es rara. La mayoría de los gatos se

pueden infectar con *T. gondii* ya sea por ingerir tejidos infectados con quistes o por ingerir ooquistes esporulados (4). Sin embargo, la transmisión de *T. gondii* en los gatos es más eficiente por el consumo de tejidos infectados con quistes que por la ingestión de ooquistes (9). Cuando los gatos ingieren quistes u ooquistes (Fig. 4), su capa externa respectiva se rompe por enzimas proteolíticas en el estómago (10). Los esporozoítos (ooquistes) o los bradizoítos (quistes) se interconvierten en taquizoítos. Los taquizoítos liberados penetran a las células epiteliales del intestino para comenzar el desarrollo de las 5 etapas asexuales (A, B, C, D y E) descritas antes del inicio de la gametogonia (11). Aunque no se conoce el origen de los gametos, se ha sugerido que son generados a partir de la etapa D y E, lo que concluye en la formación de microgametos (masculinos) y macrogametos (femeninos) (1). Los microgametos penetran a los macrogametos maduros causando la formación del cigoto. Después de la formación del cigoto se forma una pared alrededor de él, que es lo que caracteriza la formación del ooquiste no esporulado. Las células del epitelio intestinal que sirvieron como medio para el almacenamiento de los ooquistes se rompen, lo que favorece su descarga al lumen intestinal, donde formarán parte de las heces del gato. En experimentos de laboratorio, se ha demostrado que los gatos pueden excretar 500 millones de ooquistes en las heces después de ingerir un ratón infectado con *T. gondii*, pero la mayoría de los gatos excretan ooquistes sólo durante aproximadamente una semana de su vida (12,13). Dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura y humedad) los ooquistes esporulan, son infectivos y pueden contaminar el suelo, el agua, los cultivos de alimentos vegetales, siendo un blanco los animales de granja utilizados para el consumo humano (Fig. 4) (14). Los ooquistes no esporulados pueden persistir en el ambiente por un periodo prolongado de tiempo (15).

Después de la ingestión de ooquistes esporulados por los hospederos intermediarios incluido el humano (Fig. 4), el pH del estómago favorece el rompimiento del ooquiste y la liberación de esporozoítos, los cuales penetran las células del epitelio intestinal, comenzando su transformación en taquizoítos, los cuales se dividirán rápidamente y posteriormente se convertirán en bradizoítos (quistes) (16). Los quistes persisten durante toda la vida del hospedero, por lo que otra fuente de transmisión del parásito es el consumo de tejidos contaminados con quistes (Fig. 4) (17).

Otra forma de transmisión de *T. gondii* incluye la infección congénita, la cual se debe a la adquisición del parásito por parte de la madre durante el embarazo. Dependiendo de la etapa del embarazo donde se haya adquirido la infección, se obtendrán consecuencias diferentes sobre el feto; si la madre adquiere la infección en el primer trimestre, existe mayor probabilidad de aborto, pero la infección adquirida en la etapa final del segundo trimestre o en el tercero, genera malformaciones en el producto, como hidrocefalia y microcefalia, entre otras (Fig. 4) (18). Otras formas de transmisión de la toxoplasmosis incluyen la donación de órganos y accidentes en laboratorios donde se estudia la toxoplasmosis (18).

1.1.3. Epidemiología de la toxoplasmosis

T. gondii se distribuye en todo el mundo, pero su prevalencia es diferente entre países que se encuentran en la misma región geográfica, siendo en promedio del 30% (19,20). La prevalencia de la toxoplasmosis se ha asociado a 2 factores principales: el consumo de tejidos contaminados con quistes o a la infección con ooquistes esporulados (19).

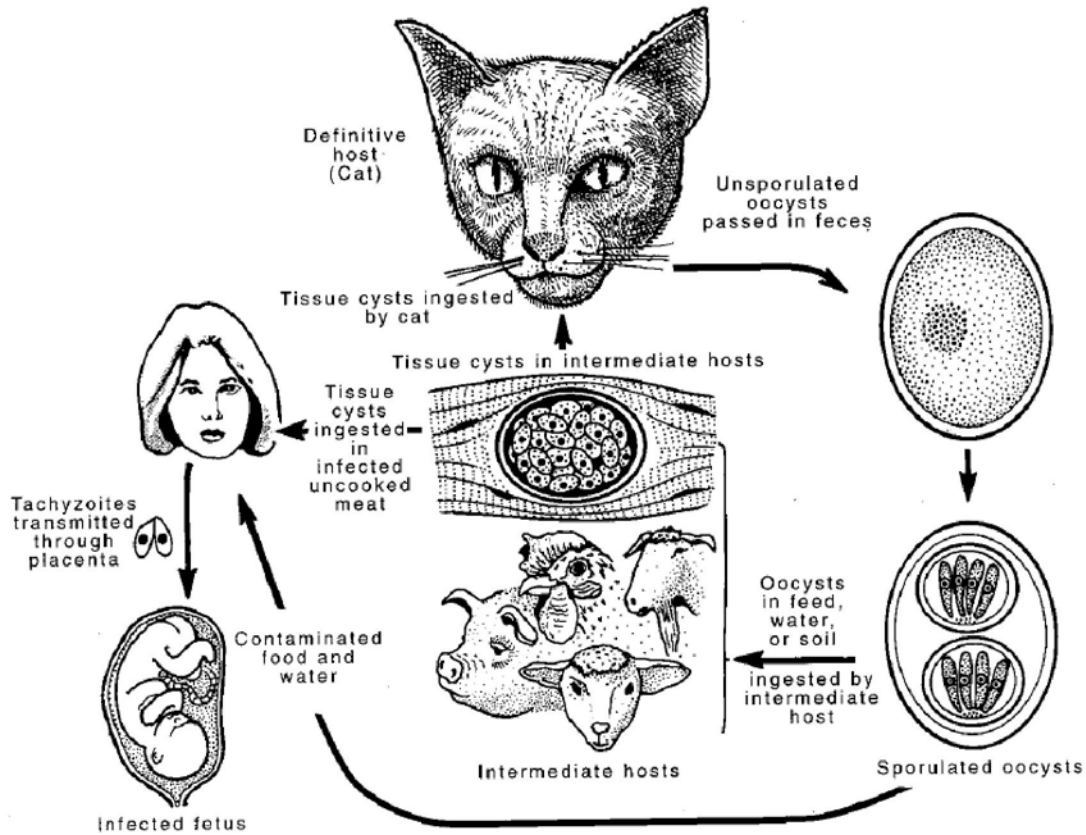


Fig. 4. Ciclo de vida de *T. gondii*. Después de que el gato (hospedero definitivo) ingiere quistes u oocistos de *T. gondii*, se desarrolla la fase sexual del parásito en el epitelio intestinal. En las heces del gato son excretados los oocistos en su forma no esporulada, y si las condiciones del ambiente son las adecuadas maduran y se vuelven infectivos para los hospederos intermediarios, contaminando el suelo, las frutas, los vegetales y el agua. Una vez que los hospederos intermediarios (cualquier animal de sangre caliente) se infectan, los quistes persisten durante toda la vida del hospedero en los tejidos. El consumo de carne infectada y mal cocida o cruda es una fuente de infección para los hospederos intermediarios y definitivos. Las mujeres que adquieren la infección durante el embarazo pueden transmitirla al feto vía placenta. Imagen tomada de la referencia (1)

Un estudio múltiple que incluyó países como Bélgica, Dinamarca, Noruega, Italia, Suiza y Reino Unido, identificó el consumo de carne cruda como un factor de riesgo primordial para adquirir la infección por *T. gondii* (Tabla I). Asimismo, la alta prevalencia de toxoplasmosis en Francia se ha relacionado con las preferencias en el consumo de carne cruda o poco cocida (Tabla I). A diferencia de lo observado en Europa, en América Central se ha asociado una alta prevalencia de toxoplasmosis con un alto índice de gatos callejeros, sumado a que las condiciones del ambiente favorecen la esporulación de los ooquistes (Tabla I). Además, se ha sugerido que en estas regiones existe un alto porcentaje de infección por *T. gondii* en aves y en roedores, los cuales son blancos de caza para los gatos (21).

En la Tabla I se resume la prevalencia de la toxoplasmosis en algunos países, donde se ha identificado un porcentaje representativo de personas positivas a la infección desde 1988 en Panamá, hasta 2004 en España, Estados Unidos y Países Bajos.

En México, al hacer un meta-análisis sistemático de todas las publicaciones descritas de 1951 a 2012 [criterios de inclusión en la referencia (22)], se observó que de 132 estudios en 70,123 individuos, el porcentaje de prevalencia es del 27.97%. El porcentaje de individuos positivos entre distintos grupos de riesgo incluyó mujeres con abortos involuntarios (36.03%), personas inmunocomprometidas (28.54%) y pacientes con enfermedades mentales (38.52%) (22).

Continente	País	Año de realización del estudio	Seropositividad (%)
Europa del oeste	Austria	1998	43
	Bélgica	1997	50
	Francia	2001	> 75%
	Alemania	2004	26-54%
	Italia	2001	18-60%
	Países Bajos	2004	40.5
	España	2004	28.6
	Suiza	1995	46
Escandinavia	Dinamarca	1999	27.8
	Finlandia	1995	20.3
	Noruega	1998	10.9
	Suecia	2001	14.0-29.4
Europa del centro y del este	Croacia	2000	38.1
	Polonia	2001	46.4-58.5
	Eslovenia	2002	34
	Reino Unido	1998	57-93
	Yugoslavia	1992	23-33
América del norte	EUA	2004	16-40
	México	2001	35
Centroamérica	Costa Rica	1996	76
	Cuba	1993	60
	Panamá	1988	90 (mayores de 60 años)
América del sur	Argentina	2001	72
	Brasil	2001	59
	Antillas y Bahamas	1991	29.7
Asia del sureste	Indonesia	2000	58
	Malasia	2004	44.8
	Tailandia	2001	2.3-21.9

Tabla I. Epidemiología de *T. gondii* en el mundo. Modificado de la referencia (19)

1.1.4. Estructura poblacional de *T. gondii*

En 1995 Daniel Howe y David Sibley reportaron por primera vez la clasificación de la estructura poblacional para *T. gondii* en 3 cepas (tipo I, tipo II y tipo III) (23). El estudio se realizó a partir de 106 aislados de *T. gondii*, donde se buscaron 6 polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Esta clasificación demostró que existe una población clonal para *T. gondii* en Europa y Norteamérica y por lo tanto, existe una muy limitada recombinación sexual entre las cepas pertenecientes a cada uno de los linajes (23). Esta clasificación ha sido ampliamente aceptada (24). Sin embargo, recientemente se han realizado esfuerzos más intensos en buscar la estructura poblacional de *T. gondii* en aislados representativos de todo el mundo. Con el desarrollo de otras técnicas de biología molecular como PCR, análisis de DNA-microsatélite, y tipificación multilocus de secuencias, además de los RFLP, se ha demostrado que la población de *T. gondii* es más diversa de lo que se pensaba.

Hasta el 2012, se han descrito un total de 189 genotipos de *T. gondii*, identificados a partir de 1457 muestras (25). La gran mayoría de las muestras fueron obtenidas de animales domésticos y salvajes con infecciones crónicas. Para estas muestras se confirmó la infección con *T. gondii* por detección de anticuerpos anti-*toxoplasma* en el suero, seguido de bioensayos en los tejidos de aquellos animales que fueron seropositivos (25). No existe una nomenclatura estándar asignada a todos los genotipos descritos para *T. gondii*, pero se ha propuesto que a cada genotipo le sea asignado un número de acuerdo a los resultados obtenidos por el RFLP más actual (2012). En la tabla II se muestra un resumen de los genotipos más representativos (25).

Los 10 genotipos más frecuentes son #2, #3, #1, #5, #4, #9, #6, #7, #8, y #10 teniendo un porcentaje de prevalencia del 13.8%, 12.6%, 12.2%, 5%, 4.5%, 3.8%, 3.3%, 2.6%, 2.3% y 2.1%, respectivamente (25). Los genotipos #3 y #1, los cuales difieren únicamente en un locus, representan en conjunto a la tradicional cepa tipo II, sumando el 24.8% de la población total de *T. gondii* descrita (25). Los resultados también demuestran que los genotipos #1, #2 y #3 se distribuyen en todo el mundo, principalmente en Europa. Los genotipos #1, #2, #3 #4 y #5 se distribuyen principalmente en Europa. Los genotipos #2 y #3 se distribuyen en África, mientras que los genotipos #9 y #10 se distribuyen principalmente en el este de Asia (25). No se conoce la estructura poblacional en Rusia, mientras que en Australia se han obtenido únicamente 3 aislados. En Centroamérica (incluido México), *T. gondii*, muestra una estructura de población altamente diversa, en donde no se observa un genotipo dominante. Los 10 genotipos más frecuentes son #2, #6, #7, #8, #11, #3, #65, #13, #19 y #146, con un porcentaje de prevalencia del 6.8%, 6.2%, 5%, 3.7%, 3.3%, 3.1%, 3.1%, 2.5%, 2.5%, y 2.3% (25). Los autores sugieren que posiblemente la frecuencia de los genotipos cambie con un muestreo más intenso, pero se espera que los resultados mostrados de las 1457 muestras sean representativos de la diversidad de la población genética de *T. gondii* (25).

1.1.5. Susceptibilidad y resistencia a la toxoplasmosis murina

En modelos murinos de algunas enfermedades infecciosas, la susceptibilidad se define como la capacidad del parásito para inducir infección en el hospedero, como se ha descrito en infecciones como *Salmonella* spp (26), *Entamoeba histolytica* (27) y *Taenia crassiceps* (28). En la toxoplasmosis murina, la susceptibilidad se define como la capacidad de no sobrevivir a la infección y la resistencia como la capacidad de generar una infección

crónica persistente. Sin embargo, la susceptibilidad y resistencia a la toxoplasmosis murina es multifactorial y todos los factores que intervienen están relacionados. Los factores que influyen en la susceptibilidad y resistencia son: el haplotipo H-2 del ratón, la cepa de *T. gondii* (apartado 1.1.5), la dosis del parásito, la vía de inoculación y el sexo del ratón.

Genotipo convencional (basado en Howe y Sibley)	Genotipo basado en RFLP 2012	Aislados representativos	Referencia
Tipo I	#10	GT1	(29)
Tipo II (clonal)	#1	PTG	(29)
Tipo II (variante)	#3	PRU	(29)
Tipo III	#2	VEG	(29)
Tipo 12, atípico, exótico	#4	B41	(30)
Tipo 12, atípico, exótico, incluido el tipo X y tipo A	#5	ARI	(30)
Tipo BrI atípico, exótico, de África	#6	FOU, TgCatBr2	(31)
Tipo Br II, atípico, exótico	#11	TgCatBr1	(31)
Tipo BrIII atípico, exótico	#8	P89, TgCatBr3	(31)
Tipo BrIV atípico, exótico	#17	MAS	(31)
Chino 1, atípico, exótico	#9	TgCtPRC4	(32)

Tabla II. Los genotipos más frecuentes entre las cepas de *T. gondii*. Modificado de la referencia (25)

1.1.5.1. Haplotipo H-2 del ratón

Desde que comenzó el estudio de la toxoplasmosis en el modelo murino, se encontró que la cepa de ratón influye en la susceptibilidad y en la resistencia. En 1976 se demostró que existen factores genéticos en el ratón que podrían ser la causa de la mortalidad, ya que ratones congénicos infectados con una misma dosis de taquizoítos de *T. gondii* presentaron una mortalidad distinta (33). Tomando en cuenta lo anterior, en 1978 se confirmó que la susceptibilidad está ligada al haplotipo H-2 del MHC (34). En estudios posteriores se demostró que el haplotipo H-2^b se asocia con la susceptibilidad, mientras que el haplotipo H-2^d se asocia con la resistencia, tomando en cuenta que la susceptibilidad se determinó por la mortalidad (Fig. 5) (35) y por el número de quistes en cerebro (Tabla III) (36). Recientemente se ha demostrado la importancia del locus L del haplotipo H-2 durante la toxoplasmosis, ya que la proteína GRA6 de *T. gondii*, que es una proteína polimórfica secretada en la vacuola parasitófora del parásito, es la principal fuente del decapeptido HF10, el cual es presentado por la molécula H-2^d particularmente en el locus L del MHC-I a células T-CD8⁺. Cuando la presentación de este antígeno es incorrecta o inexistente, el resultado es la susceptibilidad (37).

Es reconocido ampliamente que la respuesta inmune en cada cepa de ratón tiene una polarización diferente. Los ratones B6 polarizan su respuesta inmune hacia el tipo T_h1, mientras que los ratones BALB/c polarizan su respuesta inmune hacia el tipo T_h2 (38). Por lo tanto, las diferencias en la polarización de la respuesta inmune por la cepa del ratón influyen la susceptibilidad y resistencia durante la infección con *T. gondii*.

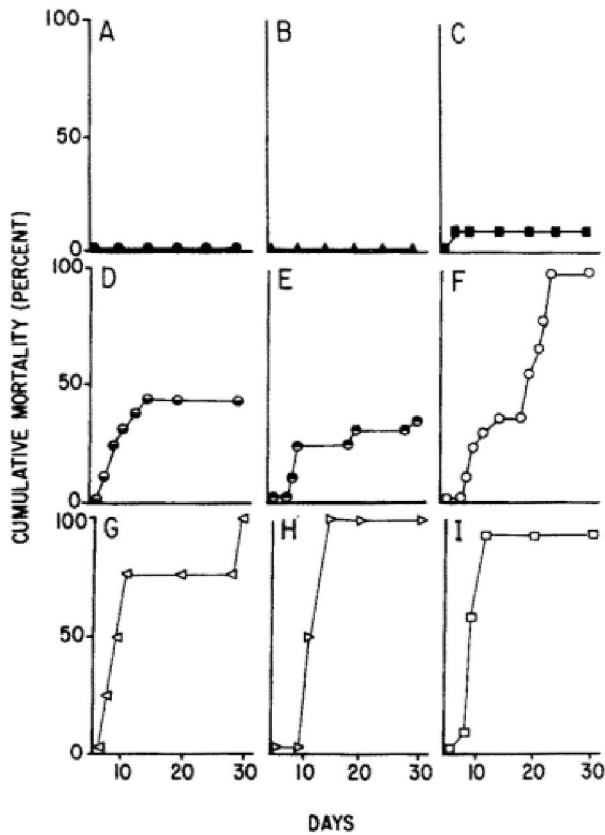


Fig. 5. Sobrevida de distintas cepas congénicas de ratón, los cuales fueron infectados con quistes de *T. gondii* por vía oral. A) A/J [k], B) C3H/HeJ [k], C) DBA2/J [d], E) BALB/c [d], F) C57L/J [b], G) SJL/J [s2], H) SB/LE [b], I) B6 [b]. Modificado de referencia (59). [Haplotipo].

Cepa	Haplotipo H-2					Promedio del n° de quistes ± D.E.
	K	A	D	E	L	
B6	B	B	B	b	b	49±40
BALB/c	D	D	B	d	D	2±1
B10.BAR6	K	K	K	b	B	60±25
B10.BAR12	B	B	B	d	D	2±1
BALB/c-H-2 ^{dm2}	D	D	D	d	-	341±115

Tabla III. Efecto del haplotipo y mutaciones del gen H-2 en la formación de quistes después de la infección oral con la cepa Me49 de *T. gondii*. Modificado de (36)

1.1.5.2. Dosis del parásito

En cepas altamente virulentas de *T. gondii* (cepas tipo I, #10, Tabla II) no existe susceptibilidad dependiente de la dosis, ya que la dosis letal es de 1 taquizoíto independientemente del haplotipo del ratón (Tabla II) (39,40). Cuando se hacen experimentos en el modelo murino con cepas formadoras de quistes [tipo II (#1) o tipo III (#2) Tabla II], el estadio de *T. gondii* utilizado para infectar ratones es el quiste (bradizoítos) y la susceptibilidad está relacionada directamente con el número inoculado de quistes; por lo tanto, entre más quistes se inoculen al ratón mayor será la susceptibilidad. (41). De manera interesante, ratones de la cepa CBA/Ca son resistentes en la fase aguda de la infección, no importando con cuántos quistes sean infectados, pero presentan una mortalidad incrementada en la fase crónica de la infección (cerca de los 6 meses post-infección) (41).

1.1.5.3. Sexo

Los ratones hembras son más susceptibles a la toxoplasmosis que los ratones machos (41-44). Se ha descrito que en la susceptibilidad ligada al sexo, las hormonas juegan un papel primordial, ya que en ratones hembras B6, que son más susceptibles a la infección con 100 quistes de *T. gondii*, la administración de testosterona resulta en una carga parasitaria y patología disminuidas (42). También se ha sugerido que los ratones machos son más resistentes a la toxoplasmosis porque producen más rápidamente IL-12 que las hembras, lo cual favorece la activación del sistema inmune y la producción de IFN- γ (44). Por lo tanto, el sexo del ratón influencia la susceptibilidad durante la infección con *T. gondii*.

1.1.5.4. Vía de inoculación

La inoculación con quistes de *T. gondii* por vía oral induce susceptibilidad o resistencia, dependiendo del haplotipo H-2 del ratón (apartado 1.1.8.1). Así, los ratones BALB/c (haplotipo H-2d) son resistentes a la infección oral, mientras que los ratones B6 (haplotipo H-2^b) son susceptibles al ser infectados por la misma vía (Fig. 5, Tabla III). Sin embargo, el escenario cambia cuando se inocula a *T. gondii* por vía intraperitoneal (ip), ya que la cepa BALB/c se torna susceptible (33,45), mientras que la B6 se vuelve resistente. El cambio en la susceptibilidad es el resultado de una respuesta inmune incrementada, causada principalmente por una migración deteriorada de monocitos inflamatorios del peritoneo hacia la periferia, lo que concluye en inflamación localizada severa, falla en controlar la replicación del parásito y en consecuencia la mortalidad del hospedero (46). Lo anterior se ha descrito con cepas tipo II (#1) de *T. gondii*.

1.1.6. Respuesta inmune

Existen 2 mecanismos descritos en el modelo murino por los que la respuesta inmune reconoce a *T. gondii*: el primero es por medio de la ciclofilina-18 de *T. gondii*, la cual se une al receptor de quimiocinas 5 (CCR5) que se encuentra en células dendríticas (DC) (47,48). Esta unión estimula la producción de IL-12 por parte de las DC (Fig. 6) (47,48). La ausencia del receptor CCR5 induce una producción disminuida de IL-12 por parte de las DC (47,48). El otro mecanismo de reconocimiento del parásito es a través del Receptor Tipo Toll 11 (TLR-11), el cual reconoce a la profilina (proteína de unión a actina) del parásito (Fig. 6) (49). Ratones deficientes en TLR-11 son susceptibles a la infección con *T. gondii* y presentan producción disminuida de IL-12 (50-52). Por lo tanto, las principales

células productoras de IL-12 durante la infección con *T. gondii* son las DC (53). La función principal de la IL-12 es activar a linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ y células NK (54,55) para que produzcan altos niveles de IFN- γ (Fig. 6) (56,57). El IFN- γ es la principal citocina mediadora de la resistencia contra *T. gondii* (58). La ausencia del IFN- γ o de su señalización durante la toxoplasmosis genera un aumento exacerbado de la carga parasitaria y en consecuencia la muerte del hospedero (59,60). En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que el IFN- γ activa a fagocitos para que produzcan intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno que eliminan al parásito (Fig. 6) (61,62). Sin embargo, el IFN- γ requiere adicionalmente del TNF- α , el cual induce la actividad anti-microbica de los macrófagos y amplifica la respuesta inmune contra el parásito (Fig. 6) (63). Por lo tanto, la protección inducida por la respuesta inmune contra *T. gondii* es del tipo T_h1 en la fase aguda de la infección. Sin embargo, esta respuesta T_h1 se puede exacerbar y generar patología severa en múltiples órganos, incluido el intestino y el hígado (57,64). Por lo tanto, se requieren mecanismos que modulen la respuesta inmune T_h1. Se ha demostrado que la IL-10 (65-67) el TGF- β (68), la IL-27 (69) y la lipoxina-4 (LXA₄) (70) juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune T_h1 durante la toxoplasmosis (Fig. 6).

La respuesta inmune protectora contra *T. gondii* es mediada por células T. Sin embargo, se ha descrito que las células B participan durante la toxoplasmosis murina ya que los anticuerpos que producen estas células tienen un papel fundamental en la opsonización, fagocitosis y muerte de parásitos extracelulares (57). Además, las células B forman parte fundamental de la respuesta inmune crónica en el modelo murino, ya que ratones depletados de células B sobreviven a la fase aguda de la infección, pero mueren de

encefalitis toxoplásmica de 3 a 4 semanas post-infección (71). Finalmente, los anticuerpos producidos por las células B son indicadores de la fase aguda (producción de altos niveles de IgM) o de la fase crónica (producción de altos niveles de IgG) de la infección (18).

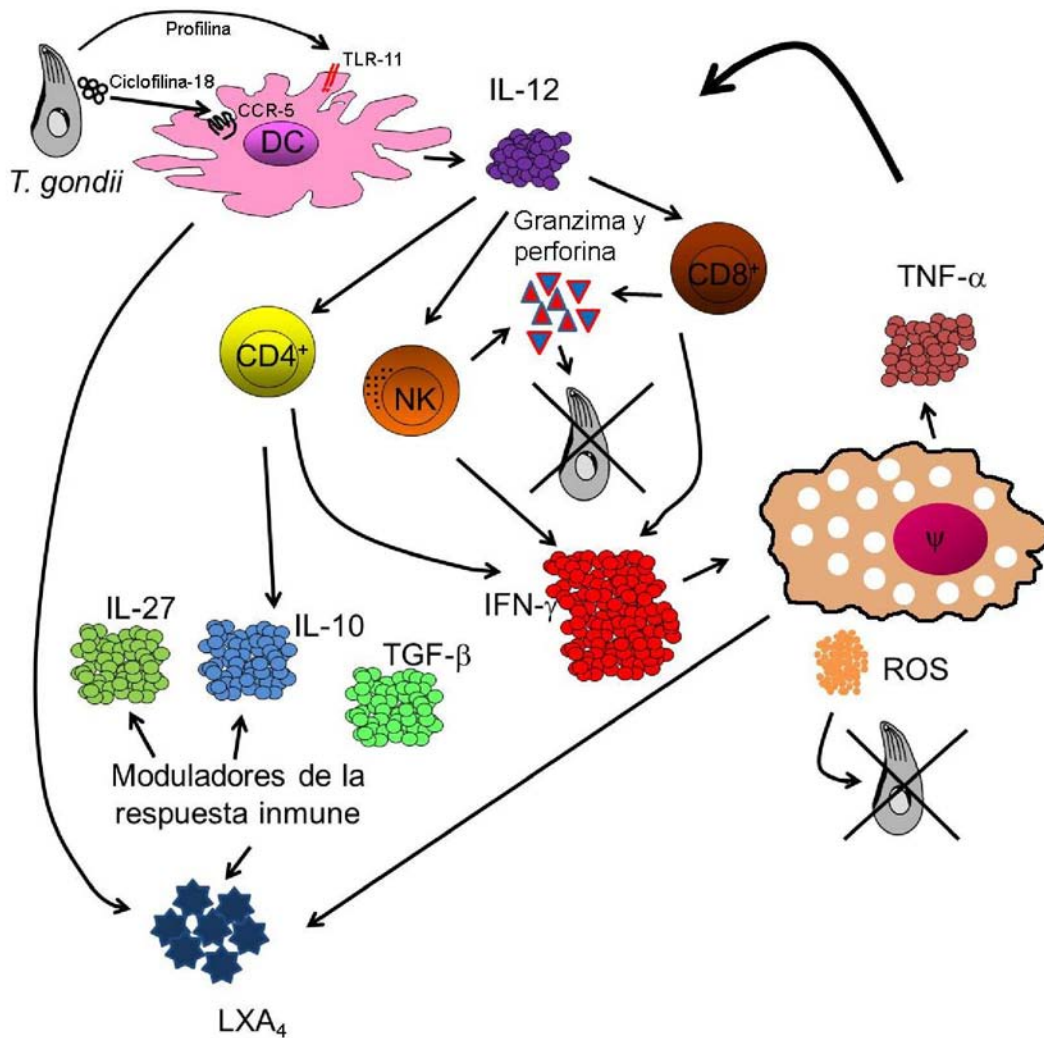


Fig. 6. Respuesta inmune contra *T. gondii*. Después de reconocer a la ciclofilina-18 del parásito por el receptor CCR5, o a la Profilina por parte del TLR-11, las células dendríticas (DC) producen IL-12, la cual activa linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y células asesinas naturales (NK) para producir altos niveles de IFN-γ. El IFN-γ activa macrófagos (ψ) para que produzcan especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales eliminan a *T. gondii*. También los macrófagos producen TNF-α, el cual se encarga de amplificar la respuesta Th1. Las células NK y TCD8⁺ producen Granzima y Perforina, que eliminan al parásito. Para evitar una respuesta Th1 exacerbada que induzca patología, se requiere de la regulación por parte de la IL-10 que es producida por células CD4⁺, de la lipoxina-A₄ (LXA₄) que es producida por macrófagos y DC, o de la IL-27 y del TGF-β.

Desde finales de los años sesenta se reconoció que las células T no sólo participaban en la activación de la respuesta inmune, sino que también intervenían en la modulación de ésta. En 1969 se demostró que la extracción del timo de ratones normales a los 2 y 4 días de haber nacido resultaba en una destrucción severa de los ovarios. En ese momento se sugirió que había una hormona secretada en el timo que ayudaba al mantenimiento de los ovarios en los ratones (72). En experimentos posteriores se observó que no sólo existía destrucción de los ovarios por la extracción del timo, sino también existía la presencia de auto-anticuerpos en la circulación, así como el desarrollo de múltiples enfermedades inflamatorias como tiroiditis, colitis y prostatitis (73). En 1973 se demostró que la extracción del timo y una intensa irradiación a ratas adultas, indujo tiroiditis acompañada de producción de auto-anticuerpos (74). Sin embargo, el desarrollo tecnológico de ese tiempo no favoreció a que se demostrara la existencia de una población pura de células T que pudiera participar en la regulación de la respuesta inmune (75,76).

En 1985 Shimon Sakaguchi observó que la transferencia adoptiva de células T carentes del marcador CD5 (Ly-1⁺) a ratones desnudos (*nu/nu*), induce inflamación del intestino. Cuando realizó experimentos de transferencia adoptiva a los mismos ratones incluyendo la población de células CD4⁺CD5⁺ no observó el desarrollo de inflamación intestinal. (77). En el año 1990 Fiona Powrie describió que la población de células T-CD4⁺CD45RB^{low} evita el rechazo de trasplantes de piel en ratas atímicas (78). En el año 1995, Sakaguchi describió que la tolerancia inmunológica es mantenida por células T-CD4⁺ que expresan la molécula CD25 (79). Es en 1995 cuando empieza formalmente el estudio científico y la descripción de las células Tregs.

Las células Tregs son una subpoblación de células T-CD4⁺ que suprimen la respuesta inmune fisiológica y patológica, contribuyendo al mantenimiento de la tolerancia inmunológica y a la homeostasis inmune (80-82). Las células Tregs se clasifican de acuerdo a su desarrollo y su fenotipo en células Tregs naturales y adaptativas (83,84).

1.2.1. Células Tregs naturales

Las células Tregs naturales se originan en el timo como una población de células maduras (Fig. 7A) (83,84). En la periferia comprenden del 5 al 10% de las células CD4⁺ (79) y constitutivamente expresan el factor de transcripción Foxp3, que les sirve como regulador transcripcional de su desarrollo y su función reguladora de la respuesta inmune (85,86). El factor de transcripción Foxp3 es el único marcador específico de las células Tregs en ratones; se ha descrito que ratones carentes de Foxp3 (*scurfy*), desarrollan el síndrome de linfoproliferación autoinmune y producen citocinas inflamatorias sin control ocasionando su muerte de 4 a 5 semanas después de nacer (87). La autoinmunidad observada en los ratones *scurfy* es muy similar al síndrome IPEX en humanos (Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado al cromosoma X), que se caracteriza por autoinmunidad agresiva causada por mutaciones en el gen Foxp3 (88). Sin embargo, se ha demostrado que en células humanas, Foxp3 se expresa después de estimular el TCR de células CD4⁺ no reguladoras, lo que sugiere que Foxp3 es un marcador de activación en humanos (89,90).

Las células Tregs naturales expresan algunos marcadores de superficie constitutivamente en su superficie: CD25, CTLA-4, GITR, y LAG-3 (Fig. 7A) (76,91). Sin embargo, estos marcadores también son expresados cuando las células T naïve se activan y por lo tanto, no

son exclusivos de la población de las células Tregs (91). En ratones, Foxp3 es expresado exclusivamente en las células Tregs naturales, pero se puede inducir su expresión en otras de células T activadas CD4⁺ y CD8⁺, confiriéndoles actividad supresora (86).

1.2.2. Células Tregs adaptativas

Las células Tregs adaptativas pueden ser inducidas bajo condiciones anti-inflamatorias en la periferia después de entrar en contacto con las células presentadoras de antígeno, en particular DC (92). Por lo tanto, las DC no participan únicamente en la activación de células efectoras, sino también regulan la activación de las células, induciendo tolerancia (93). Estas DC se conocen como células DC tolerogénicas (94), se caracterizan por ser inducidas mediante células Tregs (Fig. 7D) (95) o por el microambiente anti-inflamatorio que incluye citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 o el TGF- β (Fig. 8B) (96,97). Una DC tolerogénica tiene un fenotipo con baja expresión de MHC II, CD40, CD80 y CD86, alta expresión de CD103 (98) y baja producción de IL-12 (84,92).

Las células T naïve pueden diferenciarse en células tipo-Tregs naturales, que expresan Foxp3⁺ bajo ciertas condiciones en modelos *in vivo* e *in vitro* (Fig. 8C-D) (99,100). Además de ser inducidas por DC, las células Tregs adaptativas se pueden desarrollar fuera del timo a partir de células TCD4⁺ naïve (Fig. 8A) (101). En general, el desarrollo en periferia de las células Tregs adaptativas depende de la estimulación antigénica específica, y de la estimulación por citocinas (Fig. 8B), dando como resultado a las células Tr1 que se caracterizan por secretar IL-10 (Fig. 8B) (102-105) y a las células T_h3, que secretan el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , Fig. 8B) (106). Las células Tr1 y Th3 se caracterizan por no expresar Foxp3 constitutivamente (107) (Fig. 8B), sin embargo lo

pueden llegar a expresar, dependiendo del microambiente y de la estimulación antigénica (100).

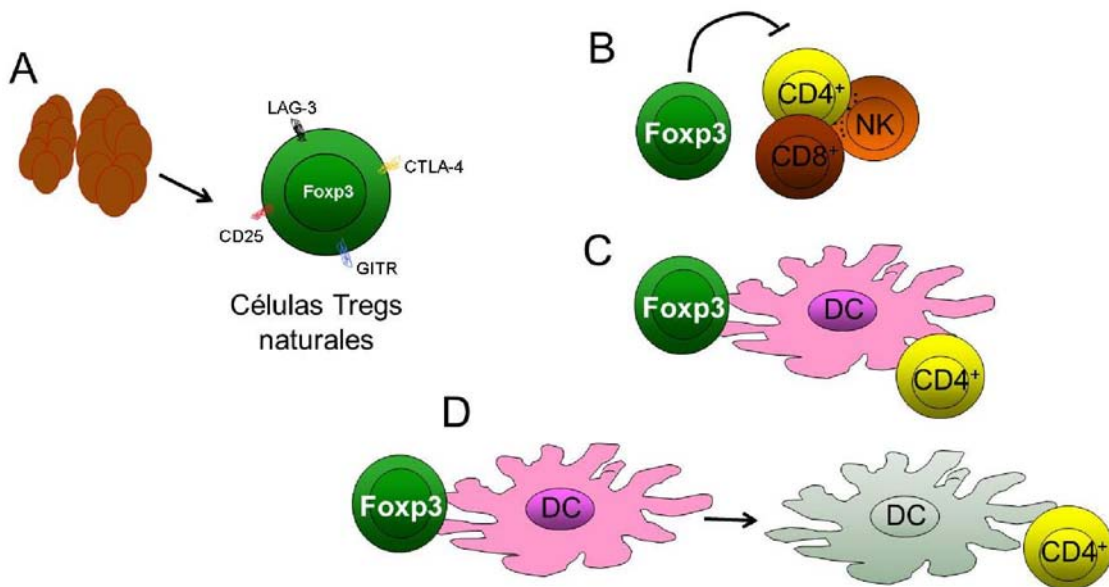


Fig. 7. Desarrollo y función de las células Tregs naturales. A) Después de desarrollarse en el timo y migrar a periferia, las células Tregs naturales B) suprimen directamente la actividad efectora de los linfocitos o C) pueden utilizar a las células DC para que supriman indirectamente a los linfocitos. D) Las células Tregs naturales pueden inducir a que las DC sean tolerogénicas para que supriman a los linfocitos.

1.2.3. Mecanismos de supresión

Las células Tregs naturales suprimen la proliferación de células T $CD4^+$ y $CD8^+$, así como su producción de citocinas en presencia o ausencia de células presentadoras de antígeno (APC) (Fig 7B-C) (108-111). Las células Tregs también suprimen la proliferación de células B incluyendo la producción de inmunoglobulinas y el cambio de isotipo (112). Asimismo, las Tregs suprimen la función citotóxica de células NK (113) y la función y maduración de las DC (Fig. 7B) (114). Los mecanismos por los que las células Tregs suprimen a otras células son: por moléculas de superficie (interacciones célula-célula), citocinas, y disrupción metabólica.

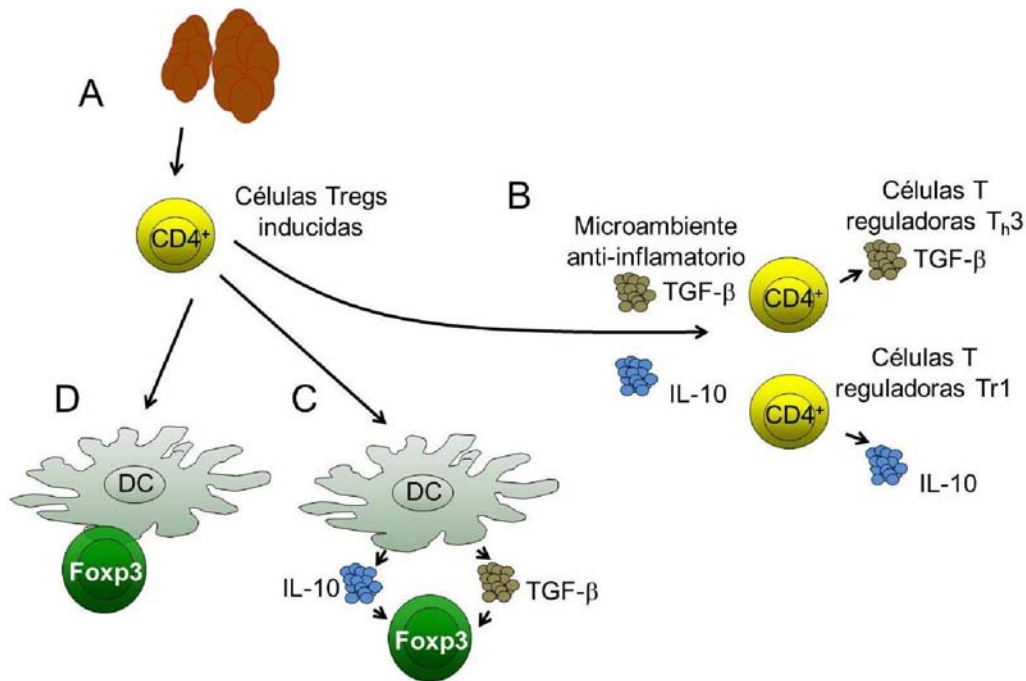


Fig. 8. Desarrollo y función de las células Tregs inducidas. A) Después de desarrollarse en el timo y migrar a periferia, las células T- $CD4$ pueden convertirse en células Tregs por b) el microambiente anti-inflamatorio, particularmente por citocinas como la IL-10 y el TGF- β , dando como resultado a las poblaciones de células Tregs T_h3 que producen TGF- β o Tr1 que producen IL-10 y que pueden o no expresar el Factor de transcripción Foxp3; por C) las citocinas anti-inflamatorias producidas por las DC tolerogénicas o por D) el condicionamiento directo de las células DC tolerogénicas.

1.2.3.1. Moléculas de superficie

La inducción de la actividad supresora de las Tregs requiere en algunos casos del contacto célula-célula (115) a través de moléculas de membrana entre la célula Treg y la APC, la cual funciona como intermediaria (Fig. 7C-D) o entre las células Tregs y la célula no reguladora, lo cual se ha demostrado usando “transwells” (110,116). La supresión por contacto es consecuencia de la unión de ciertas moléculas de membrana expresadas en las células T como CTLA-4 y LAG3, las cuales interactúan con sus ligandos en la APC o en la célula no reguladora (Fig. 9A).

La molécula CTLA-4 expresada en la célula Treg activa la inducción de la enzima indoleamin 2,3-dioxigenasa (IDO) en las DC o en la célula no reguladora. IDO cataliza la conversión del triptófano en cineurina y otros metabolitos (117,118), lo que da como resultado muy poca disponibilidad de triptofano libre, el cual es requerido para la proliferación celular (Fig. 9A) (119-122).

LAG3 (Lymphocyte activation gene 3, o CD223), es una molécula de adhesión asociada a CD4 que se une al MHC II en la APC o en la célula no reguladora (Fig. 9A) (123). Se expresa en la superficie de las células Tregs constitutivamente, y en las células T en general después de activarse (123). Anticuerpos contra LAG3 eliminan la supresión de las Tregs *in vivo*. La actividad supresora de ratones knock-out (KO) para LAG3 se reduce *in vitro* y la expresión ectópica de LAG3 en células T naïve les confiere función supresora. Sin embargo, ratones deficientes en LAG3 no presentan enfermedades autoinmunes (123).

1.2.3.2. Citocinas

Las citocinas producidas por las células Tregs son otro mecanismo que puede inducir la supresión de la respuesta inmune. Se ha descrito una participación fundamental para la IL-10, el TGF- β y la IL-35.

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que juega un papel crucial en prevenir patologías autoinmunes e inflamatorias (124). Ratones deficientes en IL-10 desarrollan la enfermedad inflamatoria del intestino y presentan una respuesta inflamatoria exacerbada a distintos microorganismos (124). Aunque en algunos casos la respuesta exacerbada favorezca la eliminación de algunos patógenos, también existe la posibilidad de desarrollar patología en ausencia de IL-10 (125). Se describió primeramente como una citocina del tipo T_h2 , sin embargo, también es producida por células Tregs (125). Actualmente se conoce que la IL-10 se expresa por un amplio rango de células de la respuesta inmune, las cuales incluyen células T_h1 , T_h2 , T_h17 , Tregs de intestino, T- $CD8^+$, B, macrófagos, DC, neutrófilos, eosinófilos y NK. (125). Un ejemplo de la participación de la IL-10 en la modulación de la respuesta inmune inducida por células Tregs es que la transferencia adoptiva de células T $CD4^+CD25^+$ indujo tolerancia en ratones a los que se les realizó trasplante alotéxico de piel y la inyección de anticuerpo que bloquea el receptor de IL-10 aceleró el rechazo al trasplante (126).

El TGF- β es una citocina expresada en múltiples órganos incluidos el intestino y el hígado que tiene la capacidad de controlar la respuesta inmune. Se ha descrito en forma soluble y anclada a la membrana de células Tregs humanas y murinas (Fig. 9B) (127). Sin embargo, existen reportes donde las Tregs aisladas de ratones KO para TGF- β exhiben actividad

supresora normal *in vitro* (128). Además de mediar la supresión ejercida por las Tregs, el TGF- β se requiere en el mantenimiento de las Tregs naturales, ya que ratones KO para TGF- β o el receptor del TGF- β (129) presentan un número reducido de células Tregs (130) y desarrollan autoinmunidad (131)

Recientemente se ha descrito a la IL-35 como una citocina inhibitoria que es expresada preferencialmente en células Tregs (Fig. 9B) (119,132). La IL-35 es miembro de la familia de la IL-12. La expresión ectópica de la IL-35 en células T naïve les confiere actividad supresora (119,133). Sin embargo, se requieren más estudios para conocer más a fondo cuál es su función dentro de la supresión ejercida por las células Tregs.

1.2.3.3. Disrupción metabólica

La IL-2 se requiere para el mantenimiento de las células Tregs en la periferia y para que ejerzan su función supresora, ya que las células Tregs constitutivamente expresan el receptor de alta afinidad de la IL-2 (134). Ratones deficientes en IL-2 presentan cantidades reducidas de células Tregs Foxp3⁺ (135) y desarrollan espontáneamente la enfermedad inflamatoria del intestino entre las 6 y 15 semanas de edad, muriendo entre las 10 y 25 semanas de edad (135). En la supresión que ejercen directamente las células Tregs sobre células no reguladoras, se ha descrito que las células Tregs consumen la IL-2 del medio debido a su receptor de alta afinidad; este mecanismo se conoce como disrupción metabólica (Fig. 9C) (110,135-138). También se ha propuesto que la supresión ejercida por las células Tregs vía el consumo de IL-2 es dependiente de la presencia del TGF- β (139).

Además de la supresión mediada por la IL-2, las células Tregs pueden inducir disrupción metabólica por la liberación extracelular de nucleósidos de adenosina. Las células Tregs

expresan en su membrana las ecto-enzimas CD39 y CD73, que generan adenosina extracelular, la cual suprime a células no reguladoras que expresen el receptor de adenosina 2 ($A_{2A}R$) (Fig. 9D) (140-142).

Otros mecanismos efectores de la supresión de las células Tregs incluyen la liberación de perforina y granzima-A (fig. 9E) (143-145). Posiblemente existan otros mecanismos de supresión por parte de las células Tregs que serán descritos en el futuro, e inclusive los mecanismos actuales pueden llegar a ser más complejos (Fig. 9F).

1.3. El IFN- γ

Los interferones se descubrieron como agentes que interfieren en la replicación de los virus (146). Los interferones se clasifican por la especificidad a su receptor en la clase I, II y recientemente III. Los interferones tipo I se unen al receptor IFNAR, los interferones tipo II se unen al receptor IFNGR y los interferones tipo III se unen al receptor IFN λ R1 o CRF2-12 (147). Los interferones tipo I incluyen al IFN- α , β , ω y τ , los interferones tipo II incluyen exclusivamente al interferón- γ (IFN- γ) (148,149), mientras que los interferones tipo III incluyen al IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3 o IL-29, IL-28A e IL-28B respectivamente (147,150).

El IFN- γ es una proteína dimérica compuesta de 146 aminoácidos (151). Se han descrito 2 formas moleculares de la proteína en su forma activa, con un peso de 20 y 25 KDa; estas diferencias en el peso se deben a cambios en sus patrones de glicosilación (151). El IFN- γ muestra homología estructural proteica cercana al 40% con los interferones tipo I (151).

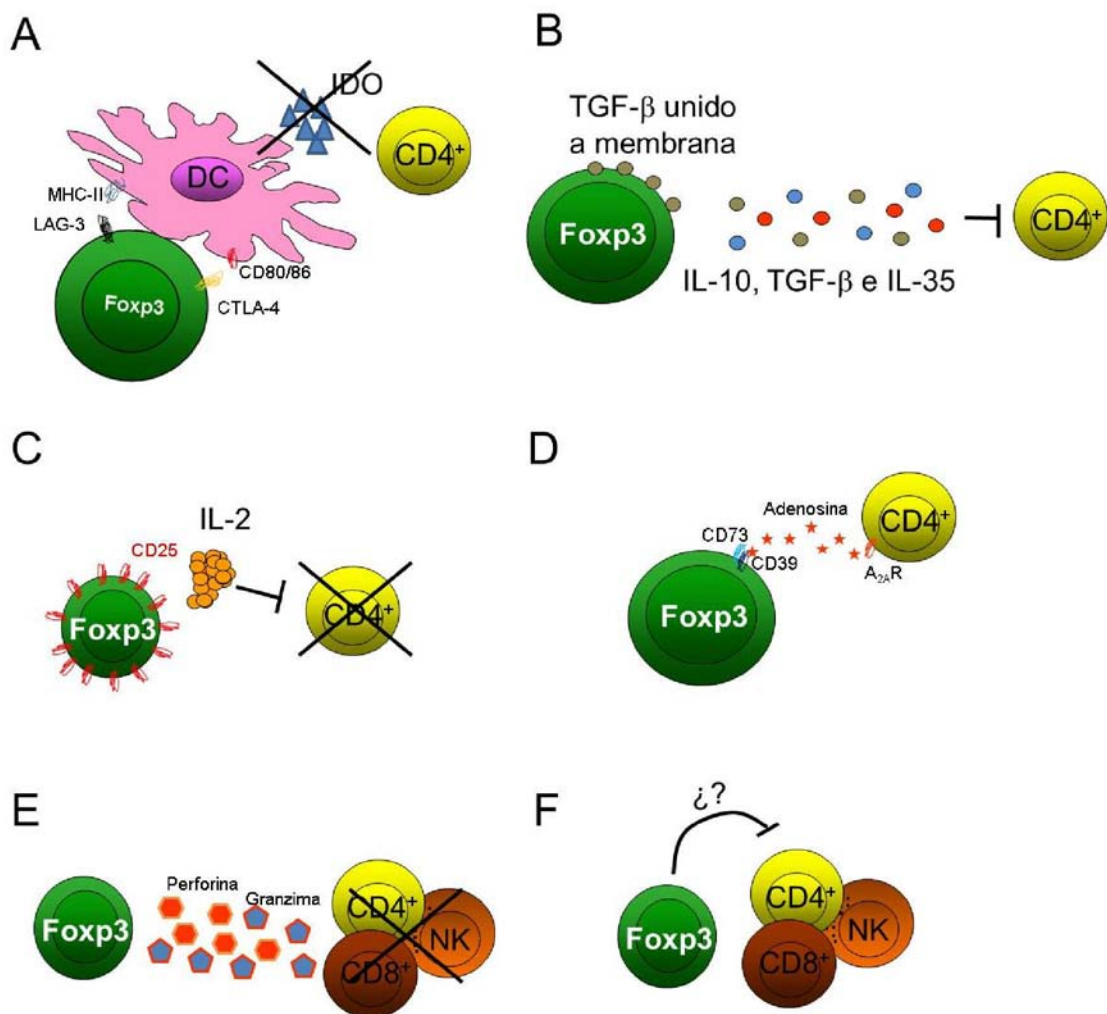


Fig. 9. Mecanismos de supresión que ejercen las células Tregs. A) Por medio de las moléculas CTLA-4 y LAG-3, las células Tregs condicionan a DC que reducen la disponibilidad de IDO en el microambiente para las células no reguladoras. B) Las células Tregs suprimen vía factores solubles como la IL-10. La IL-35 o el TGF- β . C) También pueden suprimir por disrupción metabólica vía IL-2 D) o por las ecto-enzimas CD73-CD39. E) Se ha descrito la secreción de Perforina y Granzima como mecanismo supresor. F) Probablemente existan otros mecanismos por describir.

El IFN- γ se produce principalmente por células T-CD4⁺, T-CD8⁺ y células asesinas naturales (NK). Sin embargo, se ha demostrado que las células B, T-NK, y APC también pueden secretar IFN- γ en menor grado (152-155). El IFN- γ es la principal citocina que caracteriza una respuesta inmune pro-inflamatoria del tipo T_h1. Se ha descrito su participación primaria en la activación y función efectora de los macrófagos, induciendo directamente sus mecanismos anti-microbiales y antitumorales como la producción de especies reactivas del oxígeno (156,157), además de sobre-regular el procesamiento las vías de señalización y de presentación antigénicas (157,158). Su función no sólo se restringe a la activación de macrófagos y APC en general, sino también participa en la amplificación de la actividad de las células NK (152) y en regular la función, producción y el cambio de clase de las inmunoglobulinas de las células B (159). El IFN- γ induce la sobre-expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, lo cual aumenta la cantidad y diversidad de péptidos presentados en la superficie de las células presentadoras de antígeno (158), y favorece la expresión del MHC-II en células que no expresan constitutivamente esa molécula (158,160).

Para que exista la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T, es necesario que exista entrecruzamiento del TCR (158) en conjunto con la estimulación de quimiocinas como MIP-1 α (161) y citocinas como la IL-12 e IL-18, las cuales son producidas por APC (162,163). Para que las células NK produzcan IFN- γ se requiere de citocinas producidas por macrófagos, como el TNF- α y la IL-12 (162,163). Como el IFN- γ es muy tóxico, no se debe producir de manera exacerbada, por lo tanto existen reguladores negativos de su producción que incluyen citocinas como la IL-4, IL-10, TGF- β , así como glucocorticoides (162,164,165).

1.3.1. El receptor del IFN- γ y su señalización

El receptor del IFN- γ está conformado por dos cadenas IFNGR1, las cuales se asocian con dos cadenas IFNGR2 (166,167). Las cadenas IFNGR1 se expresan constitutivamente en algunos tipos celulares, pero el factor limitante son las cadenas IFNGR2, que son reguladas de acuerdo al estado de diferenciación o activación celular (148,168). El dominio intracelular del IFNGR1 contiene motivos de asociación para la cinasa de tirosina de Janus (Jak1) y para un factor citosólico latente, llamado STAT-1 (“signal transducer and activator of transcription”, por sus siglas en inglés) (169,170).

La fosforilación de STAT-1 es esencial para activar la transcripción de genes blanco. Los interferones tipo I y II inducen la fosforilación de STAT-1 principalmente, pero también se puede inducir su fosforilación por el lipopolisacárido, la IL-12, IL-2 y el TNF- α (171-173). Una vez que STAT-1 como homodímero es fosforilado, entra al núcleo y se une a elementos promotores para suprimir la transcripción de genes que regulan al IFN- γ ; en consecuencia existe la transcripción de genes como la sintasa de óxido nítrico (iNOS), IFN- β y de factores de transcripción como el Factor Regulador del Interferón (IRF) -1, el cual a su vez favorece la transcripción del gen STAT-1 (174-176).

La activación de STAT-1 *in vitro* se inhibe con niveles exacerbados de IFN- γ (177). Otra manera de inhibir la activación de STAT-1 es a través de la molécula SOCS-1 (supresor de la señalización por citocinas 1), el cual se asocia a las cinasas JAK 1/2, interfiriendo con su actividad de cinasas de tirosina y por lo tanto, inhibiendo la señalización inducida por el IFN- γ (176). La sobre-expresión de SOCS-1 en ratones transgénicos causa la

pérdida de respuesta al IFN- γ , mientras que ratones SOCS-1 KO producen IFN- γ de manera exacerbada en respuesta a infecciones microbianas (178,179).

Los ratones KO para la citocina IFN- γ , para el receptor de IFN- γ o para su señalización (STAT-1) no presentan defectos ni en el desarrollo ni en el fenotipo, aparentando una funcionalidad completa del sistema inmune (180,181). Sin embargo, estos ratones presentan deficiencias en la resistencia a infecciones virales, bacterianas y parasitarias (182,183). Las células T de los ratones STAT-1 KO presentan una proliferación incrementada, debido a una insuficiencia en la producción de caspasas, lo que evita el desarrollo del programa apoptótico (184). Pacientes con mutaciones que inactivan el gen que codifica para los genes IFNGR1ó 2, presentan un fenotipo similar al de los ratones KO para el receptor de IFN- γ , siendo altamente susceptibles a bacterias de baja virulencia (185,186). Sin embargo, se ha asociado que polimorfismos naturales en el gen de IFN- γ , que no tienen resultados adversos en la respuesta a infecciones bacterianas, virales o parasitarias, pueden prevenir el desarrollo de enfermedades relacionadas con la inflamación, como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, osteoporosis y diabetes (187,188).

1.3.2. Apoptosis inducida por IFN- γ

Algunos tipos celulares son producidos en grandes cantidades a partir de la médula ósea, y la gran mayoría mueren después de su producción por medio de apoptosis (muerte celular programada) (189). El IFN- γ arresta el ciclo celular para proveer señales de sobrevida, o que a su vez, el arresto es una señal pro-apoptótica (189). Sin embargo, los niveles de IRF-1 pueden ser la pieza clave para que el IFN- γ induzca apoptosis o proteja a la célula de ella

(168,190,191). También se ha sugerido que el tiempo en el que se activa STAT-1 tendrá como consecuencia apoptosis o sobrevida de la célula, si se activa rápidamente, inducirá una señal apoptótica (168). También la apoptosis por caspasa-1, la expresión de FAS y el receptor de TNF- α en la célula apoptótica se puede inducir por el IFN- γ (192-194).

2. Antecedentes directos

2.1. Participación de las células Tregs durante la infección con *T. gondii*

Además de la tolerancia a lo propio, las células Tregs participan en el control de la supresión de la respuesta inmune contra células tumorales (195), de alérgenos (90), de trasplantes de órganos alogénicos (196), del feto durante el embarazo (197) y de microbios comensales o patógenos (198).

La participación de las células Tregs ha sido descrita en varias enfermedades infecciosas y se puede resumir en dos grupos distintos (Tabla IV): en el primer grupo se enlistan aquellas infecciones donde aumenta el número de células Tregs, lo cual limita la respuesta inmune y promueve la persistencia del parásito (Tabla IV) (199). En el segundo grupo la capacidad supresora de las células Tregs se ve reducida, lo que concluye en una respuesta inmune exacerbada y en la muerte del hospedero (Tabla IV) (200,201). En el caso de algunas enfermedades infecciosas no se ha dilucidado qué papel juegan las células Tregs, posiblemente por las estrategias experimentales que se han utilizado. (Tabla IV) (200,201).

Durante la infección con *T. gondii* en la cepa de ratón B6, se ha descrito que las células Tregs disminuyen (202-207), lo cual es consecuencia de 3 mecanismos que incluyen: la disminución en la producción de la IL-2 por células CD4⁺ (206) la transformación de las células Tregs CD4⁺Foxp3⁺ hacia un fenotipo inflamatorio CD4⁺Foxp3⁺T-bet⁺IFN- γ ⁺ (206) y, la muerte de las células Tregs por el aumento de las moléculas apoptóticas anexina V y caspasa 3 (206). La disminución en la producción de IL-2 por células T_H1 CD4⁺ es la causa principal tanto de la incapacidad de las células Tregs para suprimir la respuesta efectora

Papel de las células Tregs	Parásito que causa la infección	Referencias
Controlar la respuesta inmune	<i>Leishmania major</i>	(208-210)
	<i>Leishmania amazonensis</i>	(211)
	<i>Schistosoma mansoni</i>	(212-214)
	<i>Trypanosoma congolense</i>	(215)
	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	(216,217)
Ineficientes ante una respuesta inmune exacerbada	<i>Litomosoides sigmodontis</i>	(218-220)
	<i>Plasmodium berghei</i>	(221)
No hay papel de las células Tregs	<i>Plasmodium yoeli</i>	(222)
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	(223-225)

Tabla IV. Papel de las células Tregs durante distintas enfermedades infecciosas

durante la toxoplasmosis, así como de la limitada sobrevivencia de las células Tregs, lo que resulta en la patología y en la mortalidad del hospedero (206). Otro grupo de investigación confirmó que la disminución en la producción de IL-2 es el mecanismo principal por el que disminuyen las células Tregs durante la toxoplasmosis y durante una infección por virus (vaccinia) y una infección por bacteria (*L. monocytogenes*) en la cepa de ratón B6 (202). Sin embargo, en este trabajo se concluye, contrariamente a lo publicado previamente (206), que la disminución de células Tregs debe ser necesaria y transitoria en la fase aguda de la infección para el desarrollo de una respuesta inmune óptima (principalmente de células T), lo que tendrá como resultado la resistencia del hospedero (202).

Nosotros demostramos que existe una disminución del 50% de células Tregs durante la fase aguda de la toxoplasmosis en la cepa de ratón BALB/c, la cual es resistente a la infección. Sin embargo, cuando la disminución de células Tregs alcanza el 75%, existe susceptibilidad. Concluimos que las células Tregs son esenciales durante la protección en la fase aguda de la toxoplasmosis.

Durante el embarazo hay un incremento de las células Tregs en la placenta, mientras que la ausencia de células Tregs induce aborto (226,227). Debido a que durante la toxoplasmosis existe disminución de células Tregs, se ha demostrado en el modelo murino que esta disminución está implicada en el aborto, y que la transferencia adoptiva de células Tregs lo previene (205). Asimismo, la administración de antígenos excretorios-secretorios de *T. gondii* también inducen disminución de células Tregs y aborto, pero la transferencia adoptiva de células Tregs reduce el índice de aborto (203).

En la fase aguda de la toxoplasmosis existe incapacidad de los linfocitos T de proliferar ante estímulos mitogénicos y antigénicos (110). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las células Tregs están implicadas en este fenómeno, debido a que presentan un fenotipo de activación, lo que las hace más eficientes al suprimir células T $CD4^+CD25^-$ $Foxp3^-$ *in vitro*, aun cuando están disminuidas en porcentaje y número durante la fase aguda de la infección (228). Asimismo, reportamos que la disrupción metabólica por el consumo de IL-2 es consecuencia de una competencia entre las células Tregs y las células T y no se requiere de la presencia de APC (110). Por lo tanto, la competencia por el consumo de la IL-2 entre las células Tregs y las células T activadas *in vitro* es la causa de la inmunosupresión observada durante la toxoplasmosis, y la muerte de las células T es consecuencia de la carencia de IL-2 (110).

Recientemente se ha demostrado que se requiere del IFN- γ de manera sistémica y de la IL-27 de manera localizada para que las células Tregs sean útiles en la modulación de la respuesta inmune durante la toxoplasmosis (229). Por otro lado, se demostró que el IFN- γ inhibe la producción del TGF- β en el intestino, induciendo que las células Tregs no expresen la ectonucleotidasa CD73, lo que disminuye la capacidad supresora de las células Tregs durante la respuesta inmune contra *T. gondii* (230).

2.2. Justificación

Como se mencionó anteriormente, las células Tregs participan en la protección durante la fase aguda de la toxoplasmosis y los niveles de células Tregs correlacionan con la resistencia a la infección (207,231-233). Asimismo, existe una disminución de esta población de células T durante la toxoplasmosis aguda (202-206,228). Sin embargo, se han propuesto dos hipótesis para explicar este fenómeno: 1) la disminución de las células Tregs induce susceptibilidad a la toxoplasmosis (206) y, 2) la disminución de células Tregs es esencial para la generación de una respuesta inmune protectora y resistencia a la infección (202). Por lo tanto, se planteó estudiar el papel de las células Tregs durante la toxoplasmosis en el ratón B6 por transferencia adoptiva de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺. Con esta estrategia experimental se determinará si la disminución de células Tregs es causa de la susceptibilidad de la cepa de ratón B6.

Por otro lado, el IFN- γ es la principal citocina implicada en la resistencia a la toxoplasmosis (58), pero su producción exacerbada es la principal causa de la susceptibilidad (64). En algunos resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis, se observó una correlación entre la disminución de las células Tregs con un incremento en los niveles de

IFN- γ sistémico, lo cual sugiere que posiblemente el IFN- γ está implicado en la disminución de células Tregs. En la literatura se ha sugerido que existe una relación entre la disminución de células Tregs con los altos niveles de IFN- γ observados durante la infección con *T. gondii* y que el cambio en el número absoluto de células Tregs es crucial para generar susceptibilidad o resistencia (203,232,234). Debido a que existen varios mecanismos que generan la disminución de células Tregs, los cuales incluyen la transformación en el fenotipo CD4⁺Foxp3⁺T-bet⁺IFN- γ ⁺ y la muerte de las células Tregs, así como la disminución en la producción de IL-2 por células CD4⁺ (202,206,230), nosotros planteamos estudiar si el IFN- γ es otro mecanismo más que causa la disminución de las células Tregs durante la toxoplasmosis.

3. Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

La disminución de células Tregs forma parte de la susceptibilidad observada durante la infección con *T. gondii*.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

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

3.2.2. Objetivos particulares

- Analizar el papel de las células Tregs en el ratón B6 por transferencia adoptiva de células Tregs.
- Analizar si las células Tregs controlan la respuesta inmune exacerbada durante la toxoplasmosis en el ratón B6, a través de la transferencia adoptiva.
- Demostrar si el IFN- γ es un mecanismo más que participa en la disminución de las células Tregs
- Determinar si hay una asociación entre la susceptibilidad y la disminución de células Tregs durante la toxoplasmosis.

4. Materiales y métodos

4.1. Ratones

Se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6J (B6) *wild-type* (WT), C57BL/6J Foxp3^{EGFP} *knock-in* (B6.Cg-Foxp3^{tm2Tch/J}, Laboratorios Jackson) y CD1. También se utilizaron ratones machos y hembras BALB/c WT, BALB/c STAT-1^{-/-} *Knock-out* (KO) (donados por el Dr. Luis Ignacio Terrazas), BALB/c IFN- γ ^{-/-} KO (C.129S7(B6)-IFN γ ^{tm1Ts/J}, Laboratorios Jackson) y BALB/c Foxp3^{EGFP} *knock-in* (C.Cg-Foxp3^{tm2Tch/J}, Laboratorios Jackson). Todos los ratones se mantuvieron en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (sede del circuito escolar) en un ambiente controlado, con agua y alimento *ad-libitum* (HarlanTM, México) y ciclos de luz 12x12. La edad de los ratones al tiempo de los experimentos fue de 8 a 10 semanas.

4.2. Parásitos e infección de ratones

4.2.1. Obtención de quistes

La cepa ME49 de *T.gondii* (Tipo II) se mantiene por pasaje *in vivo* en ratones CD1. Los quistes se obtuvieron del cerebro de ratones previamente infectados (de 2 a 3 meses). El cerebro fue macerado con un homogenizador con pistilo (Wheaton, Milville, NJ) y se tomaron 10 μ l del macerado con una micropipeta, los cuales se colocaron sobre un portaobjetos para contar el número de quistes en un microscopio óptico (objetivo 20X). El número de quistes obtenido en 10 μ l se extrapoló a un volumen final de 1 ml. Al menos 2 personas distintas realizaron el conteo de quistes por muestra. La muestra se ajusta a 200 quistes por ml de DPBS (apartado 4.12).

4.2.2. Infección por la vía oral

El macerado de cerebro con quistes se colocó en una jeringa de 1 ml (BD Plastipak®), a la cual se le insertó en la aguja un tubo de teflón (Cole Parmer®) de 0.02 cm de diámetro con aproximadamente 20 cm de longitud. Los ratones fueron anestesiados por aspiración con sevorano®, se les insertó el tubo de teflón en la boca hasta llegar al esófago y se les inyectaron 100 µl del macerado de cerebro con 20 quistes.

4.2.3. Infección por la vía intraperitoneal

El macerado de cerebro con quistes se colocó en una jeringa de 1 ml (BD Plastipak®) a la cual se le insertó una aguja de 22x32 µm de diámetro (BD yale® ultrafine). Después de sujetar e inmovilizar al ratón con la mano, se le inyectaron 100 µl del macerado de cerebro con 20 quistes en el peritoneo.

4.3. Obtención de sangre

El ratón se colocó dentro de un inmovilizador sujeto a un soporte universal con pinzas, se cortó la punta de la cola del ratón con unas tijeras de disección y con las yemas de los dedos se oprimió la cola del ratón para obtener la sangre, la cual se recibió en un tubo Eppendorf con 2 U de heparina (apartado 4.12). Se obtuvieron cerca de 100 µl de sangre por ratón y se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso.

4.4. Obtención de células de bazo

Se extrajo el bazo y se colocó en una caja de Petri con 5 ml de medio RPMI 1640 a 4°C. Las células se obtuvieron perfundiendo el bazo con 5 ml del medio RPMI (apartado 4.12). El medio con células se colocó en un tubo de 15 ml y se dejó sedimentar por 5 mins. El medio se decantó a otro tubo y se centrifugó a 1500 rpm por 5 mins descartando el

sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 ml de solución de lisis de eritrocitos (apartado 4.12) a temperatura ambiente por 5 mins y posteriormente se agregaron 10 ml de DPBS (apartado 4.12). Las células se lavaron y se resuspendieron en 10 ml de DPBS. Se contó el número de células por exclusión con azul tripano (Gibco™) haciendo una dilución 1:10 y contando 10 µl de la dilución en una cámara de Neubauer. Las células se almacenaron a 4°C hasta su uso.

4.5. Citometría de flujo

4.5.1. Inmunofluorescencia en células de sangre

Después de obtener aproximadamente 100 µl de sangre, se agregaron los anticuerpos específicos (Tabla V) para las moléculas de superficie a analizar resuspendidos en 50 µl de solución de lavado (apartado 4.12) incubando durante 30 mins a 4°C en la oscuridad. La sangre se lavó con 1 ml de solución de lavado, se agregaron 500 µl de solución de lisis (apartado 4.12) a temperatura ambiente por 5 mins y posteriormente se agregó 1 ml de DPBS. Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 5 mins. En algunos experimentos se analizó la expresión intranuclear de factores de transcripción, para lo cual las células se prepararon de acuerdo al apartado 4.5.3. Si se analizó únicamente la expresión de moléculas de superficie las células se resuspendieron en 350 µl de DPBS y se analizaron inmediatamente en el citómetro de flujo

4.5.2. Inmunofluorescencia en células de bazo

Se colocaron 1×10^6 células de bazo en un tubo Eppendorf agregando los anticuerpos específicos para las moléculas de superficie a analizar, en 100 µl de solución de lavado (apartado 4.12). Las células se incubaron por 30 mins a 4°C en la oscuridad. Se agregó 1 ml

de solución de lavado y se centrifugó a 1800 rpm por 5 mins. Para analizar la expresión intranuclear de factores de transcripción, las células se prepararon de acuerdo al apartado 4.5.3, en caso contrario, si se analizó únicamente la expresión de moléculas de superficie, las células se resuspendieron en 350 μ l de DPBS y se analizaron inmediatamente en el citómetro de flujo

4.5.3. Determinación intranuclear de factores de transcripción

A las células de sangre o bazo se les agregaron 500 μ l de solución de fijación (Anti-mouse/rat Foxp3 staining set, eBioscience™) (apartado 4.12), y se incubó durante 30 mins a 4°C en la oscuridad. Se agregó 1 ml de solución de permeabilización 1X (apartado 4.12) y se centrifugó a 1800 rpm por 5 mins. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 μ l de solución de permeabilización 1X (Anti-mouse/rat Foxp3 staining set, eBioscience™) (apartado 4.12) con la cantidad adecuada de anticuerpo para detectar el/los factor(es) de transcripción a determinar. Las células se incubaron durante 30 mins a 4°C en oscuridad. Se agregó 1 ml de buffer de lavado y se centrifugó a 1800 rpm por 5 mins. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 350 μ l de DPBS y las células se analizaron inmediatamente en el citómetro de flujo.

4.5.4. Determinación de citocinas intracelulares

Se incubaron 10^7 células de bazo con 10 ng/ml de Forbol 12-miristato 14-acetato (PMA) y 0.5 μ g/ml de ionomicina por 4 hrs (para IFN- γ , IL-2 and TNF- α) o 12 hrs (para IL-10, IL-6 and IL-17) en 2 ml de medio RPMI completo (Tabla VII), en placas de 24 pozos (Costar). Dependiendo de las citocinas a analizar, se agregó monensina (2 mM, Sigma) a los cultivos por 4 hrs para la detección de IFN- γ , IL-2 y TNF- α , o por 6 hrs para la IL-10, IL-6 e IL-

17. Durante el tiempo de incubación, las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, a 37°C. Después del tiempo adecuado de incubación, las células se cosecharon, se agregaron los anticuerpos dirigidos contra las moléculas de superficie resuspendidos en 100 µl de solución de lavado y se incubaron durante 30 mins a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron y se resuspendieron en 100 µl de paraformaldehído al 2% en DPBS y se incubaron durante 10 mins a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se lavaron con 1 ml de solución de tinción intracelular (apartado 4.12) y se resuspendieron en 100 µl de la misma solución, la cual contenía la cantidad indicada de anticuerpos anti-citocinas a utilizar. Las células se incubaron durante 10 mins a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, las células se lavaron, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron en 350 µl de DPBS y se analizaron inmediatamente en el citómetro de flujo.

4.5.5. Enriquecimiento de células CD4 provenientes de ratones Foxp3^{EGFP}

10⁸ células de bazo fueron resuspendidas en 900 µl de solución MACS (apartado 4.12) y se agregaron 100 µl de anticuerpo α-CD4 unido a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec). Las células se incubaron por 15 mins a 4°C con agitación constante, se agregaron 10 ml de solución MACS fresca y las células fueron centrifugadas a 1500 rpm. Las células se resuspendieron en 1 ml de solución MACS y se transfirieron a una columna de separación magnética (LS) la cual estaba sujeta a un imán magnético (Miltenyi Biotec), agregando 3 ml de solución MACS. Las células de la fracción negativa pasaron gota por gota por en la columna LS y fueron recolectadas en un tubo. Cuando pasaron todas las células de la fracción negativa, se agregaron 2 ml de solución MACS nueva en la columna LS, se puso

un tubo nuevo y se recolectaron las células de la fracción positiva. Las células de ambas fracciones se contaron para evaluar el rendimiento.

4.5.6. Sorting de células Tregs

10^7 células $CD4^+$ enriquecidas por MACS fueron resuspendidas en DPBS suplementado con 1% de antibióticos. Las células $CD4^+$ enriquecidas fueron separadas en un citómetro FACS Aria I (BD®) en la población $CD4^+Foxp3^+$ (células Tregs) y en la población $CD4^+Foxp3^-$ de acuerdo a los patrones de tamaño y granularidad establecidos (Fig. 9A y 10A). Las células separadas fueron recuperadas en tubos Falcon de 5 ml (BD®) con 1 ml de medio RPMI suplementado con 10% de SFB y 1% de antibióticos. La pureza obtenida en ambas poblaciones siempre fue $\geq 98\%$. Una vez obtenido el número de células deseadas, las células se juntaron en tubos Falcon de 15 ml, se lavaron, se resuspendieron en 1 ml de DPBS y se contaron en una cámara de Neubauer, ajustando a 2×10^6 células/ml

4.5.7. Cuantificación de citocinas en suero y en sobrenadantes de cultivo

Utilizamos el kit CBA (Cytometric Bead Array, BD®) para cuantificar citocinas en suero y sobrenadante, de acuerdo a lo descrito por el proveedor. Este kit es semejante a una ELISA sándwich, con la ventaja de que en 50 μ l de muestra se pueden cuantificar 7 citocinas diferentes. El kit contiene varios componentes que incluyen: proteínas recombinantes, 7 perlas de captura distintas (una por citocina), anticuerpo de detección acoplado a ficoeritrina (PE), medio de cultivo, solución de lavado, y perlas para la calibración del citómetro de flujo.

Primero se deben reconstituir las proteínas recombinantes liofilizadas en medio de cultivo, Una vez reconstituidas, se realizan diluciones seriales hasta llegar a una dilución 1:512, lo

cual es necesario para la realización de la curva estándar. Por otro lado, se preparan las perlas de captura, que reconocen específicamente cada una de las citocinas a analizar, en total 7. Una vez que se conocen cuantas muestras totales se requieren, se toman 10 μ l de las perlas individuales por muestra, en total 70 μ l. Se pusieron en un tubo Eppendorf 50 μ l de la mezcla de perlas de captura, 50 μ l de la muestra a analizar o de las citocinas recombinantes de la curva estándar y 50 μ l de anticuerpos de detección (PE). Las muestras fueron incubadas por 2 hrs a temperatura ambiente en la oscuridad. Mientras las muestras fueron incubadas, se realizaron ajustes en el citómetro FACSCalibur o FACSAria (BD®) con las plantillas de trabajo que otorga el proveedor (<http://bdbiosciences.com/cbasetup>) y con las perlas de ajuste del citómetro, incluidas en el kit. Se agregó 1 ml de solución de lavado a las muestras, se centrifugaron a 1500 RPM, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron en 300 μ l de solución de lavado para ser analizadas inmediatamente en el citómetro de flujo.

4.5.8. Determinación de la viabilidad de las células Tregs

La determinación de viabilidad celular se realizó utilizando el colorante Zombie Aqua (Biolegend), el cual permite la detección de células viables aun cuando se hayan sometido a un proceso de fijación y permeabilización. Para realizar esta tinción se resuspendieron 10^6 células de bazo en 100 μ l de DPBS libres de proteínas. Se agregaron 0.5 μ l del colorante Zombie Aqua incubando durante 20 mins, a temperatura ambiente, en la oscuridad. Se agregaron 2 ml de solución de lavado y las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 mins. Se continuó en el protocolo descrito en el apartado 4.5.3 para la fijación y permeabilización de las células.

4.5.9. Determinación de números absolutos

Se extrapoló el número absoluto de células de bazo a partir del número de células por μl de muestra obtenido en el citómetro Attune (Applied Biosystems), del volumen en el que se resuspendió la muestra ($350\mu\text{l}$ de DPBS) y del número total de células de bazo contando por exclusión con azul tripano en la cámara de Neubauer, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células por muestra} = [\# \text{células}/\mu\text{l}] [350\mu\text{l}]$$

Número de células por muestra $\rightarrow 10^6$ células iniciales

Número absoluto de células \leftarrow número de células en cámara de Neubauer

4.5.10. Citómetros

Se utilizaron los citómetros FACSCalibur y FACSAria de BD®, así como los citómetros Attune Azul/rojo y Azul/violeta de Applied Biosystems. Los datos obtenidos en los citómetros de flujo fueron analizados con el software FlowJo versión 7.6.5 (Tree Star).

4.5.11. Anticuerpos

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Marca
α -CD4	FITC	RM4-5	Biolegend
	PE/Cy7		
	PAcific Blue		
	PerCP		
	APC		
	Brilliant Violet		
α -CD8	FITC	5H10	Caltag
	PerCP	53-6.7	
	Alexa 647		
α -CD25	PE	PC61	Biolegend
	PerCP		
α -CD44	PE	IM7	
α -CD62L	PE	MEL-14	
	APC/Cy7		
α -CD69	PE	H1.2F3	
	APC		
α -CD119	PE	2E2	eBioscience
		REA89	Miltenyi
α -CD127	PE/Cy7	A7R34	Biolegend
			Tonbo
α -Foxp3	Alexa 488	150D	
α -T-bet	PE/Cy7	4B10	
α -IFN- γ	PE	XMG1.2	Biolegend
	PE/Cy7		
α -TNF- α	PE	MP6-XT22	
α -IL-2	APC	JES6-5H4	
α -IL-6	PE	MPS-20F3	
α -IL-10	PE/Cy7	JES5-16E3	
α -IL-17	Alexa 647	TC-18H10.1	

Tabla V. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo

4.6. Transferencia adoptiva de células Tregs

Las células obtenidas en el apartado 4.5.6 fueron resuspendidas a una concentración de 2×10^6 células/ml. Las células fueron colocadas en una jeringa de 1 ml con una aguja 27G (BD Plastipak®) y se inyectaron 100 μ l de la suspensión celular por vía intravenosa (2×10^5 células) a cada ratón. Previamente, el ratón fue colocado en un inmovilizador, exponiéndolo a una lámpara de luz roja por aproximadamente 20 segundos, para dilatar las venas de la cola del ratón y facilitar la inyección.

4.7. Cultivos celulares

4.7.1. Hibridomas

Se utilizó el hibridoma R4-6A2 productor del anticuerpo monoclonal mAb anti-IFN- γ de ratón (IgG1 de rata) y el hibridoma F4-1D1 como control de isotipo (IgG1 de rata, regalo del Dr. Olivier Denis, Institut Scientifique de Santé Publique, Bruselas, Bélgica). Los hibridomas se cultivaron en medio CDM sin suero (Gibco™) (apartado 4.12) suplementado con 4% de glutamina, en botellas de 150 cm² en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂, a 37°C. El medio CDM utilizado para cultivar el hibridoma R4-6A2 fue suplementado también con colesterol (1/250 V/V de la solución stock del proveedor, Gibco). Cuando las células estuvieron confluentes, se realizó una dilución 1:5 cosechando el sobrenadante restante y centrifugando a 1500 rpm por 5 mins. Se descartó el pellet y el sobrenadante recuperado se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

4.7.2. Células de bazo estimuladas con α -CD3

A una placa de 48 pozos se le agregaron 100 μ l de DPBS con anticuerpo α -CD3 (10 μ g/ml), incubando durante toda la noche, a 4°C. El DPBS se aspiró y se agregaron 1×10^5 células/ml en medio RPMI completo (Tabla VII). Las células se mantuvieron en cultivo en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, a 37°C durante 24 hrs. Al tiempo establecido se cosechó el sobrenadante, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 mins y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

4.8. Purificación de anticuerpos monoclonales

El sobrenadante de cultivo obtenido en el apartado 4.7.1, se descongeló en un baño a 37°C y se midió el volumen obtenido. Al medio descongelado se le agregó lentamente (NH₄)₂SO₄ para llegar a una saturación de 45, en un baño, a 4°C, con agitación constante durante 2 hrs. La mezcla se centrifugó a 18000 rpm a 4°C durante 1 hr en una ultracentrífuga, se descartó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en el volumen mínimo (entre 1 y 2 ml) de PBS pH 7.8, se transfirió a una bolsa de diálisis de 6000-8000 MWCO (Spectra/Por®) y se dializó con 10 veces el volumen mínimo de PBS pH 7.8 en una probeta, con agitación constante por 48 hrs, a 4°C y con cambios del PBS cada 6 hrs. Después del tiempo establecido, el dializado se recuperó en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 15000 rpm por 10 mins. Para cuantificar la concentración de anticuerpo obtenido y el rendimiento de la precipitación, se realizó una lectura en un espectrofotómetro a $\lambda=280$ nm utilizando la siguiente fórmula:

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

Los anticuerpos se almacenaron en alícuotas de 1 mg/ml a -20°C.

4.8.1. Electroforesis desnaturalizante y reductora

Después de armar la cámara inferior de electroforesis (Hoefer™, SE 600 series) se vertieron aproximadamente 25 ml del gel de corrida (sección 4.12), se añadió una capa de 1 cm de grosor de isobutanol saturado y el gel se dejó polimerizar por 1-2 hrs. Se descartó el isobutanol y el gel se enjuagó con agua mQ eliminando el exceso de agua con papel Whatman®. Se vertieron aproximadamente 10 ml del gel concentrador (sección 4.12) en la parte superior del gel de corrida, teniendo cuidado de colocar el peine (carriles) poco a poco, dejando polimerizar por 1 hr. Se retiró el peine y los carriles formados en el gel concentrador se lavaron 3 veces con 5 ml buffer de electrodos (sección 4.11). Se aplicaron 25 µg de anticuerpo por carril diluido en el mismo volumen de buffer de muestra 2X. Se utilizó el marcador de peso molecular Mark12™ (Invitrogen) para comparar el peso molecular de los anticuerpos (sección 4.12). Las cámaras inferior y superior de electroforesis fueron llenadas con buffer de electrodos. Las cámaras se conectaron a una fuente de poder, y se corrió a: 60 V, 12.5 mA de corriente máxima y potencia ilimitada, durante toda noche.

4.8.2. Tinción de geles con azul de Coomassie

Después de sacar el gel de acrilamida de la cámara inferior de electroforesis, se incubó con solución de enjuague por 20 mins y se tiñó con azul de Coomassie al 10% diluido en solución de enjuague. Se agregaron 100 ml de solución de lavado (sección 4.11) cada hora hasta desteñir. El gel resultante se colocó sobre un trans-iluminador de luz blanca y se capturó la imagen con la cámara EDAS-120 y el software ds1D (Kodak).

4.8.3. Neutralización de IFN- γ *in vivo*

El anticuerpo α -IFN- γ o su control de isotipo (1 mg/ml) se colocó en una jeringa de 1ml (BD Plastipak®). El ratón se inmovilizó sujetándolo de la nuca y de la cola con una sola mano. Se inyectaron 500 μ g de anticuerpo α -IFN- γ o su control de isotipo por vía intraperitoneal (ip).

4.9. Obtención de intestinos

El ratón sacrificado se colocó en una cama de unicel sujetando sus patas con agujas. Se realizó un corte en la piel, en la región abdominal. El peritoneo se cortó favoreciendo la exposición del intestino, el cual se cortó desde la región proximal al estómago hasta el ano del ratón. De acuerdo a los patrones morfológicos se distinguió entre el intestino grueso y el delgado. Se descartó el intestino grueso y el intestino delgado se colocó en una caja Petri con 5 ml de DPBS. En una jeringa de 10 ml se cargaron 5 ml de DPBS los cuales se inyectaron por la luz del intestino para limpiarlo de las heces del ratón. Los análisis posteriores se realizaron únicamente en el íleon, que es la sección del intestino más próxima al estómago del ratón.

4.9.1. Histología de intestinos

El íleon se cortó longitudinalmente y se colocó en 25 ml de solución de formalina al 10%. Las muestras fueron embebidas en parafina para su análisis histológico. Las muestras embebidas fueron cortadas en secciones de 3 μ m de grosor y teñidas con hematoxilina y eosina. Los cambios observados entre las distintas muestras fueron evaluados en 5 secciones de cada muestra.

4.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.10.1. Obtención de RNA de íleon

El íleon de los ratones se colocó por 20 segundos en nitrógeno líquido con la ayuda de unas pinzas. Ya en estado sólido, las muestras se colocaron en un mortero, con la ayuda de un pistilo se trituraron y se colocaron en un tubo Eppendorf que contenía 500 μ l de TRIzol (Invitrogen) a 4°C. Las muestras se almacenaron a -70°C (REVCO) por al menos 24 hrs. Las muestras se descongelaron y se añadieron 100 μ l de cloroformo agitando vigorosamente, dejando incubar a temperatura ambiente por 10 mins. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 15 mins y se observaron 3 fases. Se tomó únicamente la fase superior que era transparente (cerca de 200 μ l), la cual se colocó en un tubo Eppendorf nuevo que contenía 250 μ l de isopropanol frío y se dejó incubar durante 10 mins a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 mins, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 mins y si tenían una tonalidad blanca, se dejaron secar durante 2 hrs, en caso contrario se volvieron a lavar con etanol al 70% hasta observar una tonalidad blanca. Ya seco el pellet (RNA) se resuspendió en 20 μ l de H₂O dietil-pirocarbonato (DEPC). Para cuantificar la cantidad obtenida de RNA, 2 μ l de cada muestra fueron colocados en una placa TAKE3 (Biotek) y fueron analizados en un espectrofotómetro Epoch (Biotek).

4.10.2. Obtención de DNA de intestino y cerebro

El íleon o el cerebro de los ratones se colocó por separado en 500 μ l de solución de lisis con proteinasa K (100 μ g/ml) durante toda la noche, en un termoblock con agitación (eppendorf) a 56°C. Las muestras se agitaron en un vórtex hasta deshacer los grumos y se

centrifugaron por 10 mins a 14,000 rpm. En un nuevo tubo se colocaron 500 µl de isopropanol frío y se agregó el sobrenadante de las muestras. Las muestras se agitaron ligeramente y se centrifugaron por 5 mins a 14,000 rpm. Después se agregó 1 ml de etanol frío al 75% y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 mins. Se decantó el sobrenadante y si las muestras tenían una tonalidad blanca, se dejaron secar durante 2 hrs, en caso contrario se volvieron a lavar con etanol al 75% hasta observar una tonalidad blanca. Ya seco el pellet (DNA) se resuspendió en 200 µl de H₂O dietil-pirocarbonato (DEPC). Para cuantificar, las muestras se colocaron en el termoblock a 56°C y se realizó una dilución 1:20 en agua DEPC, se tomaron 2 µl de esta dilución y se colocaron en la placa TAKE3 (Biotek) y por medio del espectrofotómetro Epoch (Biotek) se determinó la concentración de DNA.

4.10.3. RT-PCR para determinar citocinas en intestino

El RNA obtenido en el apartado 4.10.1 fue utilizado para obtener cDNA usando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Una vez obtenido el cDNA se cuantificó la cantidad obtenida en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a partir de 1 µl de la muestra final. A partir de 2000 ng de cDNA se amplificaron los genes de citocinas. Los cebadores (primers) utilizados para amplificar los genes de citocinas se enlistan en la Tabla VI. Para amplificar los genes se utilizaron los kits Taq PCR KK1023 y KK1016 (Kappa Biosystems) y el termociclador T100 (BioRAD™).

4.10.4. PCR para determinar carga parasitaria en intestino y cerebro

El DNA de cerebro o íleon obtenido en el apartado 4.10.2 fue utilizado para amplificar un fragmento de 529 pares de bases (pb) de *T. gondii*. Se utilizó el kit Taq PCR KK1023, el primer descrito en la tabla VI y el termociclador T100 (BioRAD™).

Gen	Secuencia del primer (5'→3')	Peso molecular del producto (pb)	Temperatura de alineación (°C)	referencia
GAPDH	F-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC R-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	201	54	(235)
IFN-γ	F-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG R-GTCACAGTTTTTCGCTGTATAGGG	243	57	(236)
TNF-α	F-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C R-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G	307	59	(236)
IL-2	F-AGCAGCACCTGGAGCAGCTG R-GTCCACCACAGTTGCTGACT	254	60	(237)
IL-7	F-GCCTGTCACATCATCTGAGTGCC R- CAGGAGGCATCCAGGAACTTCTG	496	60	(238)
Actina	F- GACTTTGTACATTGTTTTG R- TGCACTTTTATTGGTCTCA	382	58	(239)
Fragmento de 529 pb de <i>T. gondii</i>	F-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG R- CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT	529	55	(240)

Tabla VI. Cebadores o primers utilizados para amplificar los genes descritos.

4.10.5. Geles de agarosa

Las muestras de los amplificados obtenidos se corrieron en un gel de agarosa (AMRESCO) al 1.5%, a 100 V, 350 A, durante 45 mins. Las muestras se digitalizaron con el aparato Fuji FLA 5000 y se analizó la expresión de los genes obtenidos en cada gel con el software Multi Gauge V. 3.0. La expresión de los genes de citocinas obtenidos a partir de cDNA fue normalizada con la expresión del gen constitutivo GAPDH, mientras que la expresión del fragmento de 529 pb de *T. gondii* fue normalizada con la expresión del gen constitutivo de actina.

4.11. Análisis estadístico

Las curvas de supervivencia fueron comparadas con una prueba Log-rank. Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales fueron determinadas por la prueba *t* de Student o ANOVA de una vía con una post-prueba de comparación múltiple de Tukey. Se obtuvo la correlación de Pearson (*r*) para determinar la relación lineal entre 2 variables distintas. Se obtuvo el coeficiente de determinación (r^2) para extrapolar los resultados. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism 5 (GraphPad).

4.12. Soluciones utilizadas

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

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

- **Solución de lisis de eritrocitos**

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

- **Heparina**

Se resuspendieron 10000U de heparina (SIGMA-ALDRICH®) en 10 ml de agua mQ.

- **Solución de lavado (para citometría de flujo)**

DPBS con 1% de FCS (v/v) y 0.01% de NaN₃ (v/v).

- **Solución de tinción intracelular**

DPBS con 1% de SFB (v/v) y 0.025% de saponina (v/v).

- **Paraformaldehído (tinción intracelular)**

Paraformaldehído al 2% disuelto en DPBS (m/v).

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

- **Solución de fijación**

- Diluir 1:4 en la solución diluyente

- **Solución de permeabilización**

- El buffer de permeabilización se diluye 1X con agua mQ.

- **Sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄**

- Se agregó directamente al medio CDM hasta llegar a una saturación del 45% (m/v).

- **PBS pH 7.8**

- 0.02 M de NaH₂PO₄ y 0.15 M de NaCl, pH 7.8.

- **Medios de cultivo**

- **CDM**

- El medio CDM (Chemically-Defined Media) se preparó de acuerdo a las instrucciones del distribuidor: se disolvió en agua mQ, se esterilizó con doble filtro Millipore® de 0.22 µm bajo presión positiva de N₂ y se guardó en alícuotas de 500 ml a 4°C en oscuridad (Gibco™).

- **RPMI**

- El medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Gibco™) se preparó de acuerdo a las instrucciones del distribuidor, disolviéndolo en agua mQ, ajustando la concentración de NaHCO₃ a 3.7g/l, y el pH con NaCl. Se esterilizó con doble filtro Millipore® de 0.22 µm bajo presión positiva de N₂ y se guardó en alícuotas de 500 ml

a 4°C en oscuridad; en este estado se mantuvo por 2 meses. Si fue requerido, al momento de utilizarlo se suplementó de acuerdo a la tabla VII.

Suplementos	Concentración	Marca
Suero fetal bovino (FCS)	10% v/v	Gibco™
L-glutamina	2 mM	
Aminoácidos no esenciales (NEAA)	10 mM	
Piruvato de sodio	1 mM	
β-mercaptoetanol	50 μM	
Penicilina-estreptomina	50 IU/ml	
Medio RPMI		

Tabla VII. Suplementos para medio RPMI

- **Acrilamida**

Se preparó una solución con 30% de acrilamida (m/v), 0.89% de bis-acrilamida (m/v).

Se filtró por membrana de 0.22 μm (Millipore®) y se guardó a 4°C en oscuridad.

- **Tris 1 M pH 6.8**

12.1 g de TRIZMA Base se disolvieron en 80 ml de agua mQ. El pH se ajustó a 6.8 con HCl 6 N, se aforó a 100 ml con agua mQ, se filtró en membrana de 0.22 μm (Millipore®), se autoclaveó y se guardó a 4°C.

- **Tris 1 M pH 8.8**

36.33 g de TRIZMA Base se disolvieron en 160 ml de agua mQ. El pH se ajustó a 8.8 con HCl 6 M, se aforó a 200 ml con agua mQ, se filtró por membrana de 0.22 μm (Millipore®), se autoclaveó y se guardó a 4°C.

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

10 g de SDS se disolvieron en agua mQ autoclaveada. Se aforó a 100 ml; se filtró por membrana de 0.22 μm (Millipore®) y se guardó a temperatura ambiente.

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

Para preparar 25 ml de solución de muestra 2X, se utilizaron 1.25 g de SDS, 3.125 ml de Tris 1 M pH 6.8, 2.5 ml de β -mercaptoetanol, 2.5 mg de azul de bromofenol, 5 ml de glicerol y se aforó a 25 ml con agua mQ. Se guardaron alícuotas de 900 μl a -20°C .

- **TEMED**

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (Bio-RAD™).

- **Persulfato de amonio**

Persulfato de amonio al 10% (m/v) disuelto en agua mQ, (Bio-RAD™).

- **Isobutanol saturado**

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

- **Buffer de electrodos**

Para preparar 5L se agregaron 15 g de TRIZMA Base, 72 g de glicina y 5 g de SDS. Se almacenó a 4°C .

- **Composición del gel de corrida**

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

- **Composición del gel concentrador**

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

- **Marcadores de peso molecular (MPM) para electroforesis de acrilamida**

Mark12™ Unstained Standard (Invitrogen™) 1X. Se utilizan 15 µl por carril.

- **Solución de enjuague**

Ácido acético al 7% (v/v).

- **Solución de lavado (para geles de agarosa)**

Ácido acético al 5% (v/v). Metanol al 10%(v/v).

- **Azul de Coomassie**

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

- **Solución TBE 10X**

Para preparar 3 L se utilizaron 324 g de TRIZMA Base, 165 g de ácido bórico, 120 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0.

- **Gel de agarosa**

Se disolvieron 0.6 g de agarosa (AMRESCO) en 40 ml de solución TBE 10X en un horno de microondas. Una vez disuelta la agarosa, se agregaron 5.3 ml de bromuro de etidio y el gel se dejó polimerizar por 30 mins, en un soporte del tamaño de la cámara de electroforesis (LabNet) con un peine para formar los carriles. Una vez que el gel

polimerizó, se colocó en la cámara de electroforesis que estaba repleta de solución TBE 10X.

- **MPM para electroforesis de agarosa**

100 bp Plus DNA Ladder (ThermoScientific), se utilizaron 2 μ l por carril.

- **Bromuro de etidio**

Bromuro de etidio grado biología molecular 10 mg/ml (Promega)

5. Resultados

5.1. Papel de las células Tregs en la modulación de la respuesta inmune durante la infección con *T. gondii* en la cepa de ratón B6

La cepa de ratón C57BL/6J (B6) es susceptible a la infección oral con la cepa ME49 de *T. gondii*, (35,64,241,242) y presenta una reducción en porcentaje y número de células Tregs (202,206). Para estudiar si la reducción de células Tregs está implicada en la susceptibilidad de la cepa B6, se infectaron ratones con 20 quistes ME49 de *T. gondii* por vía oral y 2 días después se transfirieron por vía intravenosa (iv) 2×10^5 células Tregs.

Para aislar a las células Tregs, en un primer experimento se marcaron células de bazo de ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ con anticuerpo anti-CD4 acoplado al fluorocromo ficoeritrina (PE) y las células CD4^+ fueron separadas en células Tregs o células Foxp3^- en un citómetro FACS Aria. Se obtuvo una pureza superior al 95% en ambas poblaciones (Fig. 10A). Se observó que los ratones infectados (inf) y los ratones infectados transferidos con células $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$ (inf/ $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$) fueron susceptibles a la infección, pero los ratones infectados y transferidos con células Tregs presentaron una sobrevida prolongada a lo largo de 30 dpi (Fig. 10B). Asimismo, se observó que los ratones infectados y transferidos con células Tregs no disminuyeron su peso como los ratones inf y los ratones inf/ $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$, pero no se observaron diferencias significativas (Fig. 10C). Estos resultados sugieren que la disminución de células Tregs durante la infección con *T. gondii* está implicada en la susceptibilidad de la cepa B6. Sin embargo, cuando realizamos este primer experimento el tiempo invertido para la obtención y separación del número de células Tregs necesarias para el experimento fue cercano a 8 horas.

Para el siguiente experimento, primero se enriqueció la población $CD4^+$ de células de bazo con perlas magnéticas por selección positiva y posteriormente se realizó la separación de células Tregs y células $CD4^+Foxp3^-$ en el citómetro FACS Aria. El tiempo para obtener las células Tregs necesarias se redujo a una hora, obteniendo una pureza $\geq 98\%$ tanto de las células Tregs, así como de las células $CD4^+Foxp3^-$ (Fig. 11A).

Debido a que nuestro grupo de trabajo ha descrito que las células Tregs de ratones infectados con *T. gondii* presentan un fenotipo de activación y tienen una mayor actividad supresora (228), se analizó si las células Tregs provenientes de ratones $Foxp3^{EGFP}$ infectados inducen una mayor protección que las células Tregs de ratones $foxp3^{EGFP}$ no infectados. Los ratones $Foxp3^{EGFP}$ de los que se obtuvieron las células para transferir fueron infectados 7 días antes de la transferencia adoptiva. Se observó que los ratones inf y los ratones inf/ $CD4^+Foxp3^-$ presentaron una sobrevida disminuida a lo largo del experimento (Fig. 11B), sin importar si las células transferidas provinieron de ratones no infectados o infectados. Los ratones infectados y transferidos con células Tregs presentaron una sobrevida prolongada, independientemente del origen de las células Tregs (Fig. 11B). Se observó que disminuyó el peso de los ratones en todos los grupos experimentales, sin embargo, el peso de los ratones infectados y transferidos con células Tregs no disminuyó drásticamente, sin importar el origen de las células Tregs (Fig. 11C). Por lo tanto, las células Tregs de ratones infectados tienen la misma capacidad protectora que las células Tregs de ratones no infectados. En los experimentos subsecuentes se utilizaron únicamente células Tregs de ratones no infectados, porque fue más fácil su aislamiento.

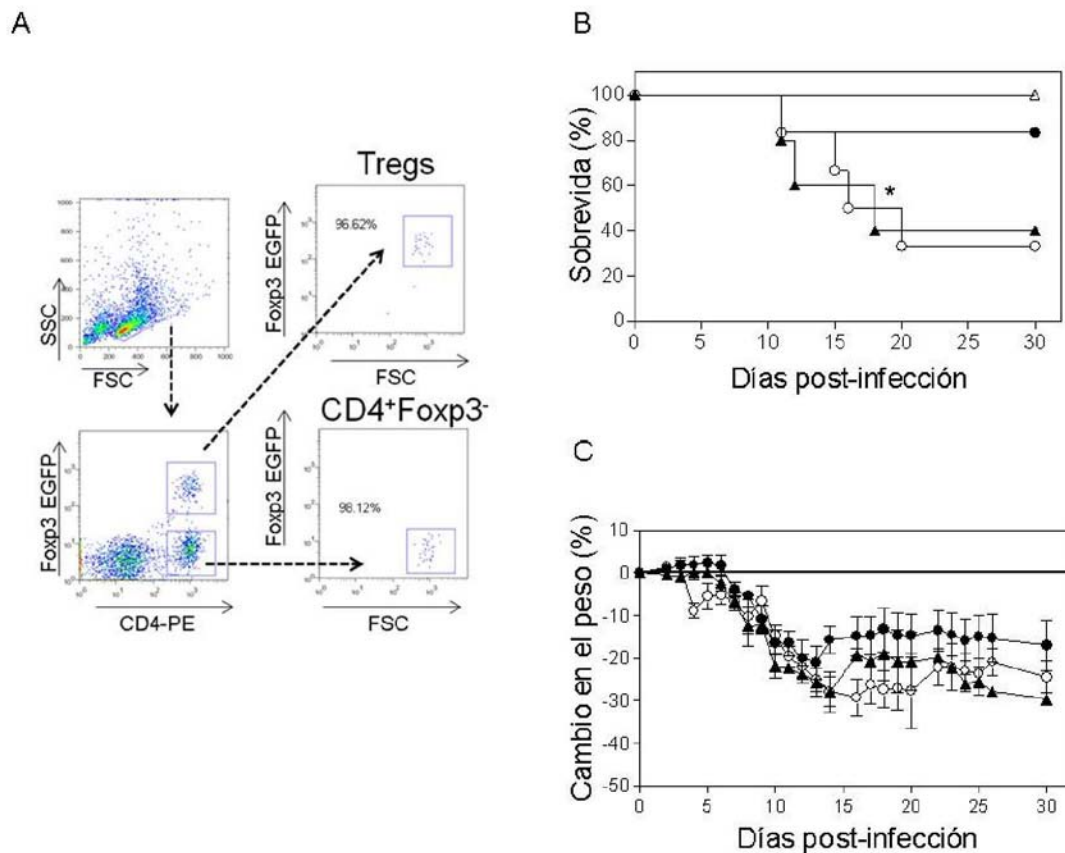


Fig. 10. La transferencia adoptiva de células Tregs prolonga la sobrevivida durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2×10^5 células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (control). A) Dot-plot representativo de la estrategia de obtención de células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻. B) Sobrevivida, *p<0.05, prueba Log Rank. C) El porcentaje de cambio en el peso se obtuvo a partir de comparar el peso del día cero (tomándolo como 0%) con el peso obtenido en cada día post-infección. Ratones no infectados (△), inf (▲), inf/CD4⁺Foxp3⁻ (○) o infectados transferidos con células Tregs (●) (B,C).

Con base en la literatura se determinó que el tiempo para realizar la transferencia adoptiva de células Tregs debe ser después de infectar a los ratones (203,205). Sin embargo, posiblemente se podrían observar diferencias en la sobrevivida y en el peso si se transfieren células Tregs antes de infectar a los ratones. En otro experimento se transfirieron células Tregs dos días antes de infectar a los ratones, pero no se observaron diferencias ni en la

sobrevida (Fig. 11D) ni en el peso (Fig. 11E) entre los distintos grupos experimentales. Por lo tanto, se decidió continuar con la transferencia adoptiva de células Tregs 2 días después de infectar a los ratones, porque la protección se observa únicamente cuando las células se transfieren durante la infección.

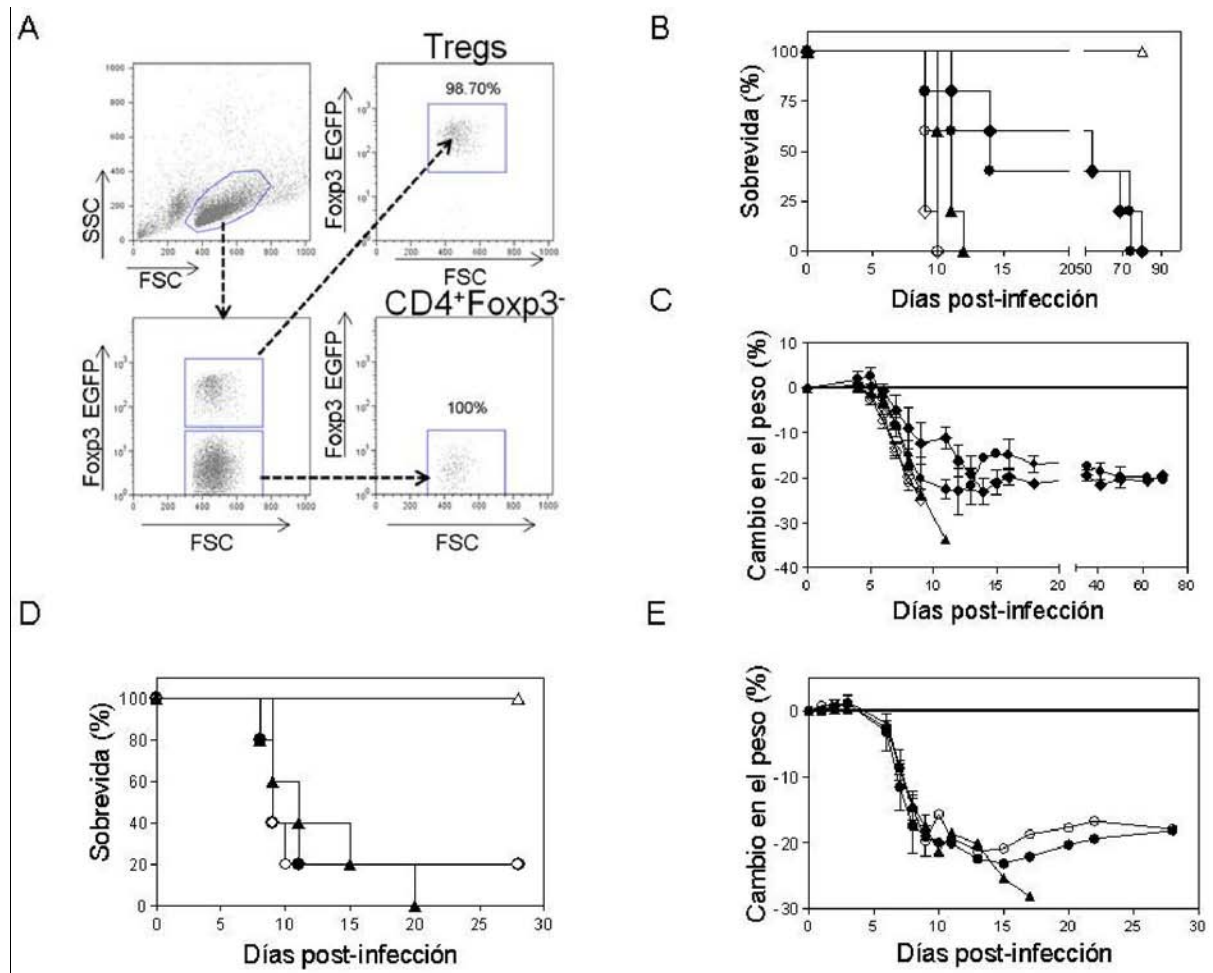


Fig. 11. La transferencia adoptiva de células Tregs proveniente de ratones no infectados e infectados prolonga la supervivencia durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2×10^5 células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ provenientes de ratones no infectados e infectados. A) Dot-plot representativo de la estrategia de obtención de células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻. B) Supervivencia, * $p < 0.05$, prueba Log Rank. C) El porcentaje de cambio en el peso se obtuvo a partir de comparar el peso del día cero (tomándolo como 0%) con el peso obtenido en cada día post-infección. D) Supervivencia de ratones transferidos 2 días antes de la infección, * $p < 0.05$, prueba Log Rank. E) Porcentaje de cambio de peso en los ratones transferidos 2 días antes de infectar. Ratones no infectados (Δ), inf (▲), inf/CD4⁺Foxp3⁻ (○) o infectados transferidos con células Tregs (●) (B-E). Ratones transferidos con inf/CD4⁺Foxp3⁻ (◇) o con Tregs de ratones infectados (◆) (B,C).

Con base en los experimentos anteriores, se transfirieron células Tregs de ratones no infectados a los 2 dpi para analizar nuevamente la sobrevida y el peso. Se observó que los ratones inf presentaron una sobrevida disminuida a lo largo del experimento (Fig. 12A), al igual que los ratones inf/CD4⁺Foxp3⁻ (Fig. 12A). Sin embargo, los ratones infectados y transferidos con células Tregs presentaron un incremento significativo en la sobrevida (Fig. 12A). El peso de los ratones inf y de los ratones inf/CD4⁺Foxp3⁻ disminuyó en comparación con el peso de los ratones infectados y transferidos con células Tregs, aunque no hubo diferencias significativas debido a la desviación estándar (Fig. 12B). Todos estos resultados sugieren que la disminución de células Tregs durante la infección con *T. gondii* está implicada en la susceptibilidad de la cepa B6.

Debido a que se observó una sobrevida prolongada en los ratones infectados y transferidos con células Tregs, se analizó la carga parasitaria en el cerebro por dos técnicas distintas: contando el número de quistes en el microscopio y por medio de PCR, las cuales han sido reportadas para determinar la carga parasitaria durante la infección con *T. gondii* (243-245). Se infectó a los ratones con 20 quistes ME49 de *T. gondii*, 2 días después se transfirieron 2x10⁵ células Tregs y a los 30 dpi fueron sacrificados para analizar la carga parasitaria (Fig. 12C-D). Al usar las dos técnicas para la cuantificación, se observó que la carga parasitaria aumentó en los ratones infectados y transferidos con células Tregs (Fig. 12C-D). Estos resultados nos sugieren que aunque la transferencia de células Tregs prolonga la sobrevida (Fig. 10B, 11B y 12A) sorprendentemente, también induce una mayor carga parasitaria en el cerebro.

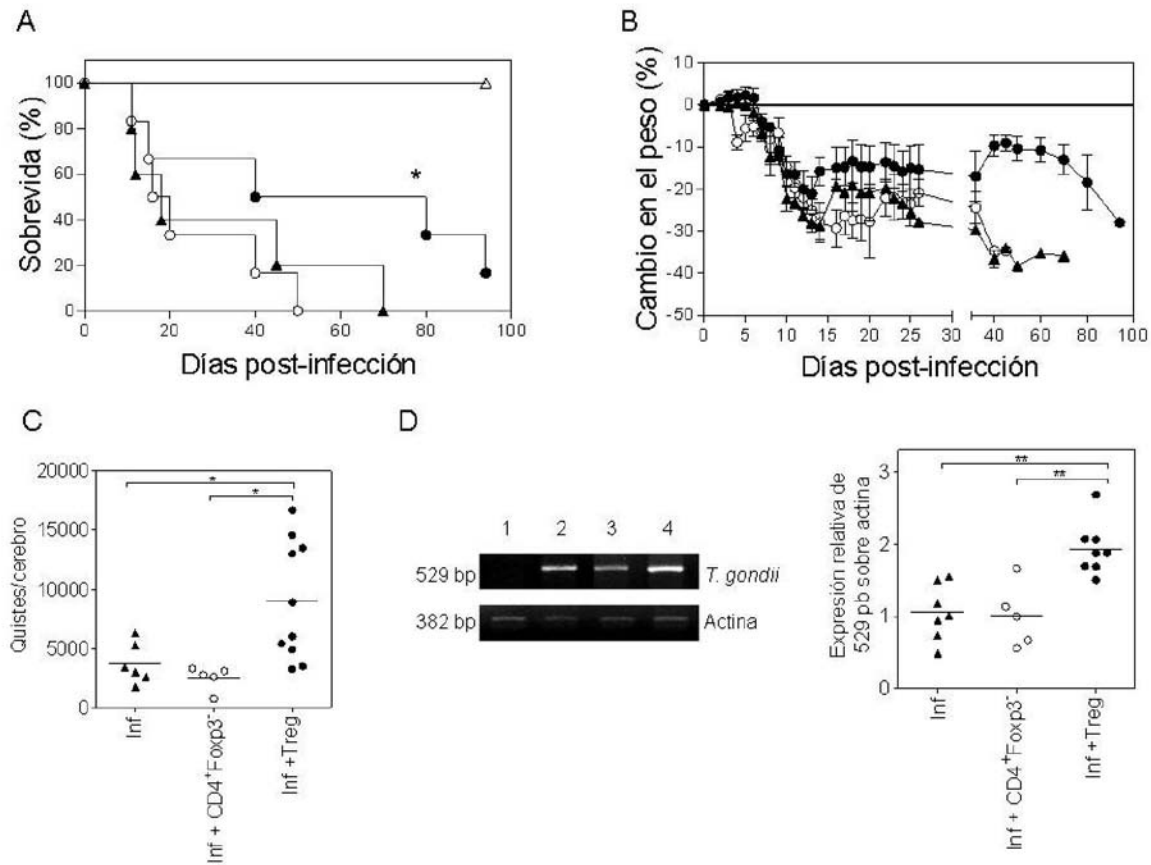


Fig. 12. La transferencia adoptiva de células Tregs prolonga la supervivencia, pero induce una mayor carga parasitaria en cerebro durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2×10^5 células Tregs o células $CD4^+Foxp3^-$ (control). A) Supervivencia, $*p < 0.05$, prueba Log Rank. B) El porcentaje de cambio en el peso se obtuvo a partir de comparar el peso del día cero (tomándolo como 0%) con el peso obtenido en cada día post-infección. C) El número de quistes se obtuvo a partir de contar de 2 a 4 alícuotas de 10 μ l por al menos 2 personas diferentes como se describe en materiales y métodos. D) Gel de agarosa representativo de un fragmento de 529 pb de *T. gondii* y del gen de actina en 1) ratones no infectados, 2) infectados, 3) infectados transferidos con células $CD4^+Foxp3^-$ y 4) infectados transferidos con células Tregs; así como la expresión relativa de los mismos genes. Datos representativos de 5 experimentos independientes (A, B y C) y totales de 2 experimentos independientes (C y D). Ratones no infectados (Δ), ratones infectados (\blacktriangle), infectados transferidos con células $CD4^+Foxp3^-$ (\circ) o infectados transferidos con células Tregs (\bullet). $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

Se ha demostrado que la causa de la mortalidad en la cepa de ratón B6 es la respuesta inmune inflamatoria T_h1 exacerbada que se genera en el intestino (35,64,241,242,246,247); por otro lado se ha demostrado que las células Tregs controlan la respuesta inmune inflamatoria T_h1 durante algunas enfermedades parasitarias (Tabla IV). Por lo tanto, se analizó si la transferencia adoptiva de células Tregs atenúa el daño en el intestino. Para tal fin, se infectaron ratones con 20 quistes ME49 de *T. gondii*, 2 días después se transfirieron 2×10^5 células Tregs y a los 7 dpi los ratones se sacrificaron para aislar el intestino y analizar por histología cambios morfológicos de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los ratones no infectados no presentaron alteración alguna en la morfología del intestino (Fig. 13A). Los ratones inf presentaron una destrucción severa de la mucosa intestinal, necrosis en las vellosidades y necrosis en las glándulas intestinales (Fig. 13B). Los ratones inf/ $CD4^+Foxp3^-$ presentaron un incremento en el infiltrado inflamatorio principalmente en la mucosa, en las vellosidades y en las glándulas intestinales (Fig. 13C). Sin embargo, los ratones infectados y transferidos con células Tregs presentaron una hiperplasia ligera en el epitelio y en las criptas intestinales, un infiltrado inflamatorio moderado en la mucosa intersticial sin destrucción en la submucosa y en la capa muscular (Fig. 13D). Estos resultados demuestran que la transferencia adoptiva de las células Tregs reduce el daño en el intestino, que es la causa de la susceptibilidad de la cepa B6. Con el fin de conocer si la disminución en el daño en el intestino es consecuencia de una respuesta inmune disminuida, o es debido a una menor carga parasitaria, se analizó por RT-PCR la expresión de las citocinas inflamatorias $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$ en el intestino de ratones provenientes de los grupos experimentales descritos anteriormente.

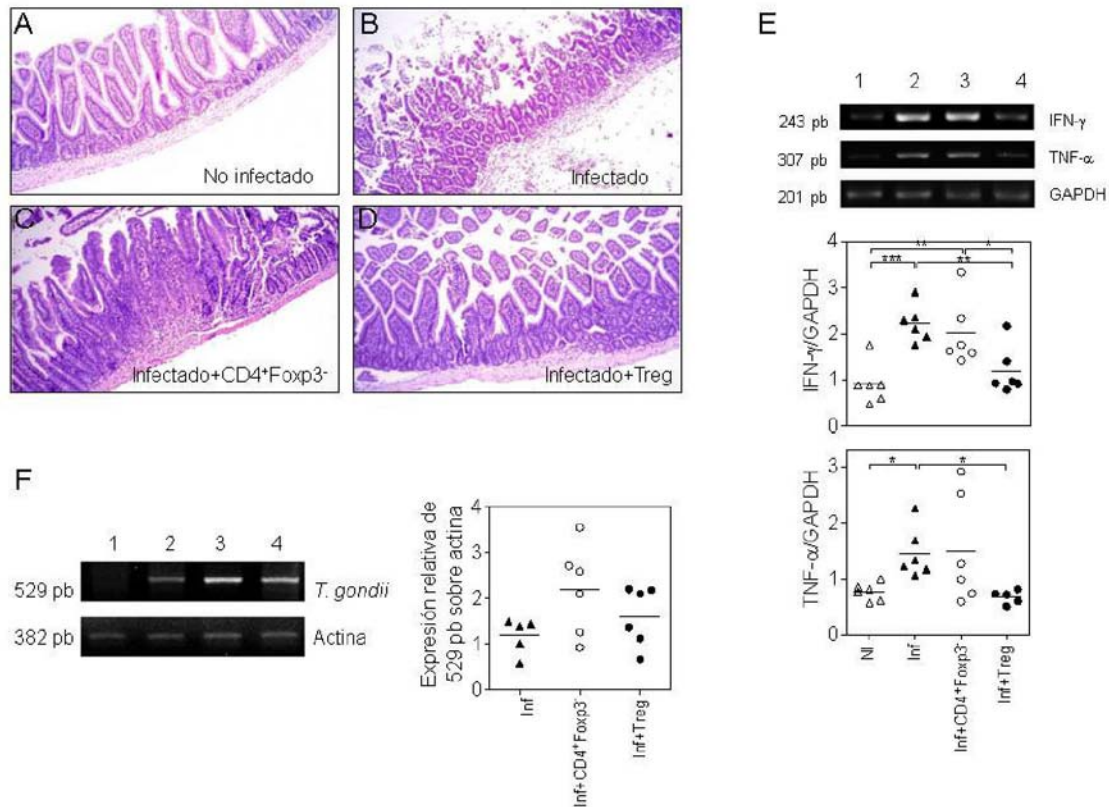


Fig. 13. Regulación de la respuesta inmune en intestino por la transferencia adoptiva de células Tregs durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2×10^5 células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (control). Tinción con hematoxilina y eosina a los 7 dpi de muestras representativas del intestino de ratones A) no infectados, B) infectados, C) infectados transferidos con células CD4⁺Foxp3⁻ o D) infectados transferidos con células Tregs. E) Gel de agarosa representativo de la amplificación de los genes de IFN- γ , TNF- α y GAPDH y expresión relativa de los genes IFN- γ y TNF- α comparados con el gen constitutivo GAPDH a los 7 dpi en muestras de intestino de 1) ratones no infectados, 2) infectados, 3) infectados transferidos con células CD4⁺Foxp3⁻ y 4) infectados transferidos con células Tregs; F) Gel de agarosa representativo de un fragmento de 529 pb de *T. gondii* y del gen de actina en los distintos grupos experimentales así como la expresión relativa de los mismos genes. Datos representativos de 3 experimentos independientes (A, B, C y D) y totales de 2 experimentos independientes (E y F). Ratones no infectados (Δ), infectados (\blacktriangle), infectados transferidos con células CD4⁺Foxp3⁻ (O) o infectados transferidos con células Tregs (\bullet) (E y F). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

Se observó un aumento en la expresión del IFN- γ y TNF- α en los ratones inf y en los ratones inf/CD4⁺Foxp3⁻ (Fig. 13E). Sin embargo, no se observó un aumento en la expresión del IFN- γ y TNF- α en los ratones infectados y transferidos con células Tregs, inclusive la expresión de estos genes fue muy similar a la de ratones no infectados (Fig. 13E). Al analizar la carga parasitaria por la expresión de un fragmento no codificante de 529 pb de *T. gondii*, se observó que la expresión del gen en todos los grupos experimentales fue similar (Fig. 13F). Todos estos resultados sugieren que la transferencia adoptiva de células Tregs disminuye la respuesta inmune que se genera en el intestino contra *T. gondii*, pero no tiene efecto en la carga parasitaria.

Con base en los resultados anteriores en los que se observó disminución de la respuesta inmune en el intestino por la transferencia adoptiva de células Tregs, se analizaron los niveles sistémicos de citocinas a los 7 dpi. Se infectaron ratones B6 con 20 quistes ME49 de *T. gondii* por vía oral y 2 días después se transfirieron por vía intravenosa (iv) 2x10⁵ células Tregs. Se observó un aumento significativo en los niveles del IFN- γ , TNF- α , de la IL-10 e IL-6 en los ratones inf y en los ratones inf/CD4⁺Foxp3⁻ (Fig. 14). De manera interesante, se observó que los niveles sistémicos del IFN- γ y TNF- α no aumentaron de manera tan exacerbada en los ratones infectados y transferidos con células Tregs, pero los niveles de la IL-10 e IL-6 se mantuvieron similares a los de ratones infectados (Fig. 14). Estos resultados demuestran que la transferencia adoptiva de células Tregs también disminuye la respuesta inflamatoria sistémica durante la infección aguda con *T. gondii*.

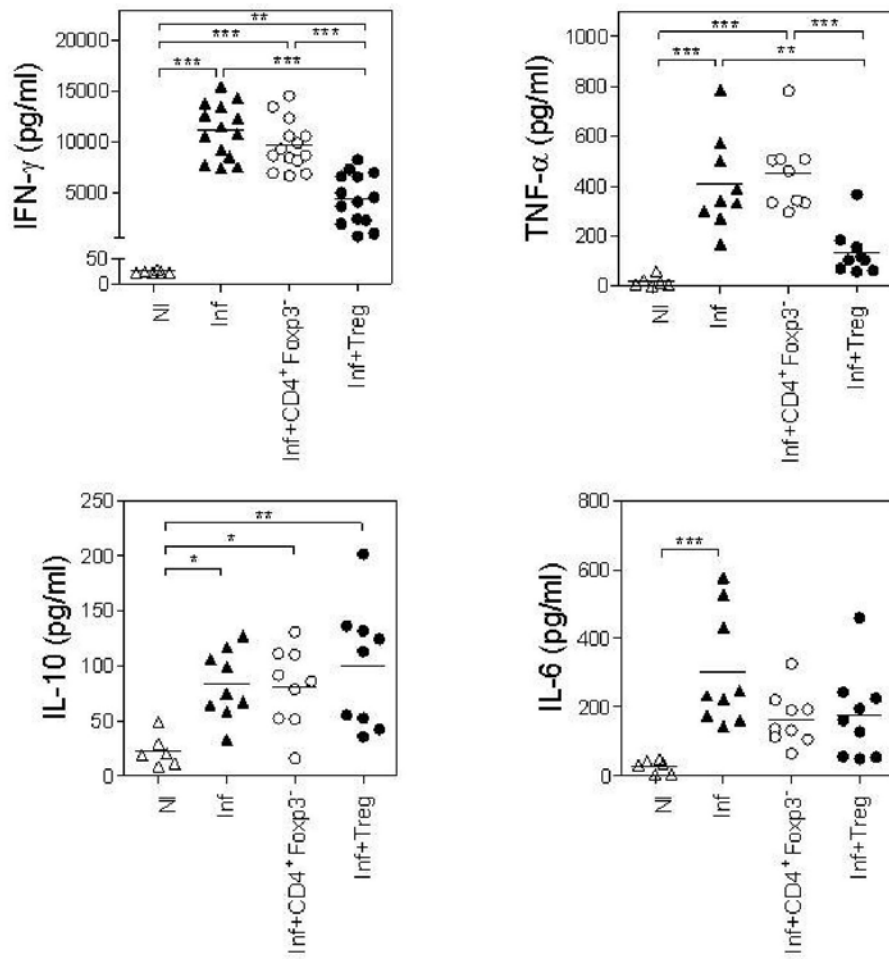


Fig. 14. Disminución de la producción de citocinas sistémicas inflamatorias por la transferencia adoptiva de células Tregs durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2×10^5 células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (control). Niveles en suero de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6 a los 7 dpi. Ratones no infectados (Δ), infectados (\blacktriangle), infectados transferidos con células CD4⁺Foxp3⁻ (O) o infectados transferidos con células Tregs (\bullet). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

Durante la infección con *T. gondii*, las células CD4⁺ productoras de IFN- γ están implicadas en la susceptibilidad de la cepa B6 (55). Debido a que se observó una clara disminución de la respuesta inflamatoria sistémica y en el intestino por la transferencia adoptiva de células Tregs, se analizó si esto es consecuencia de una disminución en la producción de IFN- γ por las células T-CD4⁺. Se infectaron ratones con 20 quistes ME49 de *T. gondii*, 2 días después se transfirieron 2×10^5 células Tregs y a los 7 dpi los ratones se sacrificaron para analizar en el bazo la producción de IFN- γ e IL-2 en células CD4⁺ estimuladas con PMA-ionomicina. Se observó una producción basal de IFN- γ e IL-2 por células CD4⁺ en los ratones no infectados (Fig. 15A y 4B). En los ratones inf y e inf/CD4⁺Foxp3⁻ aumentaron las células CD4⁺ productoras IFN- γ mientras que disminuyeron las células CD4⁺ productoras de IL-2 (Fig. 15A-B). Sin embargo, se observó que en los ratones infectados y transferidos con células Tregs no aumentaron las células CD4⁺ productoras de IFN- γ y no disminuyeron las células CD4⁺ productoras de IL-2 de manera significativa (Fig. 15A-B). Es importante mencionar que el efecto descrito en todos los grupos experimentales se vio reflejado en el porcentaje y en el número absoluto de células CD4⁺ productoras de IFN- γ e IL-2 (Fig. 15A-B). Cuando se analizó la producción de IFN- γ por células CD8⁺ se observó un incremento significativo en porcentaje y número causado por la infección, mientras que la transferencia de células Tregs o CD4⁺Foxp3⁻ no cambian las células CD8⁺ productoras de IFN- γ (Fig. 15A-B). Estos resultados demuestran que la transferencia adoptiva de células Tregs disminuye la producción de IFN- γ y de IL-2 únicamente en células CD4⁺.

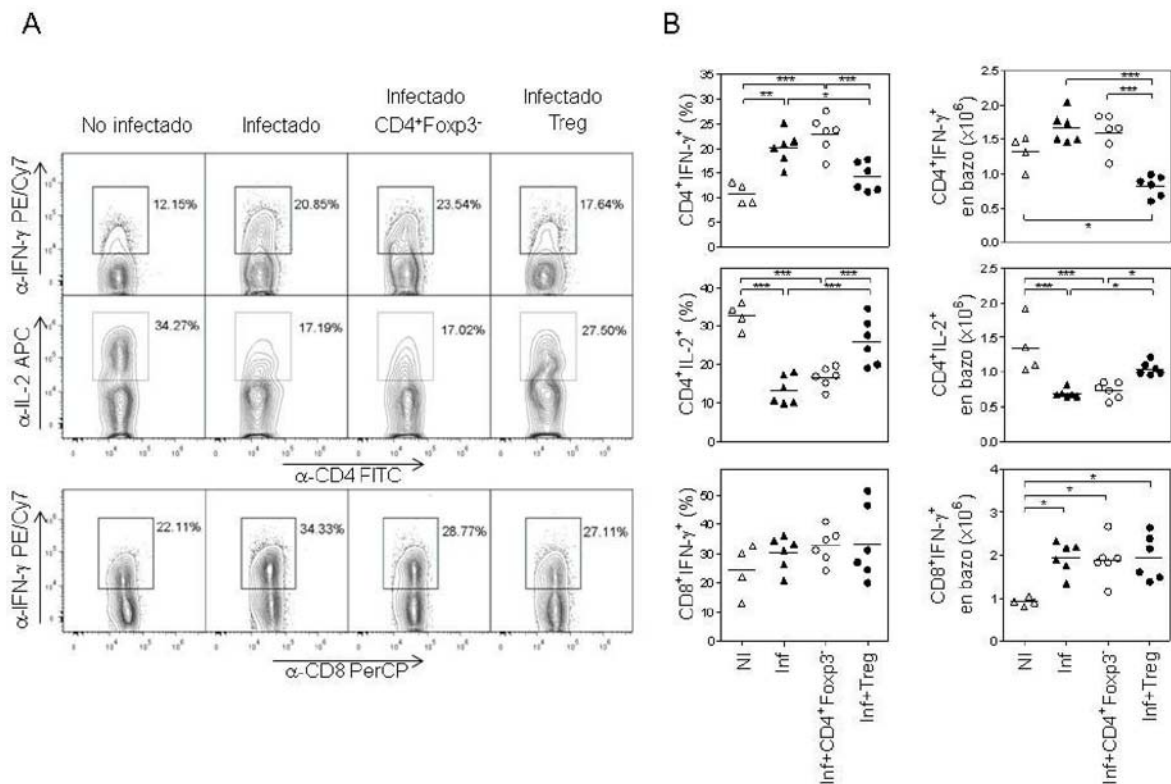


Fig. 15. La transferencia adoptiva de células Tregs disminuye la producción de citocinas por células CD4⁺ durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2×10^5 células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (control). A) Density-plots representativos del porcentaje de células CD4⁺ productoras de IFN-γ e IL-2 o de células CD8⁺ productoras de IFN-γ en el bazo a los 7 dpi. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realizó tomando 10,000 eventos de células CD4⁺ o CD8⁺. B) datos totales de 2 experimentos independientes del porcentaje y número de las células CD4⁺ productoras de IFN-γ e IL-2, así como de las células CD8⁺ productoras de IFN-γ. Ratones no infectados (Δ), infectados (▲), infectados transferidos con células CD4⁺Foxp3⁻ (○) o infectados transferidos con células Tregs (●). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

Se analizó también la producción de citocinas intracelulares IL-6, IL-10 e IL-17 en las células CD4⁺, e IL-2, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- α en las células CD8⁺. Se observó un aumento causado por la infección en la mayoría de citocinas intracelulares, siendo más notable en la producción de IL-2 y TNF- α por células CD8⁺, pero no hubo efecto alguno causado por la transferencia adoptiva de células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (Fig. 16). Por lo tanto, la transferencia adoptiva de células Tregs disminuye únicamente la producción de IFN- γ e IL-2 en células CD4⁺ (Fig. 15A-B).

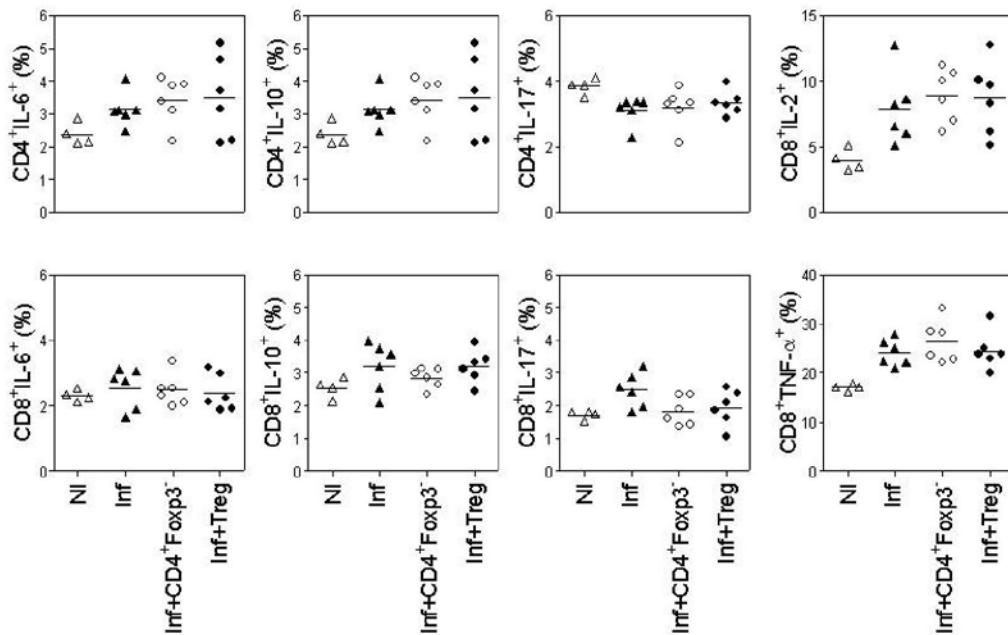


Fig. 16. Citocinas intracelulares analizadas donde no se observó efecto por la transferencia adoptiva de células Tregs o CD4⁺Foxp3⁻ durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2x10⁵ células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (control). Las células se estimularon de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Datos representativos del porcentaje de células de bazo de 2 experimentos independientes. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realizó tomando 10,000 eventos de células CD4⁺ o CD8⁺.

Debido a que se observó que la transferencia adoptiva de células Tregs evita que aumente la producción de IFN- γ y que disminuya la producción IL-2 por las células CD4⁺ (Fig. 15), se evaluó el estado de activación de las células CD4⁺, analizando la expresión de las moléculas CD25, CD62L y CD69 (248-250). Se observó que aumentó el porcentaje y número de las células CD4⁺ que expresan CD25 y CD69 en los ratones inf y en los ratones inf/CD4⁺Foxp3⁻ (Fig. 17A-B). Sin embargo, se observó que hubo sólo un ligero incremento en porcentaje y número absoluto de las células CD4⁺ que expresan CD25 y CD69 en los ratones infectados y transferidos con células Tregs (Fig. 17A-B). La molécula CD62L tiene un patrón de expresión inverso al de las moléculas CD25 o CD69 (251,252), por lo que se observó que la expresión de la molécula CD62L fue restaurada en porcentaje y número absoluto por la transferencia adoptiva de células Tregs (Fig. 17A-B).

También se analizó la expresión de las moléculas CD25, CD62L y CD69 en las células CD8⁺. Se observó que por la infección aumentó el porcentaje de las células CD8⁺ que expresan CD25, CD62L o CD69 pero no se observó efecto alguno por la transferencia adoptiva de células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (Fig. 18). Estos resultados sugieren que la transferencia adoptiva de células Tregs disminuye la activación únicamente de las células CD4⁺.

Cuando se analizó el nivel de expresión de las moléculas CD25⁺ y CD69⁺ con base en la intensidad media de fluorescencia (MFI) en las células CD4⁺, se observó que en los ratones inf y en los ratones inf/CD4⁺Foxp3⁻ aumentó la MFI de las moléculas CD25⁺ y CD69⁺, pero por la transferencia adoptiva de células Tregs aumentó ligeramente la MFI (Fig. 19A-B).

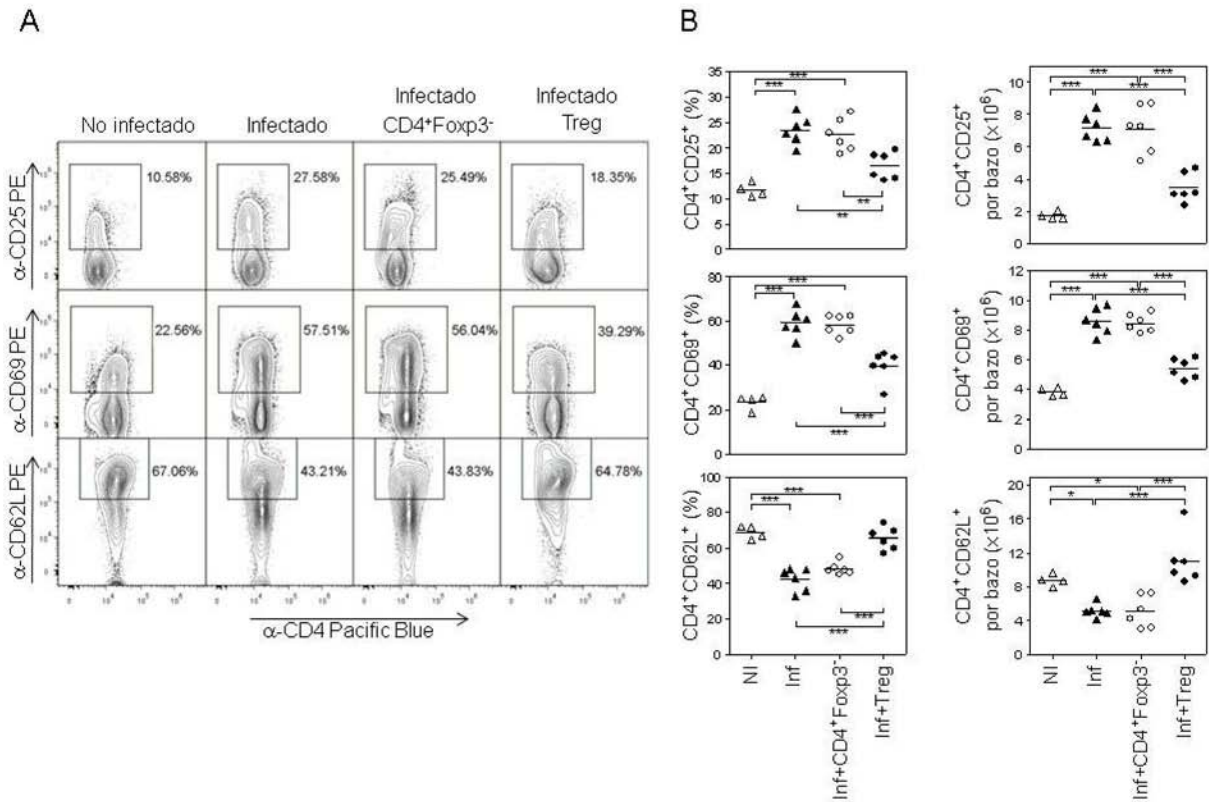


Fig. 17. La transferencia adoptiva de células Tregs disminuye la activación de las células CD4⁺ durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2×10^5 células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (control). A) Density-plots representativos del porcentaje de células CD4⁺ expresando las moléculas CD25, CD69 y CD62L en el bazo a los 7 dpi. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realizó tomando 10,000 eventos de células CD4⁺. B) datos totales de 2 experimentos independientes del porcentaje y número de las células CD4⁺ expresando las moléculas CD25, CD69 y CD62L. Ratones no infectados (Δ), infectados (\blacktriangle), infectados transferidos con células CD4⁺Foxp3⁻ (\circ) o infectados transferidos con células Tregs (\bullet) (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

Todos estos resultados demuestran que la transferencia adoptiva de células Tregs reduce la activación de las células CD4⁺.

Los resultados obtenidos en esta sección son el objeto del artículo que fue publicado en la revista *Microbes and Infection*.

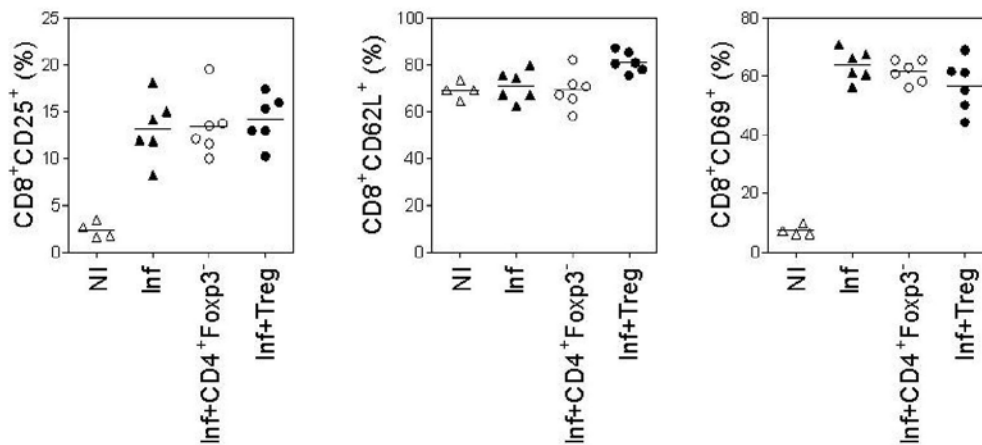


Fig. 18. La transferencia adoptiva de células Tregs o CD4⁺Foxp3⁻ no tiene efecto en la activación de las células CD8⁺ durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2x10⁵ células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (control). Datos totales de 2 experimentos independientes del porcentaje y número de las células CD8⁺ expresando las moléculas CD25, CD69 y CD62L. Ratones no infectados (Δ), infectados (\blacktriangle), infectados transferidos con células CD4⁺Foxp3⁻ (O) o infectados transferidos con células Tregs (\bullet). La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realizó tomando 10,000 eventos de células CD8⁺.

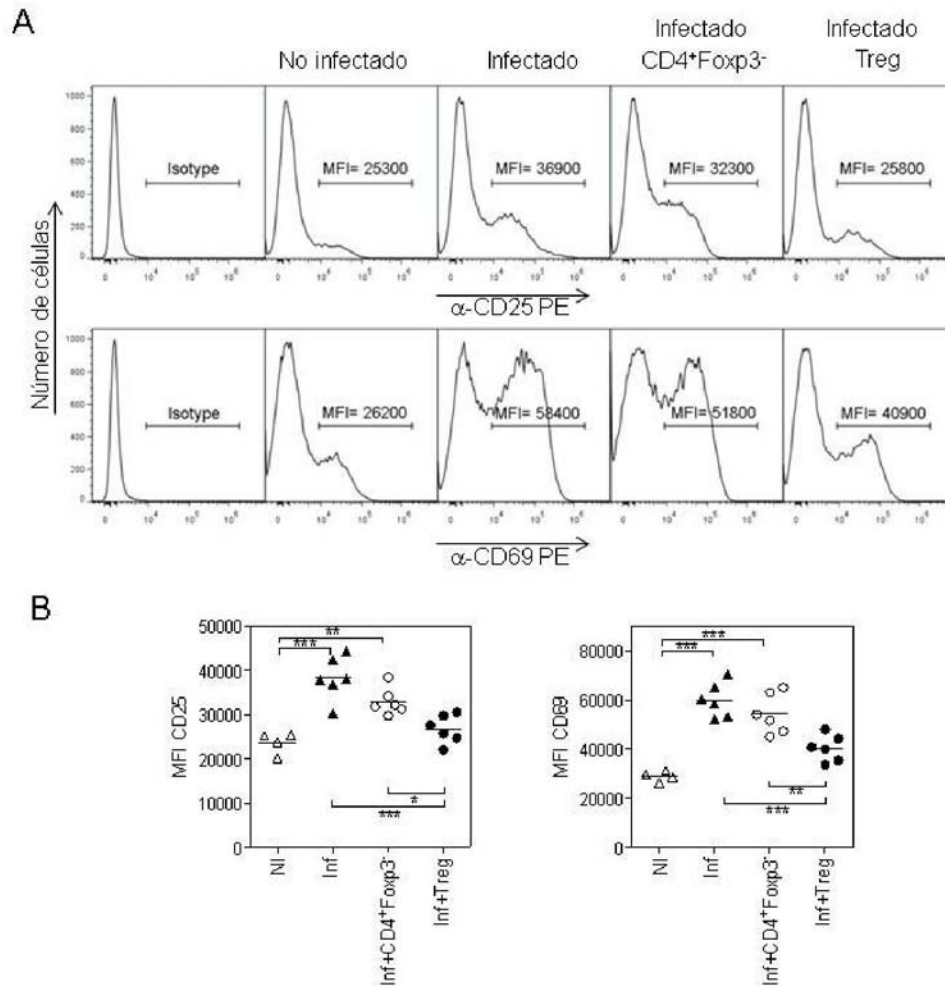
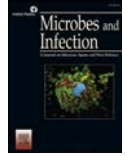


Fig. 19. La transferencia adoptiva de células Tregs disminuye la expresión de distintas moléculas de activación en las células CD4⁺ durante la infección con *T. gondii*. Ratones B6 fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía oral y a los 2 dpi fueron transferidas 2×10^5 células Tregs o células CD4⁺Foxp3⁻ (control). A) Histogramas representativos del número de células CD4⁺ expresando las moléculas CD25 y CD69 en el bazo a los 7 dpi. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realizó tomando 10,000 eventos de células CD4⁺. B) datos totales de 2 experimentos independientes de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las moléculas CD25 y CD69 en las células CD4⁺. Ratones no infectados (Δ), infectados (▲), infectados transferidos con células CD4⁺Foxp3⁻ (○) o infectados transferidos con células Tregs (●) (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.



Microbes and Infection xx (2015) 1–10



www.elsevier.com/locate/micinf

Original article

Adoptive transfer of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells to C57BL/6J mice during acute infection with *Toxoplasma gondii* down modulates the exacerbated T_h1 immune response

Jonadab E. Olguín^a, Jacqueline Fernández^a, Nohemí Salinas^{a,d}, Imelda Juárez^b,
Miriam Rodríguez-Sosa^b, Jaime Campuzano^c, Carlos Castellanos^a, Rafael Saavedra^{a,*}

^a Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

^b Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Edo. de México, Mexico

^c Departamento de Patología Experimental, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Mexico City, Mexico

^d Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

Received 13 September 2014; accepted 8 April 2015

Available online ■■■

Abstract

Infection of C57BL/6J mice with the parasite *Toxoplasma gondii* triggers a powerful T_h1 immune response that is detrimental to the host. During acute infection, a reduction in CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) has been reported. We studied the role of Treg during *T. gondii* infection by adoptive transfer of cells purified from transgenic Foxp3^{EGFP} mice to infected wild type animals. We found a less severe weight loss, a significant delayed mortality in infected Treg-transferred mice, and reduced pathology of the small intestine that were associated with lower IFN- γ and TNF- α levels. Nevertheless, higher cyst number and parasite load in brain were observed in these mice. Treg-transferred infected mice showed reduced levels of both IFN- γ and TNF- α in sera. A reduced number of CD4⁺ T cells producing IFN- γ was detected in these mice, while IL-2 producing CD4⁺ T cells were restored to levels nearly similar to uninfected mice. CD25 and CD69 expression of CD4⁺ T cells were also down modulated. Our data show that the low Treg cell number are insufficient to modulate the activation of CD4⁺ T cells and the production of high levels of IFN- γ . Thus, a delicate balance between an optimal immune response and its modulation by Treg cells must exist.

© 2015 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Regulatory T-cells; *Toxoplasma gondii*; Adoptive transfer; T_h1 cells; Interferon-gamma

1. Introduction

Toxoplasmosis is an infectious disease caused by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. The infection is widely distributed and it has been reported that one third of the human population has been infected. The infection is clinically asymptomatic in most immunocompetent individuals, but it

may cause severe complications in pregnant women and immunodeficient patients [1].

Infection with *T. gondii* induces a potent T_h1 immune response that controls the parasite [2]. At very early times after infection, the parasite secretes molecules that induce IL-12 production by dendritic cells [3–5]; this cytokine, in turn, induces secretion of IFN- γ by NK cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells [2]. IFN- γ activates macrophages and other cell types to control parasite replication [6–8], and it has been demonstrated that this cytokine is the major mediator of resistance against *T. gondii* *in vivo* [9]. Thus, protection during *T. gondii* infection is achieved by a strong T_h1 immune response, although this response can also be detrimental to the host [10].

* Corresponding author. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70228, Ciudad Universitaria, CP 04510, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 5556223832.

E-mail address: saavedra@unam.mx (R. Saavedra).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2015.04.002>

1286-4579/© 2015 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

The exacerbated inflammatory response induced by *T. gondii* is counterbalanced by IL-10 [11] produced mainly by CD4⁺ T_H1 cells [12], by TGF- β [13], IL-27 [14], and by Lipoxin A₄ [15].

Regulatory T (Treg) cells are CD4⁺ T lymphocytes that are required for the maintenance of immunological self-tolerance and immune homeostasis by actively suppressing pathological and physiological immune responses [16]. Treg cells constitutively express Foxp3, a transcription factor that is required during their development and for their suppressive function [17,18]. These cells also express constitutively high levels of CD25, CTLA-4, GITR and LAG-3 [19]. The mechanisms of suppression used by Treg cells include modulation of expression of costimulatory molecules, secretion of immunosuppressive cytokines, IL-2 deprivation, induction of tryptophan catabolism and cytotoxicity [20]. Treg cells are also involved during infectious diseases, but their role differs among pathogens. In some cases, Treg cells down modulate the exacerbated immune response favoring survival of both the host and the pathogen, but in others, suppression of an efficient immune response promotes persistence of the pathogen, that is detrimental to the host [21–23].

Infection with *T. gondii* leads to a decrease in Treg cell number during the acute phase in the susceptible C57BL/6J strain of mice [24–26], and this reduction seems to be related to a low IL-2 production by CD4⁺ T cells during infection [24,25]. Since Treg cell number is reduced during *T. gondii* infection in C57BL/6J mice, we thus analyzed the role of these cells during infection by adoptive transfer of Treg to *T. gondii* infected mice.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Eight-ten week old female wild type C57BL/6J (WT), Swiss-Webster mice, and Foxp3^{EGFP} knock-in female C57BL/6J mice (B6.Cg-Foxp3^{tm2Tch/J}, The Jackson Laboratory) were bred in our animal house and maintained in microisolator cages according to institutional guidelines. All animal experimentation protocols were approved by the local Bioethics Committee for Animal Research.

2.2. *T. gondii* infection

The ME49 strain of *T. gondii* was maintained by periodical passage in Swiss-Webster mice as previously described [27]. Mice weighing 18–20 g were infected with 20 cysts perorally as described elsewhere [28].

2.3. Purification of Treg and adoptive cell transfer

CD4⁺ cells from splenocytes of Foxp3^{EGFP} mice were first enriched by positive selection using anti-CD4 microbeads by MACS, following the instructions provided by the manufacturer (Milteny Biotec). CD4⁺ T cells were sorted in a

FACSAria cytometer (Beckton Dickinson) and the CD4⁺ EGFP⁺ cells (CD4⁺Foxp3⁺) and CD4⁺EGFP⁻ cells (CD4⁺Foxp3⁻) were obtained. Purity of CD4⁺Foxp3⁺ cells (Treg) was $\geq 95\%$ and of CD4⁺Foxp3⁻ cells was $\geq 98\%$. Two hundred thousand Treg or CD4⁺Foxp3⁻ cells were injected intravenously in the tail in 100 μ l of DPBS 2 days after infection.

2.4. Immunofluorescence and flow cytometry

Splenocytes (10⁷ cells/ml) were incubated (30 min, 4 °C, darkness) with the indicated mAbs in washing buffer (DPBS + 1% FCS and 0.1% NaN₃). Cells were washed once, resuspended in DPBS and analyzed by flow cytometry, using a FACSCalibur (Becton Dickinson) or Attune (Applied Biosystems) cytometer. Detailed analysis of each experiment is indicated in figure legends. Ten thousand gated events were captured and analyzed. Data were analyzed using the FlowJo software V 7.6.5 (Tree Star).

2.5. Determination of absolute cell numbers

Absolute number of cells was calculated from the data obtained from the Attune flow cytometer and correlated with the total cell number counted by the trypan blue exclusion test, and are expressed as positive cells per spleen.

2.6. Brain cyst counting

Infected mice were euthanized at 30 days post-infection (dpi), brains were removed and homogenized in 1 ml DPBS as described [28]. Cyst number in each brain was counted in two-four 10 μ l aliquots, each one carried out by a different laboratory member. Results are expressed as mean cyst number per brain.

2.7. Parasite load determination by semiquantitative PCR

Ileae from the different groups of mice were obtained at 7 dpi and brains were collected at 30 dpi. DNA was obtained from both tissues using standard protocols [29,30], and parasite load was determined by amplification of a non-coding 529 bp DNA fragment of *T. gondii* by PCR [31], as described previously [30]. The primers used to amplify the 529 bp sequence are TOX4 (5'-CGCTGCAGGGAGGAA-GACGAAAGTTG-3') and TOX (5'-CGCTGCAGACA-CAGTGCATCTGGATT-3') and those to amplify a 382 bp sequence of the constitutive actin gene are mActb-F (5'-GACTTTGTACATTGTTTTG-3') and mActb-R (5'-TGCACTTTTATTGGTCTCA-3') [32]. PCR was carried out as described [31] and amplification products were separated on a 1.5% agarose gel. The gene expression was normalized to the expression of the actin gene and analyzed using Fuji FLA 5000 software (Multi Gauge V. 3.0). Results are expressed as relative fluorescence of the 529 bp fragment normalized to the

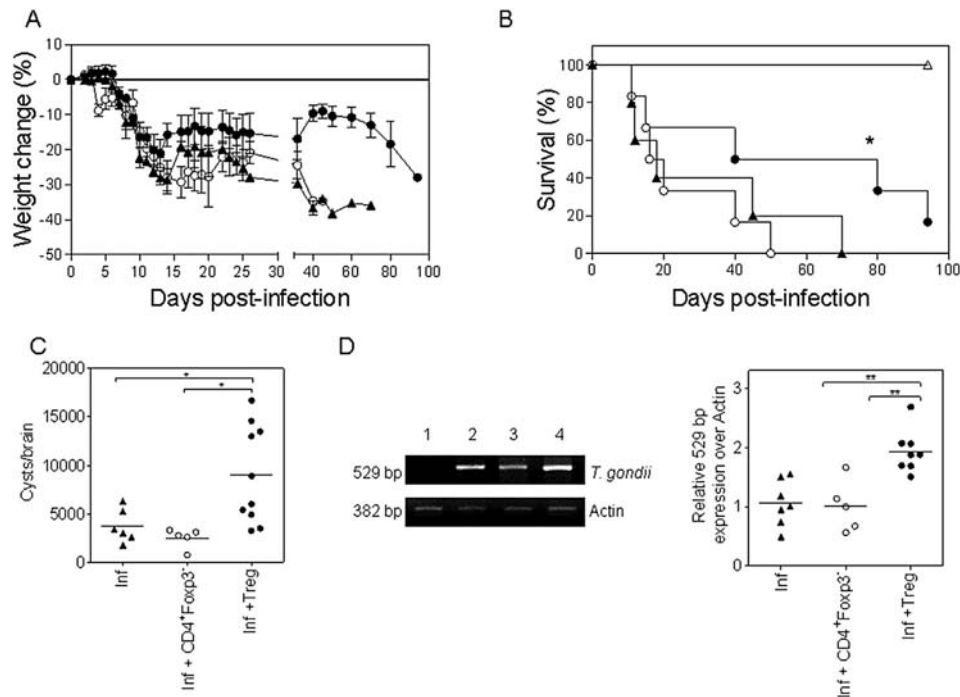


Fig. 1. Adoptive transfer of Treg cells to *T. gondii*-infected mice induces partial protection but an increased parasite load in brain. Treg or $CD4^{+}Foxp3^{-}$ cells (2×10^5) were transferred to mice that were infected 2 days earlier with 20 cysts of the ME49 strain of *T. gondii*. **A**) Percentage weight change was scored in infected mice (\blacktriangle), either transferred with Treg (\bullet), or with $CD4^{+}Foxp3^{-}$ cells (\circ). Percentage weight change was calculated using the weight of each animal at day 0. Results shown are the mean percentage weight change \pm SD from at least 5 mice per group. **B**) Cumulative mortality of each experimental group was assessed for up to 94 days; (Δ) uninfected mice. * $p < 0.05$, Log Rank test. **C**) Brain cyst count was assessed at 30 dpi and is expressed as cyst number per brain for each animal. **D**) Parasite load in brain was analyzed by semiquantitative PCR at 30 dpi. A representative gel and the relative expression of the 529 bp amplicate of *T. gondii* are shown. Uninfected (lane 1), infected (lane 2), infected + $CD4^{+}Foxp3^{-}$ (lane 3), infected + Treg (lane 4). * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Data shown were obtained from 5 (**A,B**) or 2 (**C,D**) independent experiments, including at least 5 (**A,B**) or 3 (**C,D**) mice per group.

fluorescence of the actin gene amplicate.

2.8. Histology

Tissue samples were collected and set in 10% buffered formalin solution and later processed and embedded in paraffin for histopathological analysis. Three μ m-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and inflammatory changes were evaluated in 5 sections from each sample. Three samples of each experimental group from 3 different experiments were analyzed.

2.9. Quantitation of cytokines in sera

Cytokines in sera obtained at 7dpi were quantified using the CBA TH1/TH2/TH17 kit (Beckton Dickinson) following the instructions provided by the manufacturer.

2.10. RT-PCR assay for determination of cytokine gene expression in ileum

Ilea from the different group of mice were obtained at 7 dpi and processed for RT-PCR as previously described [30]. The cDNA was amplified using SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) and IFN- γ and TNF- α specific primers as described elsewhere [33]. The gene

expression was normalized to the expression of reference gene (GAPDH) [34] as described in Section 2.7.

2.11. Monoclonal antibodies (mAb)

The following fluorochrome-conjugated mAbs were used: anti-CD8-FITC (5H10) from Caltag; anti-CD4-FITC, -PE/Cy7 or -Pacific Blue (RM4-5); anti-CD8-PerCP (53-6.7), anti-CD25-PE or -PerCP (PC61), anti-CD44-PE (IM7), anti-CD62L-PE or -APC/Cy7 (MEL-14), anti CD69-PE or -APC (H1.2F3), anti-IFN- γ -PE/Cy7 (XMG1.2), anti-IL-2-APC (JES6-5H4), anti-TNF- α -PE (MP6-XT22), anti-IL-6-PE (MP5-20F3), anti-IL-10-PE/Cy7 (JES5-16E3) and anti-IL-17A-Alexa 647 (TC-18H10.1) from Biolegend.

2.12. Detection of intracellular cytokines

Ten million splenocytes (5×10^6 cells/ml) were incubated with PMA (10 ng/ml) and ionomycin (0.5 μ g/ml) either for 4 h (for IFN- γ , IL-2 and TNF- α) or 12 h (for IL-10, IL-6 and IL-17) in 2 ml complete RPMI medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mM non-essential aminoacids, 1 mM sodium pyruvate, 50 μ M β -mercaptoethanol and 50 IU/ml penicillin-streptomycin [GIBCO]) in each well of a 24-well plate (Costar) in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 in air. Monensin (2 mM, Sigma)

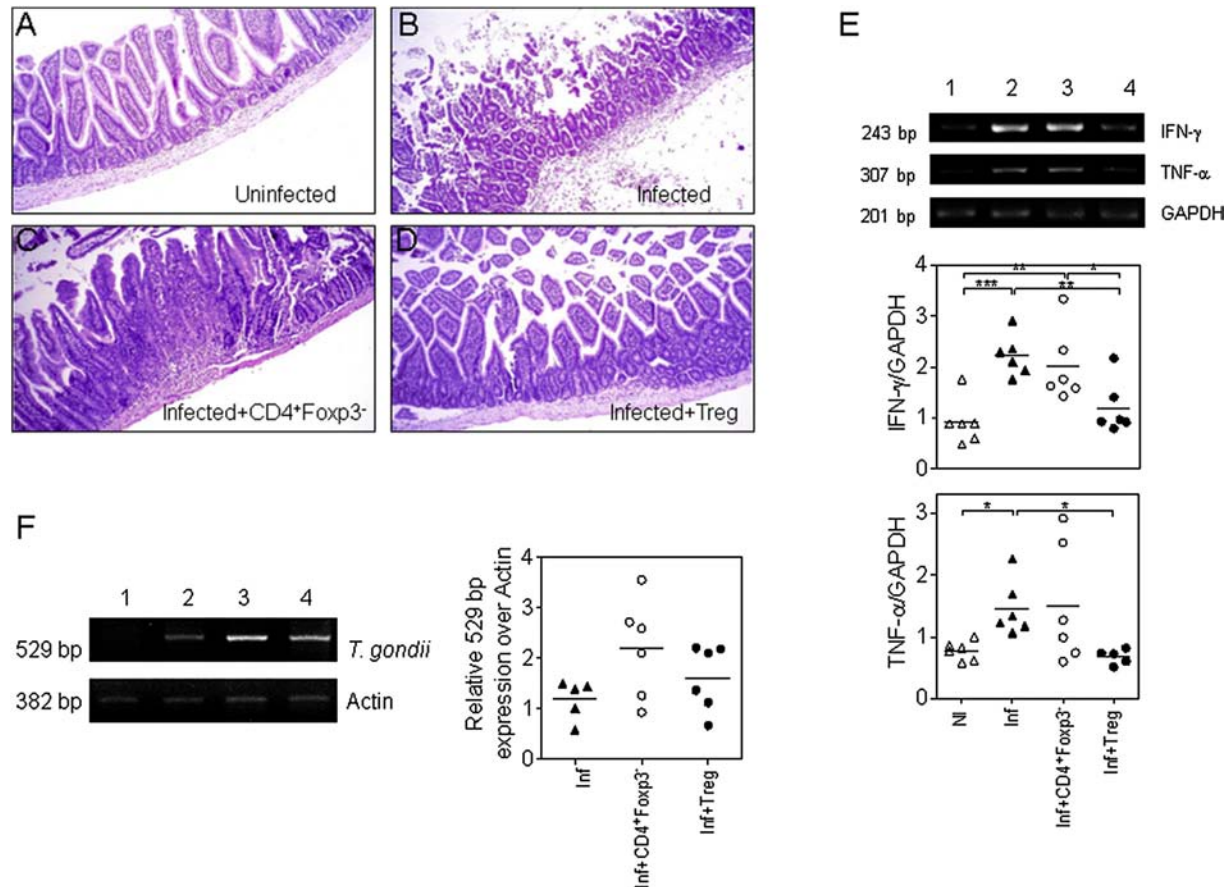


Fig. 2. Reduction of inflammation and tissue destruction of small intestine from *T. gondii*-infected mice by adoptive transfer of Treg cells. Mice infected with *T. gondii*, either transferred with Treg or CD4⁺Foxp3⁻ cells, or non transferred, were euthanized at 7 dpi. Small intestines were obtained and histological studies were carried out using H&E staining. Representative images from mice that were: **A)** uninfected, **B)** infected with *T. gondii*, **C)** infected and transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells, or **D)** infected and transferred with Treg cells. Representative data from 3 independent experiments is shown. **E)** IFN- γ and TNF- α expression in ilea. A representative gel electrophoresis and relative expression of both genes from 2 independent experiments including at least 3 mice per group are shown. Uninfected (lane 1), infected (lane 2), infected + CD4⁺Foxp3⁻ (lane 3), infected + Treg (lane 4). **F)** Parasite load was analyzed in ilea at 7 dpi as described in Material and Methods. A representative gel electrophoresis and the relative expression of *T. gondii* amplificate from all mice are shown. Uninfected (lane 1), infected (lane 2), infected + CD4⁺Foxp3⁻ (lane 3), infected + Treg (lane 4). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

was added and incubated for different periods of time in parallel cultures, according to the cytokine to be detected: 4 h for detection of IFN- γ , IL-2 and TNF- α or for the last 6 h for IL-10, IL-6 and IL-17. Cells were harvested, stained with anti-CD4-FITC and anti-CD8-PerCP mAbs (30 min, 4 °C), and intracellular staining was carried out. Cells were washed with washing buffer and 10⁶ cells were resuspended in 100 μ l p-formaldehyde (2% in DPBS) and incubated (10 min, RT, darkness). Cells were washed once with intracellular staining buffer (DPBS, 1% FCS, 0.025% saponin) and resuspended in 100 μ l of the same buffer containing the indicated anti-cytokine mAbs and incubated (10 min, RT, darkness). Cells were washed once with washing buffer, resuspended in 500 μ l DPBS and analyzed immediately by flow cytometry.

2.13. Statistical analysis

Survival rates were compared by the log-rank test. Statistical differences between groups were determined by One-Way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison test. All

statistical analysis were performed using the PRISM 5 software (GraphPad).

3. Results

3.1. Adoptive transfer of Treg cells induces partial protection to *T. gondii*-infected mice

Acute infection with *T. gondii* induces a decline in Treg cell number [24–26] and a high mortality rate in C57BL/6J mice [10]. In order to analyze if the reduced Treg cell number was related to mortality, we carried out adoptive transfer of Treg cells to infected animals. To this end, CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells were purified by cell sorting from Foxp3^{EGFP} transgenic mice, and CD4⁺Foxp3⁺ (Treg) or CD4⁺Foxp3⁻ cells were transferred to WT animals infected 2 days earlier, and changes in body weight and mortality were assessed. As can be observed in Fig. 1A, infected mice lost up to 30% of body weight during the first 15 days; a slight recovery was observed, but mice started to lose weight onwards and all animals eventually died.

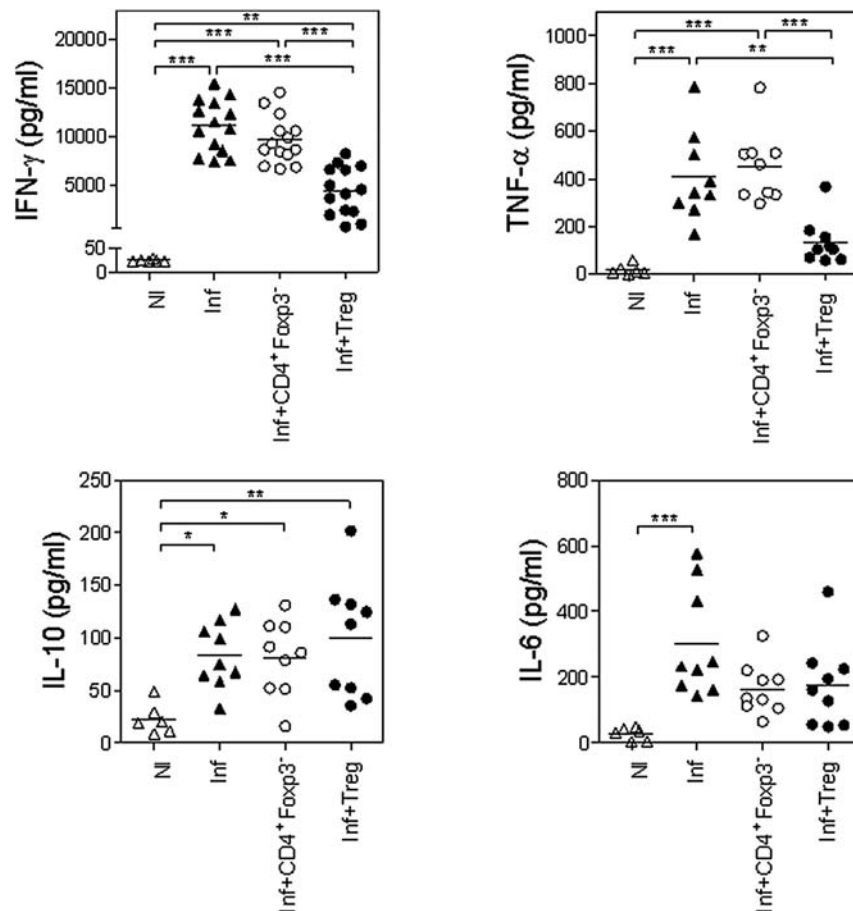


Fig. 3. **Reduction of IFN- γ and TNF- α levels in sera from infected mice transferred with Treg cells.** Mice were transferred with Treg or CD4⁺Foxp3⁻ cells 2 days after *T. gondii* infection and sera were obtained 7 days later. Levels of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-6 were analyzed in sera of mice. Each dot represents cytokine levels from individual animals and were obtained from 3 independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

A similar pattern was observed in infected mice transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells, in terms of body weight and mortality, although these mice showed an accelerated death time (Fig. 1B). Infected mice that were transferred with Treg cells, however, showed gradual body weight loss (21%) until day 13, as infected non transferred mice. This group of mice gained up to 12% of body weight, although never reached their initial weight (Fig. 1A). Nevertheless, a statistically significant delayed time to death and lower mortality were observed (Fig. 1B). Uninfected control mice that were transferred with Treg or CD4⁺Foxp3⁻ cells were unaffected (data not shown).

We analyzed the brain cyst number in surviving mice at 30 dpi in some experiments (Fig. 1C). A higher cyst number in infected Treg-transferred mice was detected, when compared with infected non-transferred mice (8975 vs 3717 cysts/brain) or with mice infected and transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells (8975 vs 2500 cysts/brain). It has to be noted that heterogeneity in brain cyst number was observed in infected Treg-transferred mice (Fig. 1C). In order to confirm the microscopic findings, we also carried out a semiquantitative PCR to analyze parasite load. The results of this analysis (Fig. 1D) confirmed that infected mice transferred with Treg cells have

higher parasite load in brain than infected mice or infected mice transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells.

3.2. Reduced immunopathology in small intestine of mice transferred with Treg cells

Death of B6 mice during *T. gondii* infection is caused by necrosis of the villi of the small intestine by the exacerbated inflammatory immune response [10]. We thus analyzed morphological changes in ileum at 7 dpi from the groups of mice described above. Infected mice showed severe destruction of intestinal mucosa and necrosis of the villi and intestinal glandules (Fig. 2B). Infected mice transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells showed an increased inflammatory infiltrate, mainly in mucosa, villi and intestinal glands (Fig. 2C). Infected mice transferred with Treg, however, showed hyperplasia in the epithelium and intestinal crypts, only showed moderate inflammatory infiltrate in the interstitial mucosa and no destruction in submucosa and muscle layer (Fig. 2D). Uninfected control mice transferred with Treg or CD4⁺Foxp3⁻ cells showed no change in ilea architecture (data not shown).

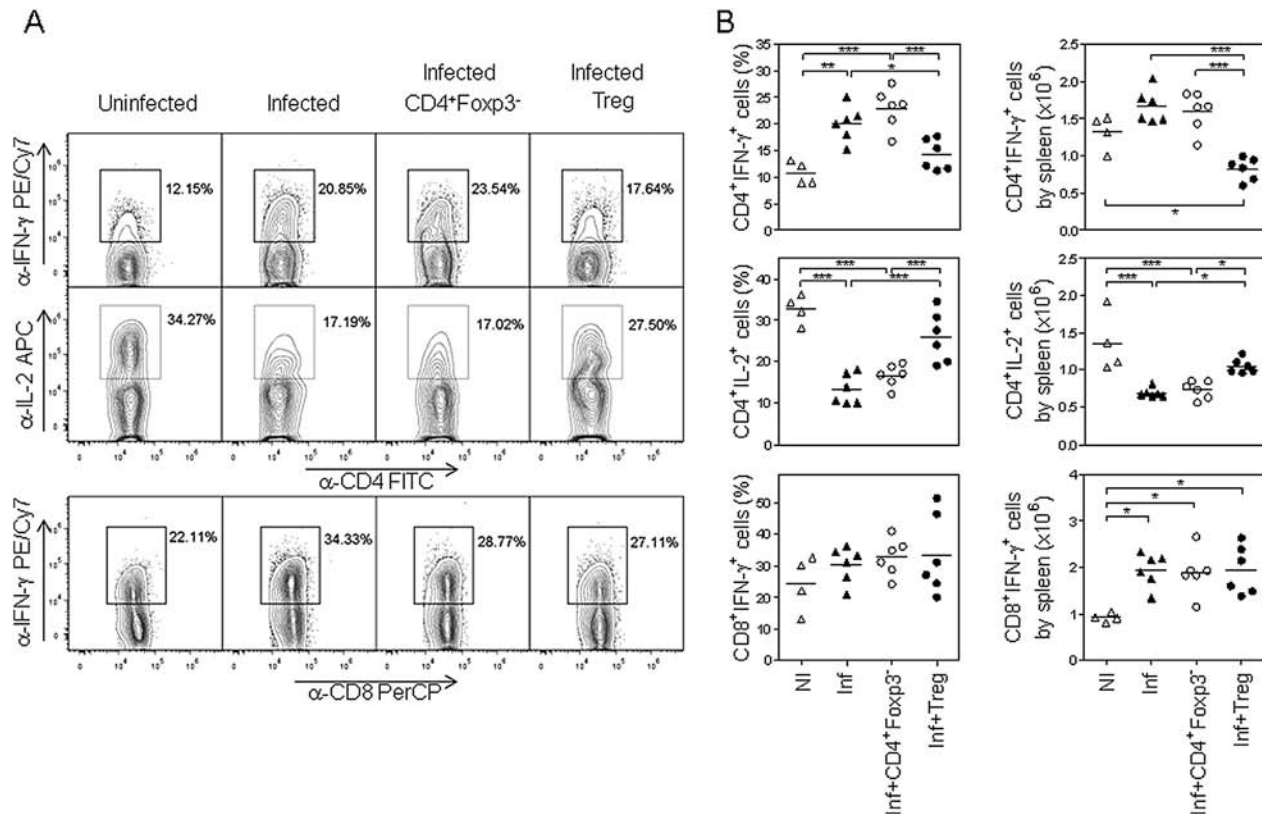


Fig. 4. Down modulation of IFN- γ production by CD4⁺ T cells in *T. gondii* infected mice transferred with Treg cells. Mice were transferred with Treg or CD4⁺Foxp3⁻ cells 2 days after *T. gondii* infection, and spleens were obtained 7 days later. **A)** Representative FACS analysis of intracellular detection of IFN- γ in CD4⁺, IL-2 in CD4⁺ and IFN- γ in CD8⁺ T cells is shown. The lymphocyte region was first defined by FSC and SSC characteristics and further subgated based on CD4 or CD8 expression. Ten thousand events from either subgate were captured. **B)** Percentage (left panel) and absolute number (right panel) of CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing IFN- γ and CD4⁺ T cells producing IL-2. Results shown are from 2 independent experiments. Each dot represent an individual mouse. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

We investigated whether the reduction in tissue damage in Treg-transferred mice was a consequence of the inflammatory response or related to the parasite load. We thus analyzed the expression of IFN- γ and TNF- α genes in ilea by RT-PCR. IFN- γ and TNF- α gene expression were increased in ilea from infected mice and in infected animals transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells (Fig. 2E). In ilea from mice transferred with Treg cells, however, expression of both cytokine genes was reduced to levels similar to those observed in uninfected mice. Parasite load was also analyzed in the same tissue by PCR but we did not detect a statistically significant difference among groups (Fig. 2F). Thus, the reduction in damage observed in ileum by transfer of Treg cells is due to the down modulation of the inflammatory immune response.

3.3. Modulation of cytokine production by CD4⁺ T cells in mice adoptively transferred with Treg

Next, we analyzed levels of some cytokines in sera of mice from the different experimental groups at 7 dpi (Fig. 3). Very high levels of IFN- γ and TNF- α were detected in infected and in infected mice transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells, while

sera of infected mice transferred with Treg showed a statistically significant reduction of both cytokine levels. We also found increased levels of IL-10 and IL-6 in infected mice, but remained high in both CD4⁺Foxp3⁻ and Treg cell-transferred infected mice. IL-2, IL-4 and IL-17 levels were undetectable (data not shown).

We also determined the cytokine-producing T cells in spleens from the different groups of mice. Control infected mice and infected mice transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells showed a high percentage and absolute number of both IFN- γ producing-CD4⁺ and -CD8⁺ cells (Fig. 4). Infected mice that were transferred with Treg cells showed a significant reduction in percentage and absolute number of IFN- γ producing CD4⁺ cells to levels similar to those observed in uninfected mice. IFN- γ producing CD8⁺ cells, however, were unaffected in mice transferred with Treg cells since they remained as high as control infected mice or mice transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells. We also observed a reduction of percentage and absolute number of CD4⁺ cells producing IL-2 in infected mice, but numbers were nearly restored to basal levels in infected mice transferred with Treg cells (Fig. 4). Levels of IL-6, IL-10, TNF- α producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells were slightly increased in infected mice, but remained high in infected mice

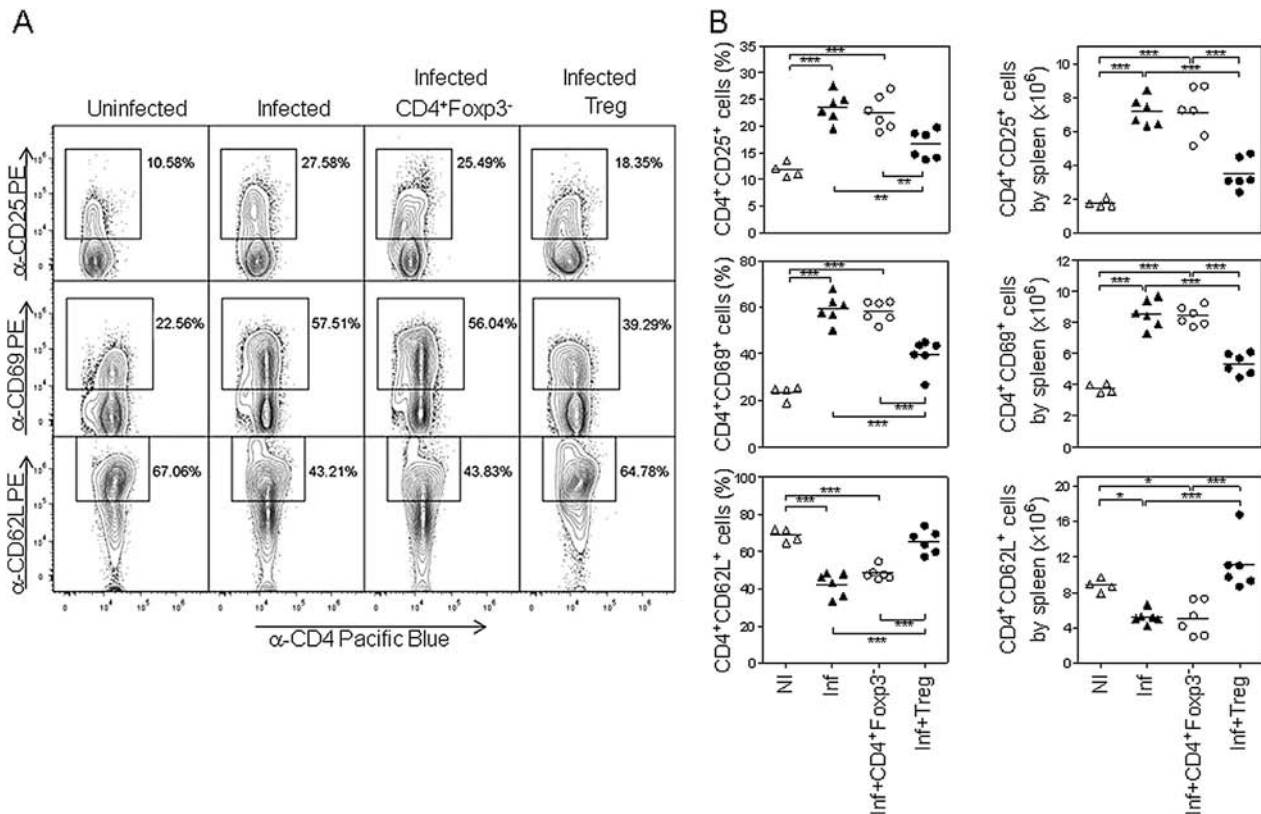


Fig. 5. Reduced number of activated CD4⁺ T cells by adoptive transfer of Treg. Splens from mice depicted in Fig. 4 were obtained, cells were stained with anti-CD4, anti-CD25, anti-CD69 and anti-CD62L mAbs and analyzed by flow cytometry. The lymphocyte gate was first defined by FSC and SSC characteristics, the CD4⁺ region was subgated and 10,000 CD4⁺ cells were captured. **A)** Representative dot plots of CD25, CD69 and CD62L expression in the CD4⁺ population. **B)** Percentage (left panel) and absolute number (right panel) of CD4⁺ cells expressing the different activation markers are shown, and were obtained from 2 independent experiments. Each dot represents an individual mouse. **p* < 0.05; ***P* < 0.01 or ****P* < 0.001, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

transferred with either Treg or CD4⁺Foxp3⁻ cells (data not shown). IL-17-producing cells were unchanged in all groups of mice when compared to uninfected animals (data not shown).

3.4. Adoptive transfer of Treg reduces activation of CD4⁺ T cells

Because we observed modulation of cytokine production by CD4⁺ T cells in mice adoptively transferred with Treg cells, we studied the activation status of CD4⁺ T cells by analyzing expression of CD25, CD69 and CD62L molecules (Fig. 5). An increased percentage and absolute number of cells expressing CD25 and CD69 was detected in infected mice and in infected animals transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells. In contrast, a statistically significant reduction of percentage and absolute number of CD4⁺ T cells expressing CD25 and CD69 was found in Treg-transferred infected mice (Fig. 5). CD62L expression showed an opposite pattern than that observed for CD69 and CD25 expression (Fig. 5). Percentage and absolute number of CD8⁺ T cells expressing CD25 and CD69 was increased in infected mice and remained elevated in infected

mice transferred with either Treg or CD4⁺Foxp3⁻ cells (data not shown). CD25 and CD69 expression levels, as determined by MFI, were increased in CD4⁺ cells from infected mice (Fig. 6), but a reduction to nearly basal levels in cells from Treg-transferred infected mice was detected. No down modulation of these molecules was detected in cells from infected mice transferred with CD4⁺Foxp3⁻ cells.

4. Discussion

In the present study, we investigated the role of Treg cells during *T. gondii* infection in the susceptible C57BL/6J strain of mice. Since Treg cell number is reduced during the acute phase of infection, we studied the role of these cells by adoptive transfer experiments. We found that infected mice transferred with Treg cells showed less severe weight loss and significant delayed mortality than infected mice, strongly suggesting that the reduction of Treg number by the parasite contributes to the susceptibility of B6 mice. In addition, ilea from Treg-transferred mice showed a reduced inflammation, reduced infiltration of lymphocytes and lower expression of IFN- γ and TNF- α genes. Reduction of IFN- γ and TNF- α

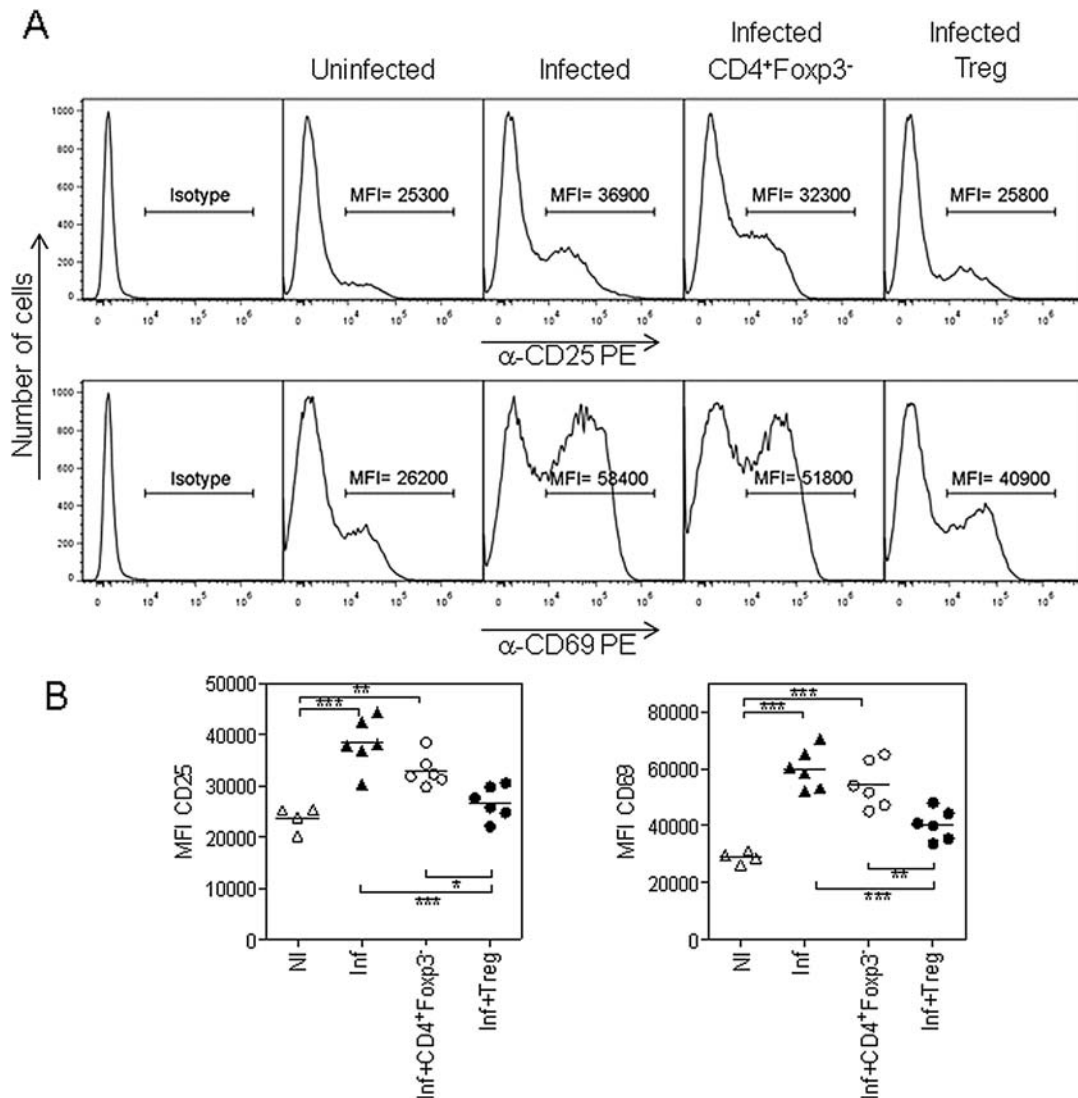


Fig. 6. **Down modulation of CD4⁺ T cell activation by adoptive transfer of Treg.** Mean fluorescence intensity (MFI) was obtained from the data showed in Fig. 5. **A)** Representative histograms of MFI for CD25 and CD69 expression from the CD4⁺ gate was determined from the CD69⁺ or CD25⁺ cells. **B)** MFI from each individual mouse is shown for all experimental groups. **p* < 0.05; ***p* < 0.01 or ****p* < 0.001, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

levels in sera and lower number of CD4⁺ T cells producing IFN- γ in spleens of Treg-transferred mice were also detected, demonstrating that the transferred Treg cells down modulated the production of pro-inflammatory cytokines associated with the immunopathology of toxoplasmosis.

It has been reported that peroral infection of B6 mice induces necrosis of the villi of the small intestine, caused by the exacerbated inflammatory immune response, that in turn, leads to death of animals [10]. Our results demonstrate that transfer of Treg cells reduced tissue damage and down modulated the highly inflammatory immune response but not the parasite load in the acute phase of infection. However, although Treg-transferred mice showed longer survival and reduced immunopathology, they showed higher parasite load in the brain in the chronic phase, indicating that down regulation of the immune response by Treg led to an ineffective control of the

parasite. Thus, our data suggest that the reduced number of Treg cells in infected B6 mice seems insufficient to regulate the exacerbated inflammatory response *in vivo* induced by *T. gondii* infection, even if the few remaining Treg cells are activated [26].

Infection with *T. gondii* induces a reduced production of IL-2 by CD4⁺ T cells, which seems to be the cause of the decrease of Treg cell number during the acute phase of this infection [24,25]. However, we surprisingly found that percentage of IL-2-producing CD4⁺ T cells was restored in infected mice transferred with Treg to levels observed in uninfected mice. It is tempting to speculate that the transferred Treg cells had an impact on the function of effector T cells, not only in down regulating the exacerbated IFN- γ production, but also in restoring IL-2 production by the same cells.

Treg cells suppress the proliferation and activation of several cell subsets by different mechanisms [20,35,36]. In our model, we found down regulation of CD4⁺ T cell activation, as shown by lower expression of CD25 and CD69 molecules in CD4⁺ cells from mice transferred with Treg cells. We only detected down-modulation of CD4⁺ T cells, but not of CD8⁺ T cells. Since it has been reported that Treg cells also modulate CD8⁺ T cells [20], an effect on this subtype in our model could not be ruled out. It could be possible that Treg cells mediate CD8⁺ T cell functions at different time points of infection, or control other CD8⁺ effector functions not analysed in this work.

Our results strongly suggest that during acute infection by *T. gondii*, the low Treg number is insufficient to control the high activation status of CD4⁺ T cells and the production of high levels of inflammatory cytokines. As a consequence, mice die by an uncontrolled inflammatory response, characterized by high IFN- γ production. Transfer of Treg cells during the acute phase of *T. gondii* infection helped animals to survive longer, although a higher parasite load was developed in the brain in the chronic phase. Hence, Treg cells seem to play a dual role during *T. gondii* infection. If low Treg cell number exists during acute infection in B6 mice, mortality is a consequence of an exacerbated immune response, but if mice are transferred with Treg cells, the immunopathology is attenuated and brain cyst burden is increased. Hence, a delicate balance between an optimal immune response and its modulation by Treg cells must exist. Our findings contribute to the knowledge of the modulatory action of Treg cells during *T. gondii* infection.

Conflict of interest

The authors have no conflicting financial or commercial interests.

Acknowledgments

This work was supported by grants IN-200608, IN-209111 and IN-210914 from PAPIIT (DGAPA, UNAM, Mexico) and by grants 102399, 102984 and 152224 from CONACYT. We thank MVZ Georgina Díaz for their expert advice and help for care of animals. J.E.O. is a recipient of a PhD fellowship from CONACYT. This work was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD Program of Doctorado en Ciencias Biomédicas of J.E.O. at the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- [1] Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363:1965–76.
- [2] Aliberti J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol* 2005;5:162–70.
- [3] Liu CH, Fan YT, Dias A, Esper L, Corn RA, Bañica A, et al. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol* 2006;177:31–5.
- [4] Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, et al. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* 2003;4:485–90.
- [5] Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol* 2014;14:109–21.
- [6] Black CM, Catterall JR, Remington JS. In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J Immunol* 1987;138:491–5.
- [7] Murray HW, Rubin BY, Carriero SM, Harris AM, Jaffee EA. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1985;134:1982–8.
- [8] Adams LB, Hibbs Jr JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 1990;144:2725–9.
- [9] Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988;240:516–8.
- [10] Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 1996;184:597–607.
- [11] Suzuki Y, Sher A, Yap G, Park D, Neyer LE, Liesenfeld O, et al. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2000;164:5375–82.
- [12] Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, et al. Conventional T-bet(+)Foxp3(–) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 2007;204:273–83.
- [13] Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Mennechet FJ, Martin V, Lepage AC, Schwartzman JD, et al. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 2001;120:914–24.
- [14] Hunter CA, Villarino A, Artis D, Scott P. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol Rev* 2004;202:106–14.
- [15] Aliberti J, Hieny S, Reis e Sousa, Serhan CN, Sher A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat Immunol* 2002;3:76–82.
- [16] Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 2013;38:414–23.
- [17] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–6.
- [18] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61.
- [19] Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531–62.
- [20] Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007;13:108–16.
- [21] Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). *Annu Rev Immunol* 2009;27:551–89.
- [22] Maizels RM, Smith KA. Regulatory T cells in infection. *Adv Immunol* 2011;112:73–136.
- [23] Sanchez AM, Yang Y. The role of natural regulatory T cells in infection. *Immunol Res* 2011;49:124–34.
- [24] Benson A, Murray S, Divakar P, Burnaevskiy N, Pifer R, Forman J, et al. Microbial infection-induced expansion of effector T cells overcomes the suppressive effects of regulatory T cells via an IL-2 deprivation mechanism. *J Immunol* 2012;188:800–10.
- [25] Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos SL, et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of

- effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 2009;31:772–86.
- [26] Tenorio EP, Fernandez J, Castellanos C, Olguín JE, Saavedra R. CD4+ Foxp3+ regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. *Eur J Immunol* 2011;41:3529–41.
- [27] Tenorio EP, Olguín JE, Fernandez J, Vieyra P, Saavedra R. Reduction of Foxp3+ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:786078.
- [28] Pina-Vazquez C, Saavedra R, Herion P. A quantitative competitive PCR method to determine the parasite load in the brain of *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Parasitol Int* 2008;57:347–53.
- [29] Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 1991;19:4293.
- [30] Sanchez Y, Rosado JD, Vega L, Elizondo G, Estrada-Muniz E, Saavedra R, et al. The unexpected role for the aryl hydrocarbon receptor on susceptibility to experimental toxoplasmosis. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:505694.
- [31] Homan WL, Vercammen M, De BJ, Verschueren H. Identification of a 200– to 300–fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 2000;30:69–75.
- [32] Sun Y, Li Y, Luo D, Liao DJ. Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. *PLoS One* 2012;7:e41659.
- [33] Ulett GC, Ketheesan N, Hirst RG. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 2000;68:2034–42.
- [34] Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. Cutting edge: impaired toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 2002;169:4697–701.
- [35] Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:531–64.
- [36] Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009;21:1105–11.

5.2. Papel del IFN- γ en la reducción de las células Tregs durante la infección con *T. gondii* en la cepa de ratón BALB/c

El IFN- γ es la principal citocina implicada en la protección durante la infección con *T. gondii* (58). Sin embargo, el IFN- γ producido por células CD4⁺ en niveles exacerbados es la causa de la susceptibilidad (64). Los antecedentes directos descritos en la presente tesis sugieren fuertemente que el IFN- γ es otro mecanismo que induce la disminución de células Tregs durante la infección con *T. gondii* (202,204,206,230,231,234).

La infección por vía ip con quistes de *T. gondii* en ratones BALB/c es un modelo para estudiar si los niveles exacerbados de IFN- γ son indicadores de la susceptibilidad y si a su vez están implicados en la disminución de células Tregs. Por otro lado la infección oral de ratones BALB/c nos permitiría estudiar la resistencia a la infección, ya que no se presentan niveles exacerbados de IFN- γ y posiblemente no exista una disminución prolongada de células Tregs. Por lo tanto, se infectaron ratones BALB/c Foxp3^{EGFP} con 20 quistes ME49 de *T. gondii* por vía oral o por vía ip y se analizaron los niveles de IFN- γ en el suero a los 10 dpi. Se observó un incremento significativo de IFN- γ en los ratones infectados por vía oral, que se vuelven exacerbados en los ratones infectados por vía ip (Fig. 20A). Ya que se ha descrito que una de las causas de la disminución de las células Tregs es una producción reducida de IL-2 por células CD4⁺ (202,206), se analizaron los niveles sistémicos pero no se detectó IL-2 por CBA (Cytometric Bead Array, límite de detección 0.01pg/ml). Se observó que los ratones infectados por vía oral sobrevivieron a lo largo de 30 días, pero los ratones infectados por vía ip murieron en la fase aguda de la infección (Fig. 20B). Se

observó una drástica disminución del porcentaje de células Tregs en la sangre en los ratones infectados por ambas vías de infección (Fig. 20C).

Para determinar si existe una relación entre el incremento en los niveles de IFN- γ con la disminución de células Tregs en la sangre, los datos obtenidos fueron analizados por medio de la correlación de Pearson. Se observó que por ambas vías de infección la correlación es cercana a -1.0, lo que indica que existe una correlación inversa entre la disminución de células Tregs y el incremento en los niveles de IFN- γ (Fig.20D). Estos resultados sugieren que el IFN- γ podría estar implicado en la disminución de células Tregs durante la infección con *T. gondii* en ambas vías de infección.

También se analizó en el bazo el porcentaje de células Tregs, y se observó que en los ratones infectados por vía oral hubo una disminución de células Tregs, la cual es mayor cuando la infección es por vía ip (Fig. 21A-B). La producción de IFN- γ por células CD4⁺ y CD8⁺ aumentó de manera significativa durante la infección oral, pero se incrementó de manera exacerbada durante la infección ip (Fig. 21A-B). Al evaluar la producción de IL-2 por células CD4⁺, se observó que por ambas vías de infección hubo una disminución significativa de estas células (Fig. 21A-B). Al analizar los datos por medio de la correlación de Pearson, se observó que por ambas vías de infección hubo una correlación directa entre la disminución de células Tregs con la disminución en la producción de IL-2 por células CD4⁺, como se ha descrito previamente (Fig. 21C) (202,206), mientras que se observó una correlación inversa entre la disminución de células Tregs con el incremento en la producción de IFN- γ por células CD4⁺ o CD8⁺ (Fig. 21C). Sin embargo, la correlación entre las distintas variables fue más cercana a 1.0 o -1.0 respectivamente, cuando la

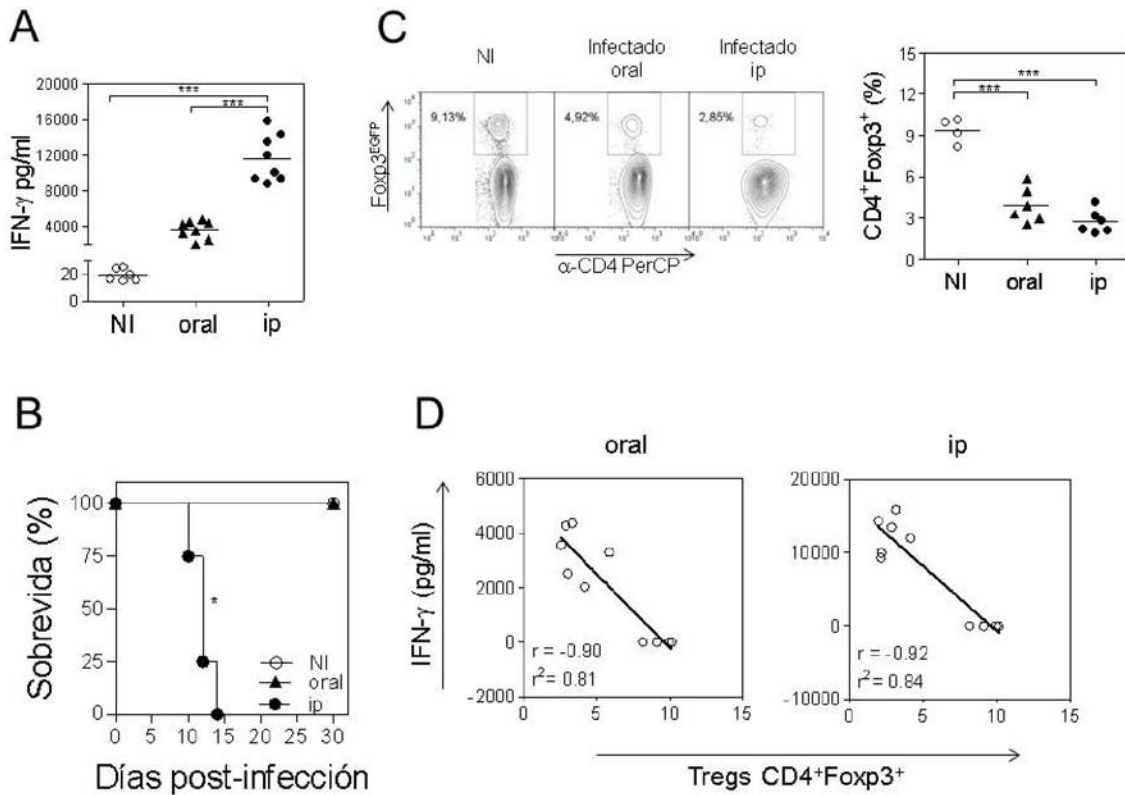


Fig. 20. La disminución de células Tregs correlaciona con el incremento en el IFN- γ en la sangre en la cepa de ratón BALB/c durante la infección con *T. gondii*. Ratones BALB/c-Foxp3^{EGFP} fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía ip y a los 10 dpi se realizaron distintos análisis. A) Sobrevida a lo largo de 30 dpi *P<0.05, Prueba Log-Rank. B) Densiti plots representativos de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺ en la sangre y datos totales del porcentaje de células Tregs en la sangre. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las células se realizó tomando 20,000 eventos de células CD4⁺. C) Niveles de IFN- γ en el suero. D) los datos de la sección B y C fueron sometidos a una correlación de Pearson. Ratones no infectados (O), infectados con 20 quistes por la vía oral (\blacktriangle), infectados con 20 quistes por la vía ip (\bullet) o infectados con 20 quistes por la vía oral (A, B y C). Datos totales de 2 experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

infección es por vía ip (Fig. 21C). Todos estos resultados sugieren que el incremento en la producción de IFN- γ por células CD4⁺ y CD8⁺, así como la disminución en la producción de IL-2 por células CD4⁺ podrían estar implicados en la disminución de las células Tregs durante la infección con *T. gondii* en ambas vías de infección. Sin embargo, como se observó una mayor correlación entre las distintas variables durante la infección ip sumado a que esta vía de infección causa susceptibilidad, los experimentos subsecuentes se realizaron únicamente infectando a los ratones BALB/c por vía ip.

Dados los resultados descritos en los párrafos anteriores y a la disponibilidad de ratones BALB/c STAT-1 KO (donados por el Dr. Ignacio Terrazas), se decidió estudiar de manera indirecta una posible participación del IFN- γ en la disminución de células Tregs. STAT-1 (Signal transducers and Activators of Transcription-1) es una molécula transductora de señales y un factor de transcripción que se encuentra río abajo de los receptores de los interferones (apartado 1.3.2) (253,254). Su función es transcribir genes ligados a los interferones en forma de homodímero para el IFN- γ y como heterodímero (junto a STAT-2) para el IFN- α y - β (253,254). Es importante mencionar que los ratones STAT-1 KO producen IFN- γ , pero su señalización es disfuncional (255). Se infectaron ratones BALB/c WT y STAT-1 KO con 20 quistes de *T. gondii* por vía ip para analizar la sobrevivencia y el porcentaje de células Tregs en sangre. Se observó que los ratones STAT-1 KO fueron más susceptibles a la toxoplasmosis que los ratones WT infectados por la vía ip (Fig. 22A). Cuando se analizó el porcentaje y número de células Tregs sistémicas, se observó una disminución significativa de células Tregs incluso desde los 2 dpi y conforme pasa el tiempo de infección la disminución sistémica de Tregs es mayor (Fig. 22B-C).

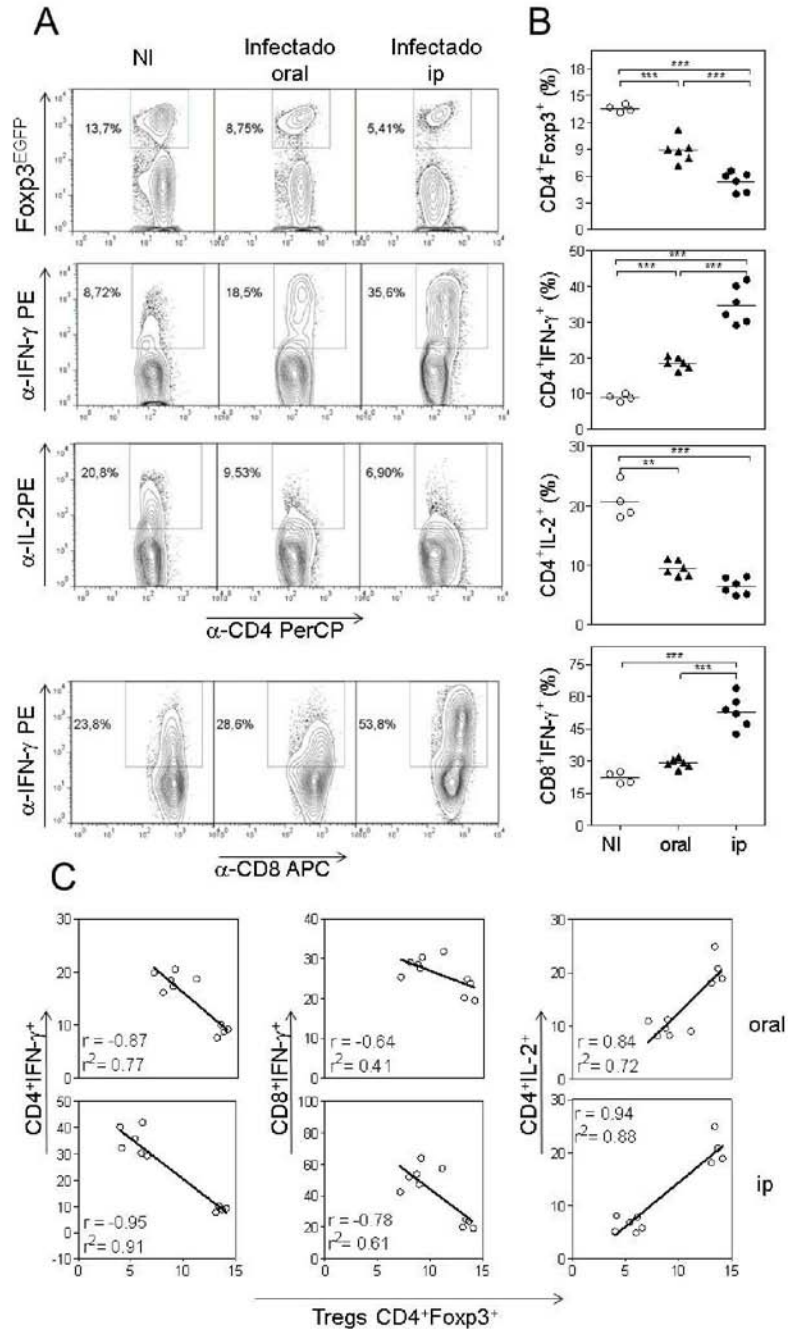


Fig. 21. La disminución de células Tregs correlaciona con el incremento en el IFN- γ y la disminución en la producción de IL-2 por células CD4⁺ en el bazo. Ratones BALB/c-Foxp3^{EGFP} fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía ip y a los 10 dpi se realizaron distintos análisis. A) Density-plots representativos de las poblaciones de células CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-2⁺ y CD8⁺IFN- γ ⁺. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realizó tomando 20,000 eventos de células CD4⁺ o CD8⁺. B) Datos totales del porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-2⁺ y CD8⁺IFN- γ ⁺. C) Los datos de la sección A y B fueron sometidos a una correlación de Pearson. Ratones no infectados (O), infectados con 20 quistes por la vía oral (▲), infectados con 20 quistes por la vía ip (●) o infectados con 20 quistes por la vía oral (A y B). Datos totales de 2 experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

Sin embargo, en los ratones STAT-1 KO no se observó disminución en porcentaje y número de células Tregs (Fig. 22B-C), lo cual sugiere que STAT-1 participa en la disminución de células Tregs e indirectamente implica al IFN- γ en la disminución de células Tregs.

En estos mismos ratones se evaluó el porcentaje y el número de células Tregs en el bazo así como de células CD4⁺ productoras de IFN- γ e IL-2 y de células CD8⁺ productoras de IFN- γ . Debido a que los ratones STAT-1 KO infectados comenzaron a morir a los 7 dpi, se realizaron los experimentos a los 6 dpi. No se observó disminución de células Tregs en el bazo a los 6 dpi (Fig. 22D-E), pero el porcentaje y el número de las células Tregs aumentó de manera significativa en el bazo de los ratones STAT-1 KO infectados (Fig. 22D-E). Se observó que por la estimulación, las células CD4⁺ de ratones no infectados WT y STAT-1 KO produjeron IFN- γ e IL-2 (Fig. 22D-E). Se observó también que en los ratones WT infectados, las células CD4⁺IFN- γ ⁺ aumentaron mientras que las células CD4⁺IL-2⁺ disminuyeron en porcentaje y en número de manera significativa (Fig. 22D-E). En los ratones STAT-1 KO infectados las células CD4⁺IFN- γ ⁺ no aumentaron, pero de manera inesperada las células CD4⁺IL-2⁺ permanecieron disminuidas en porcentaje y número (Fig. 22D-E). En los ratones WT infectados las células CD8⁺IFN- γ ⁺ aumentaron, pero no se observó un aumento significativo en los ratones STAT-1 KO infectados (Fig. 22D-E). Se analizaron los niveles sistémicos de citocinas inflamatorias en los mismos grupos experimentales descritos, y se observó que los niveles de IFN- γ y TNF- α aumentaron en los ratones WT infectados, y sólo aumentaron ligeramente en los ratones STAT-1 infectados (Fig. 22F). Es importante mencionar que no se detectaron niveles sistémicos de IL-2 en ninguno de nuestros grupos experimentales, incluidos ratones no infectados. Todos estos

datos demuestran que STAT-1 participa en la disminución de células Tregs e implican de manera indirecta al IFN- γ como otro posible mecanismo causante de la disminución de células Tregs.

Debido a que los resultados del párrafo anterior implican indirectamente al IFN- γ en la disminución de células Tregs, se analizó de manera directa el papel de esta citocina por neutralización del IFN- γ con anticuerpo anti-IFN- γ (IgG1 de rata anti-ratón) en ratones BALB/c-Foxp3^{EGFP} infectados. Se añadió un grupo experimental de ratones infectados, los cuales fueron inyectados con un anticuerpo del mismo isotipo como control, pero dirigido a una molécula diferente (IgG1 de rata, F4-1D1). En primer lugar se purificó el anticuerpo a partir del sobrenadante de cultivo del hibridoma R4-6A2, el cual secreta el anticuerpo anti-IFN- γ . Se comprobó la pureza del anticuerpo por una electroforesis desnaturizante, observando únicamente 2 bandas que corresponden a la cadena pesada y ligera del anticuerpo (Fig. 23A). Posteriormente se inyectaron 500 μ g de anticuerpo α -IFN- γ o F4-1D1, a los -1 y 3 dpi (Fig. 23B) para analizar la sobrevida, así como el porcentaje y número de células Tregs en la sangre de los ratones. Se observó 100% de mortalidad en los ratones infectados e inyectados con el anticuerpo α -IFN- γ a los 10 dpi (Fig. 22C), mientras que 30% de los ratones infectados y aquellos infectados e inyectados con el anticuerpo F4-1D1 sobrevivieron hasta los 15 dpi, cuando finalizó el experimento (Fig. 23C). Al analizar el porcentaje y el número de las células Tregs sistémicas, se observó que estas células disminuyeron en los ratones infectados y en los ratones infectados e inyectados con el anticuerpo F4-1D1 desde los 4 dpi, siendo más notable la disminución conforme avanzó el tiempo de infección (Fig. 22D-E). Sin embargo, en los ratones

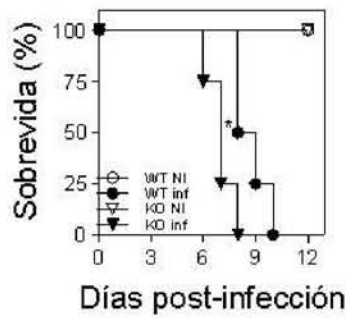
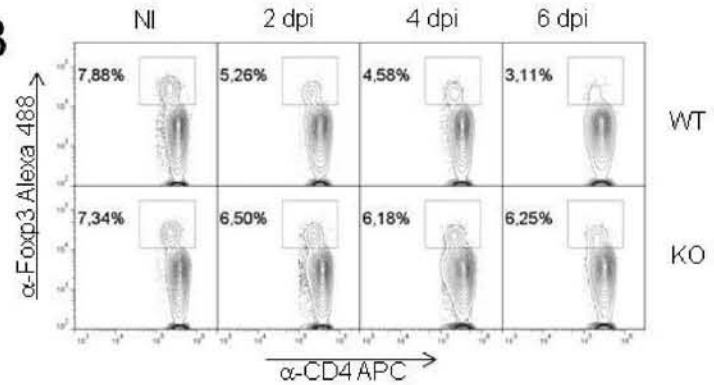
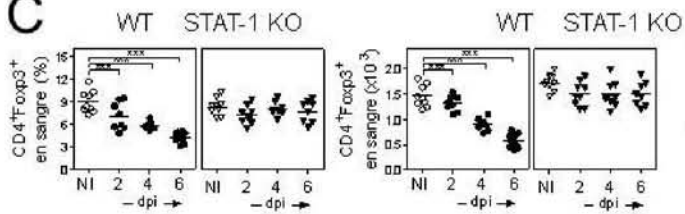
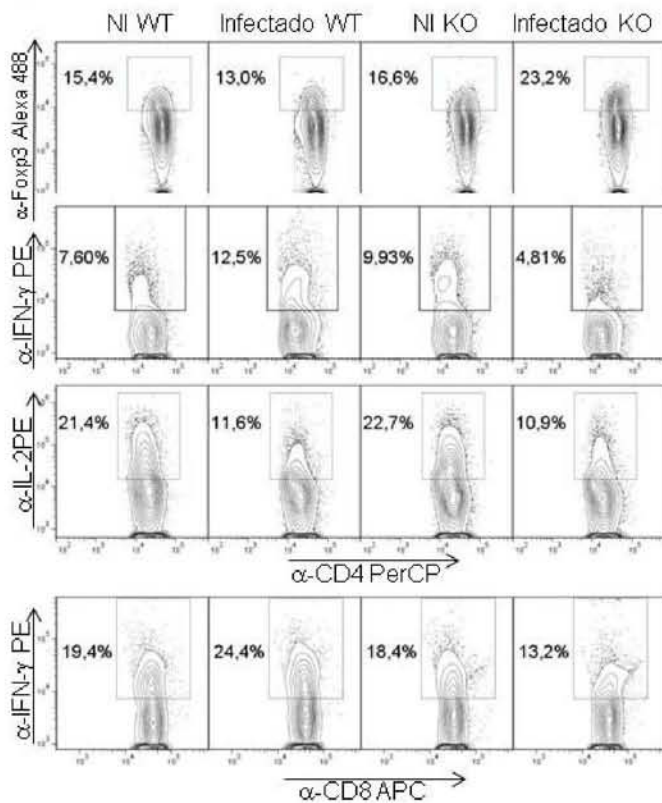
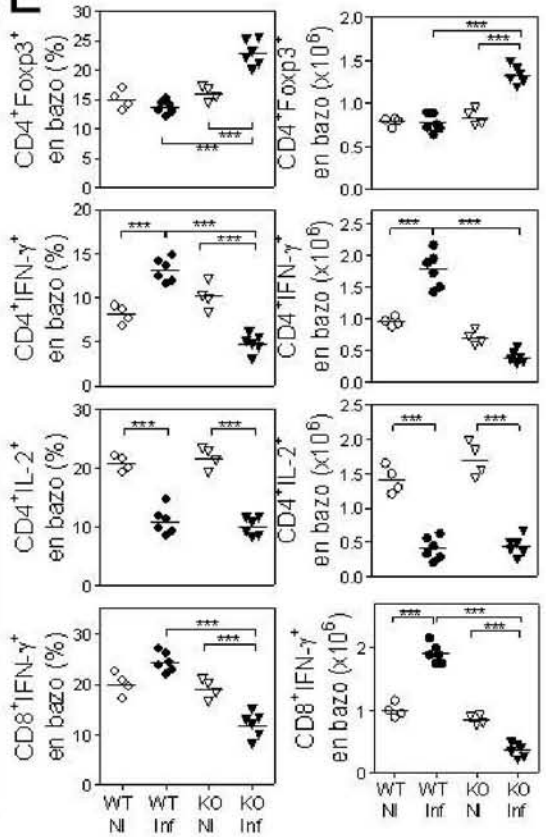
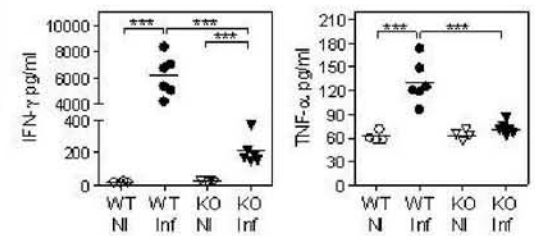
A**B****C****D****E****F**

Fig. 22. STAT-1 está implicado en la disminución de células Tregs durante la infección con *T. gondii*.

Ratones BALB/c WT y STAT-1 KO fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía ip y a los 6 dpi se realizaron distintos análisis. A) Sobrevida de los ratones a lo largo de 12 dpi. * $p < 0.05$, prueba Log Rank. B) Density-plots representativos de muestras de sangre. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las células se realizó tomando 20,000 eventos de células CD4⁺. C) Porcentaje y número de células Tregs por muestra de sangre. D) Density-plots representativos de las poblaciones de células CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-2⁺ y CD8⁺IFN- γ ⁺. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realizó tomando 20,000 eventos de células CD4⁺ o CD8⁺. E) Datos totales del porcentaje y del número de células CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-2⁺ y CD8⁺IFN- γ ⁺. F) Niveles en suero de IFN- γ . Ratones WT no infectados (○), WT infectados con 20 quistes por la vía ip (●) STAT-1 KO no infectados (▽) y STAT-1 infectados con 20 quistes por la vía ip (▼) (A, C, E y F). Datos totales de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

infectados e inyectados con el anticuerpo α -IFN- γ no se observó disminución de células Tregs en porcentaje y número a lo largo del tiempo del experimento (Fig. 23D-E). Estos resultados sugieren fuertemente que el IFN- γ es el causante de la disminución de las células Tregs.

Con el propósito de demostrar de manera definitiva que el IFN- γ es el causante de la disminución de las células Tregs, se usaron los ratones IFN- γ KO, los cuales fueron infectados, al igual que ratones BALB/c WT, con 20 quistes de *T. gondii* por vía ip, para analizar la sobrevida y el porcentaje de células Tregs en la sangre. Se observó que los ratones IFN- γ KO fueron más susceptibles a la toxoplasmosis que los ratones WT infectados por vía ip (Fig. 24A), de manera similar a los ratones STAT-1 KO infectados (Fig. 21A). Cuando se analizó el porcentaje y el número de células Tregs sistémicas, se observó una disminución sistémica significativa de células Tregs a partir de los 4 dpi y, conforme pasa el tiempo de infección se incrementa la disminución sistémica de Tregs (Fig.

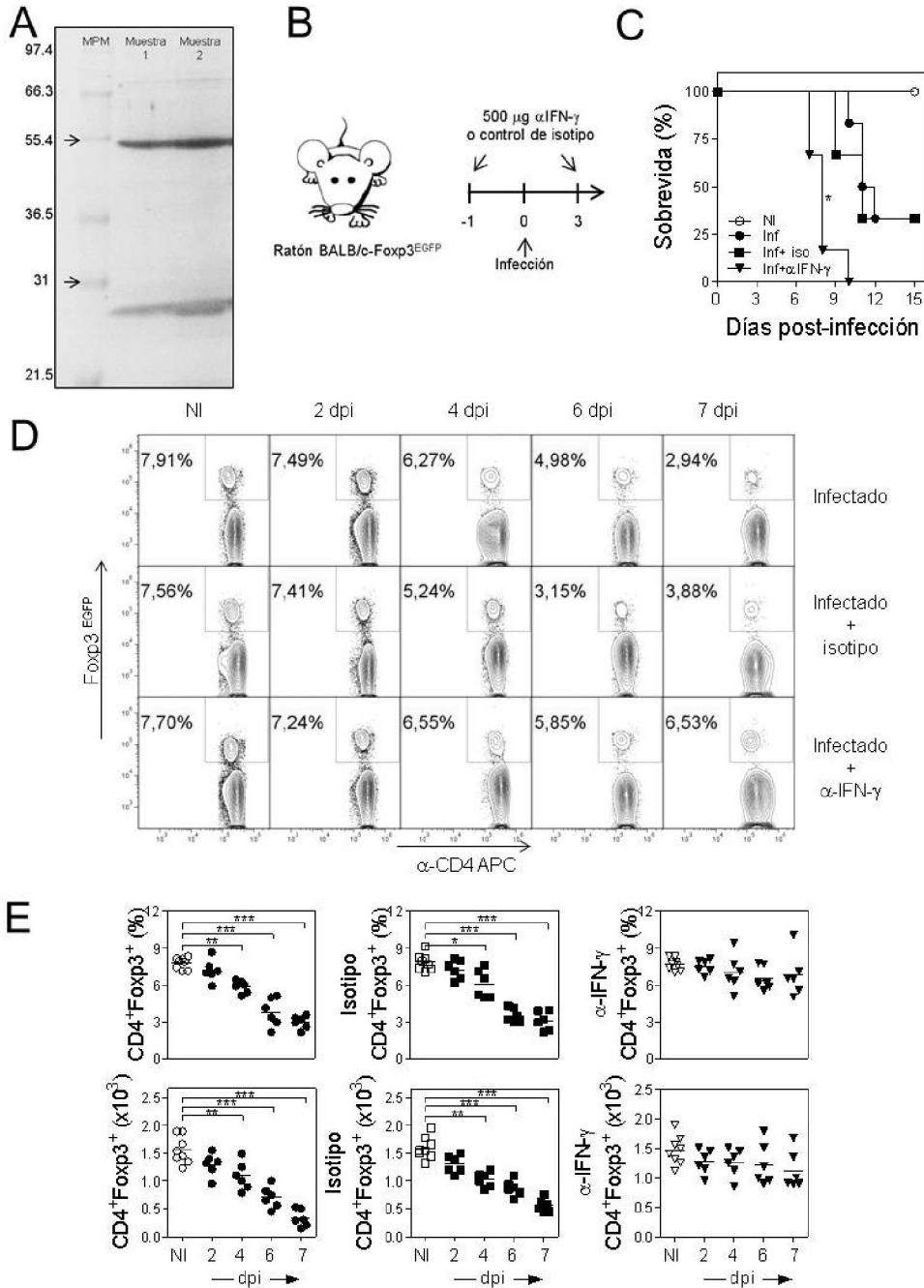


Fig. 23. La neutralización del IFN- γ evita la disminución de células Tregs durante la infección con *T. gondii*. Ratones BALB/c-Foxp3^{EGFP} fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía ip. A) Gel de acrilamida que muestra la pureza de 2 muestras representativas de 25 µg de anticuerpo α-IFN- γ . Se muestran 2 bandas: una cercana a los 50 y otra a los 25 KDa. B) Estrategia experimental de la neutralización del IFN- γ . C) Sobrevivida de los ratones a lo largo de 15 dpi. * $p < 0.05$, prueba Log Rank. D) Density-plots representativos de muestras de sangre. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las células se realizó tomando 20,000 eventos de células CD4⁺. E) Porcentaje y número de células Tregs por muestra de sangre. Ratones BALB/c-Foxp3^{EGFP} no infectados (○), infectados (●), no infectados + isotipo (□), infectados + isotipo (■), no infectados + α-IFN- γ (▽), infectados + α-IFN- γ (▼) (C y E). Datos totales de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

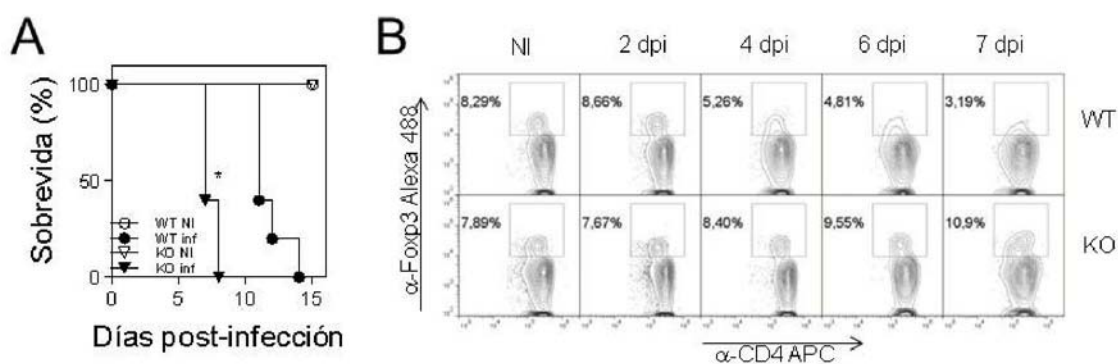
24B-C). Sin embargo, en los ratones IFN- γ KO no se observó disminución en porcentaje y número de células Tregs (Fig. 24B-C), lo cual demuestra de manera definitiva que el IFN- γ causa la disminución de las células Tregs en la sangre.

Se analizó el porcentaje y el número de células Tregs así como la producción de IFN- γ e IL-2 por células CD4⁺, y de IFN- γ por células CD8⁺ en el bazo de todos los grupos. Debido a que la curva de sobrevivencia en los ratones IFN- γ KO infectados es muy similar a la de los ratones STAT-1 KO infectados (Fig. 22A), los experimentos se realizaron a los 6 dpi. No se observó disminución de células Tregs en el bazo a los 6 dpi (Fig. 24D-E), al igual que en los ratones STAT-1 KO infectados (Fig. 22D-E). Sin embargo, se observó un incremento significativo en porcentaje y número de células Tregs en el bazo de los ratones IFN- γ KO infectados (Fig. 24D-E). Se observó que por la estimulación, las células CD4⁺ de ratones no infectados WT produjeron IFN- γ e IL-2, mientras que las células CD4⁺ de ratones IFN- γ KO no infectados no produjeron IFN- γ pero sí IL-2 en niveles similares a los ratones WT no infectados (Fig. 24D-E). Se observó también que aumentaron las células CD4⁺IFN- γ ⁺ y disminuyeron las células CD4⁺IL-2⁺ en los ratones WT infectados en porcentaje y número de manera significativa. Sin embargo, en los ratones IFN- γ KO infectados se detectaron algunas células CD4⁺IFN- γ ⁺ y de manera sorprendente, las células CD4⁺IL-2⁺ se mantuvieron disminuidas en porcentaje y número (Fig. 24D-E). Cuando analizamos a las células CD8⁺IFN- γ ⁺, se observó que en los ratones WT infectados aumentaron y en los ratones IFN- γ KO infectados se detectaron ligeramente (Fig. 24D-E). Se analizaron los niveles sistémicos de citocinas inflamatorias a los 6 dpi, se observó que los niveles de IFN- γ y TNF- α aumentaron en los ratones WT infectados, mientras que no se detectaron niveles

de IFN- γ , y los niveles de TNF- α aumentaron ligeramente en los ratones IFN- γ KO infectados (Fig. 24F). Es importante mencionar que no se detectaron niveles sistémicos de IL-2 en ninguno de nuestros grupos experimentales. Todos estos datos demuestran que el IFN- γ es otro mecanismo que causa la disminución de las células Tregs.

5.2.1. Mecanismos que inducen la disminución de células Tregs por el IFN- γ

El efecto del IFN- γ sobre la disminución de células Tregs podría explicarse de manera directa si existe un aumento en la expresión del receptor CD119 en las células Tregs. Es importante mencionar que las células Tregs expresan constitutivamente bajos niveles del



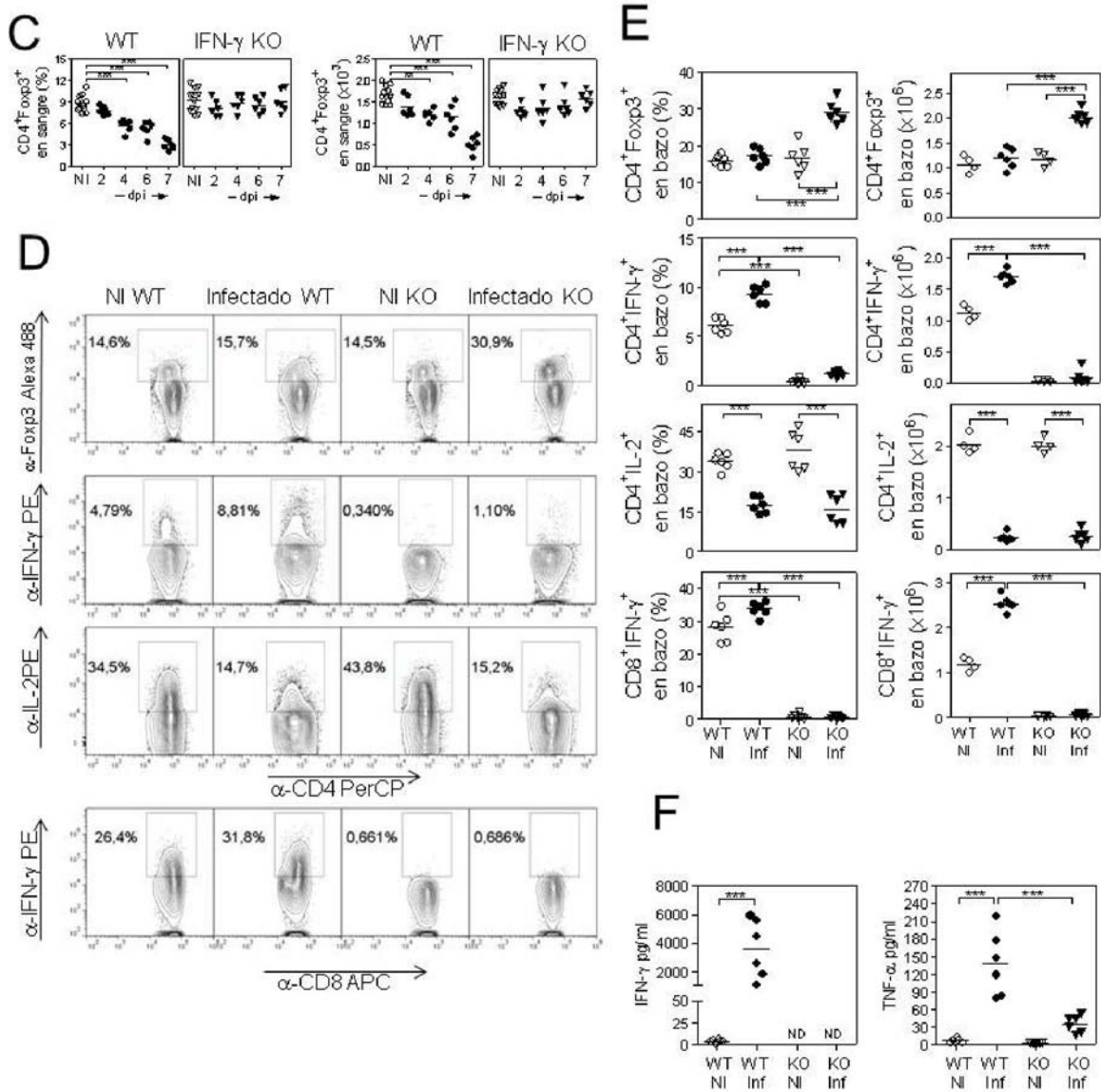


Fig. 24. El IFN- γ es el causante de la disminución de células Tregs durante la infección con *T. gondii*. Ratones BALB/c WT e IFN- γ KO fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía ip y a los 6 dpi se realizaron distintos análisis. A) Sobrevida de los ratones a lo largo de 15 dpi. * $p < 0.05$, prueba Log Rank. B) Density-plots representativos de muestras de sangre. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las células se realizó tomando 20,000 eventos de células CD4⁺. C) Porcentaje y número de células Tregs por muestra de sangre. D) Density-plots representativos de las poblaciones de células CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-2⁺ y CD8⁺IFN- γ ⁺. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realizó tomando 20,000 eventos de células CD4⁺ o CD8⁺. E) Datos totales del porcentaje y del número de células CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-2⁺ y CD8⁺IFN- γ ⁺. F) Niveles en suero de IFN- γ . Ratones WT no infectados (○), WT infectados con 20 quistes por la vía ip (●) IFN- γ KO no infectados (▽) e IFN- γ infectados con 20 quistes por la vía ip (▼) (A, C, E y F). Datos totales de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

receptor de IFN- γ (229). Por lo tanto, se analizó el porcentaje y el número de las células Tregs que expresan el receptor CD119 en el bazo de ratones WT e IFN- γ KO no infectados e infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía ip. Se confirmó que en el bazo de los ratones WT infectados no disminuyó el porcentaje y número las células Tregs a los 6 dpi (Fig. 25A-B), pero en los ratones IFN- γ KO infectados aumentó el porcentaje y el número de las células Tregs (Fig. 25A-B). Asimismo, se observó que aumentó de manera significativa el porcentaje y el número de las células Tregs que expresan el receptor de IFN- γ únicamente en los ratones WT infectados y no así en los ratones IFN- γ KO infectados (Fig.25A-B). Estos resultados demuestran que durante la infección ip con *T. gondii* aumenta la expresión del receptor de IFN- γ en las células Tregs, de manera dependiente al IFN- γ .

El siguiente paso fue analizar si las células Tregs mueren o transforman su fenotipo como consecuencia de la exposición al IFN- γ . Se estudió la viabilidad de las células Tregs en los grupos experimentales descritos en el párrafo anterior, utilizando el colorante Zombie Aqua, por citometría de flujo. Se observó una disminución significativa de la viabilidad de las células Tregs en porcentaje y número, en ratones WT infectados (Fig. 25A-B), pero la viabilidad en las células Tregs provenientes de ratones IFN- γ KO infectados no se vio afectada, siendo similar a la observada en ratones WT e IFN- γ KO no infectados (Fig. 25A-B). Por lo tanto, el IFN- γ causa la muerte de una proporción de las células Tregs

Durante la infección con *T. gondii* las células Tregs expresan el factor de transcripción Tbet, y por lo tanto inclinan su fenotipo hacia el fenotipo T_h1 (206). Se ha sugerido también que la transformación del fenotipo es dependiente del microambiente predominante (T_h1,

T_h2 o T_h17) (256). Por lo tanto, se analizó si las células Tregs provenientes de ratones WT e IFN- γ KO no infectados e infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* expresan el factor de transcripción T-bet. En los ratones WT infectados aumentó el porcentaje y el número de las células Tregs que expresan T-bet, mientras que en los ratones IFN- γ KO infectados únicamente hubo un ligero aumento en porcentaje, pero no en número (Fig. 25A-B). Por lo tanto, también la disminución de células Tregs es consecuencia de una transformación en el fenotipo, la cual es dependiente a su vez de los altos niveles de IFN- γ .

5.2.2. La IL-7 mantiene a las células Tregs en los ratones IFN- γ KO infectados

Como se describió en la Fig. 24, en los ratones IFN- γ KO infectados observamos un alto porcentaje y número de células Tregs en el bazo, y no observamos la disminución sistémica de células Tregs causada por la infección con *T. gondii*. Lo que resultó inesperado y controversial fue que la producción de IL-2 por células T-CD4⁺ se mantuviera disminuida en estos mismos ratones. Que no hayamos observado la disminución de células Tregs, posiblemente sea causado porque otra población de linfocitos T producen la IL-2 que mantiene a las Tregs. La IL-2 es producida principalmente por los linfocitos T-CD4⁺, pero también las células T-CD8⁺ y T-NK pueden producir IL-2 (249). Para determinar si hay otra población de linfocitos T que produce IL-2 en el bazo, se infectaron ratones BALB/c WT e IFN- γ KO con 20 quistes ME49 por vía ip, a los 6 dpi fueron sacrificados para cultivar células de bazo, las cuales fueron estimuladas con α -CD3 por 24 hrs de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, y se analizaron los niveles de IL-2 e IFN- γ en el sobrenadante del cultivo de estas células.

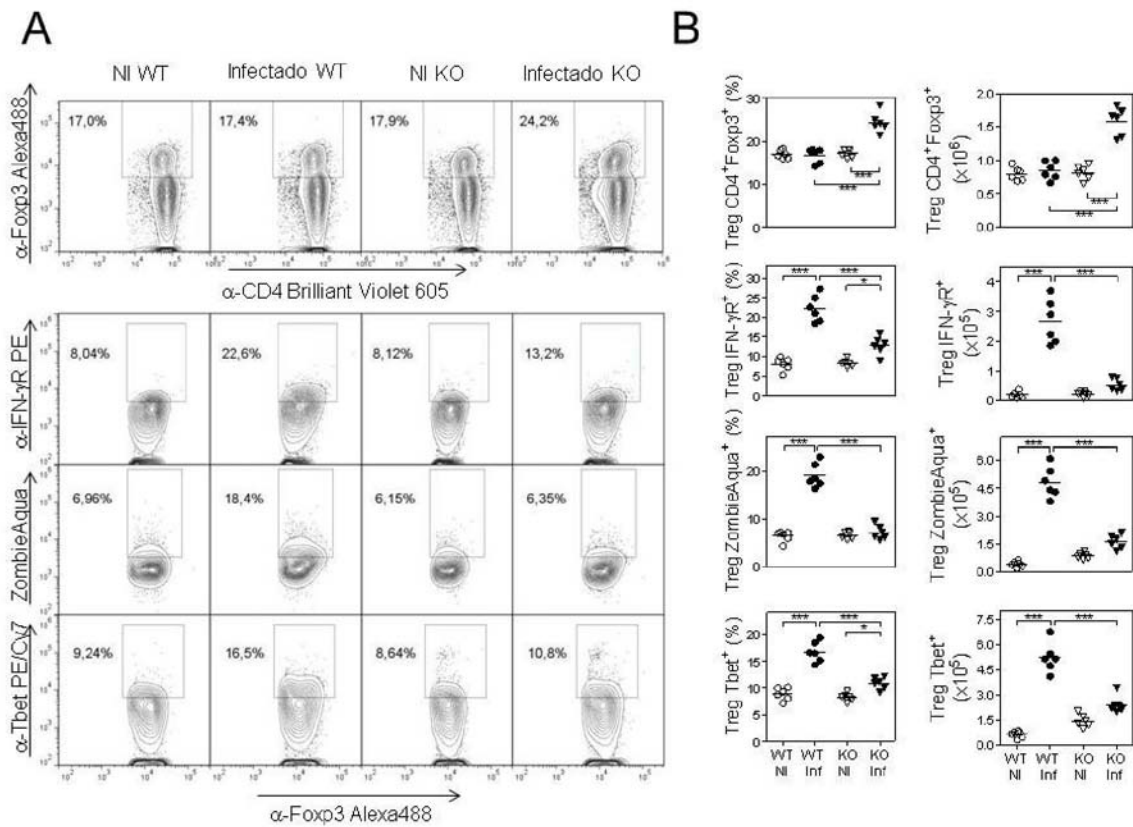


Fig. 25. Incremento del receptor de IFN- γ , incremento en la expresi3n de T-bet y decremento en la viabilidad dependiente de IFN- γ en las c3lulas Tregs durante la infecci3n con *T. gondii*. Ratones BALB/c WT e IFN- γ KO fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por v3a ip y a los 6 dpi se extrajo el bazo. A) Density-plots representativos y B) datos totales en porcentaje y n3mero de c3lulas Tregs CD4⁺Foxp3⁺ que expresan el receptor de IFN- γ (CD119), el factor de transcripci3n T-bet y que son positivas para el colorante Zombie-Aqua. La regi3n de linfocitos fue definida de acuerdo a las caracter3sticas de tama3o (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realiz3o tomando 5,000 eventos de c3lulas CD4⁺Foxp3⁺. Datos totales de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; one-way ANOVA con una prueba de Tukey.

Se observó que las células de bazo provenientes de ratones WT no infectados produjeron IL-2 e IFN- γ (Fig. 26A, Tabla VIII). Cuando las células provinieron de ratones WT infectados, se observó que la producción de IFN- γ aumentó, mientras que la de la IL-2 disminuyó (Fig. 26A, Tabla VIII). Las células provenientes de ratones IFN- γ KO no infectados o infectados no produjeron IFN- γ (Fig. 26A, Tabla VIII). Las células de ratones IFN- γ KO no infectados produjeron IL-2 inclusive en niveles superiores a los de un ratón WT no infectado (Fig. 26A, Tabla VIII). Sin embargo, las células de ratones IFN- γ KO infectados mantuvieron disminuida la producción de IL-2 (Fig. 26A, Tabla VIII). Estos resultados sugieren que no hay otra población de linfocitos T en el bazo que produzca IL-2. Asimismo, confirmamos que existe una baja producción de IL-2 en los ratones WT e IFN- γ KO infectados.

Niveles en sobrenadante de IL-2 e IFN-γ (pg/ml\pmD.E.)				
citocina	WT		KO	
	No inf	Inf	No inf	Inf
IL-2	106.1 \pm 17.25	28.10 \pm 6.67	202.4 \pm 55.96	31.88 \pm 9.75
IFN-γ	367.7 \pm 120.9	5707 \pm 768.9	ND	ND

Tabla VIII. Niveles en sobrenadante de IFN- γ e IL-2 de células de bazo estimuladas con α -CD3. ND= no detectado. D.E: desviación estándar

Durante la infección con *T. gondii* en ratones IFN- γ KO hay incremento en porcentaje y número de células Tregs (Fig. 24D-E y 25A-B). Sin embargo, si la producción de IL-2 por células CD4⁺ está disminuida (Fig. 24D-E) y los niveles de IL-2 en sobrenadante de cultivo permanecen bajos (Fig. 26A), debe existir otra citocina que se encargue del mantenimiento de las células Tregs en los ratones IFN- γ KO infectados. La IL-7 tiene similitudes con la IL-2 en su funcionalidad, ya que es una citocina que puede encargarse del mantenimiento de las células Tregs, sumado a que la cadena γ del receptor de la IL-7 es la misma que la del receptor de la IL-2 (257-259), y se ha sugerido que la IL-7 puede actuar manteniendo a los linfocitos T cuando existen niveles bajos de IL-2 (260). Con el fin de estudiar si la IL-7 podría actuar sobre las células Tregs directamente, se analizó la expresión de su receptor (CD127) en estas células. Las células Tregs en condiciones basales expresan bajos niveles del receptor CD127 (261), sin embargo, cuando se analizó a los 6 dpi a las células Tregs de ratones WT infectados, se observó que aumentó el porcentaje y el número de células Tregs que expresan el receptor CD127 (Fig. 26B-C). En los ratones IFN- γ KO no infectados, se observó que las células Tregs de manera basal tienen una expresión aumentada de CD127, la cual no se modificó en las células Tregs de los ratones IFN- γ KO infectados (Fig. 26B-C). Estos resultados sugieren que posiblemente las células Tregs de los ratones IFN- γ KO son más sensibles a la IL-7, porque ya expresan constitutivamente su receptor pero la infección no modifica la alta expresión del receptor CD127.

Se analizó la expresión del gen de la IL-7 en el bazo, lo cual sugeriría que la IL-7 puede encargarse del mantenimiento de las células Tregs de los ratones IFN- γ KO infectados. Se observó una expresión basal del gen de la IL-7 en los ratones WT e IFN- γ KO no infectados (Fig. 26D-E), en los ratones WT infectados la expresión del gen de IL-7 se mantuvo similar

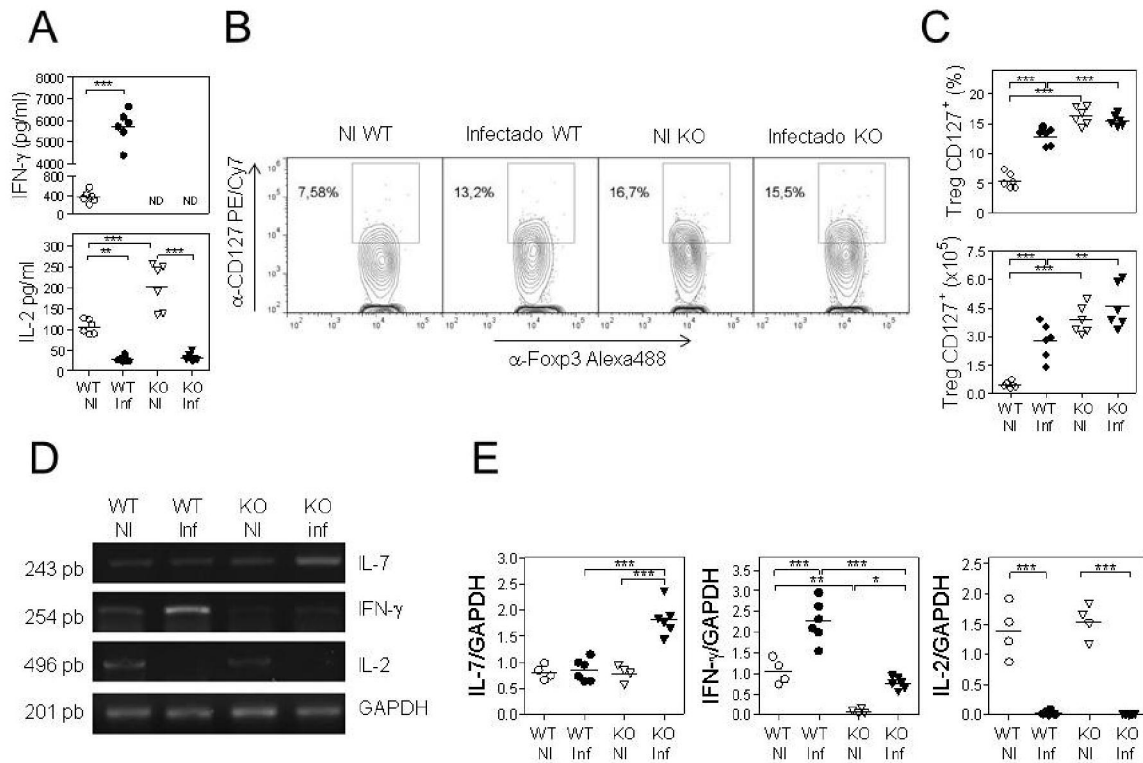


Fig. 26. La IL-7 se encarga del mantenimiento de las células Tregs durante la infección con *T. gondii* en ausencia de IFN- γ e IL-2. Ratones BALB/c-WT e IFN- γ KO fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía ip y a los 6 dpi se extrajo el bazo. Niveles de IFN- γ e IL-2 en sobrenadante de cultivo de células de bazo estimuladas con α -CD3. Los niveles de citocinas se detectaron por medio de CBA. Las condiciones de cultivo y la detección de citocinas por CBA se describen en materiales y métodos. B) Density-plots representativos y C) datos totales en porcentaje y número de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺ expresando el receptor de la IL-7 (CD127). La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las poblaciones se realizó tomando 5,000 eventos de células CD4⁺Foxp3⁺. En otro grupo de ratones se analizó la expresión de las citocinas IFN- γ , IL-2 e IL-7 y la expresión del gen constitutivo GAPDH. D) Gel representativo y E) datos totales de la expresión relativa de los genes de IL-7, IFN- γ e IL-2 con relación al gen constitutivo GAPDH. Datos totales de 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; one-way ANOVA con una prueba de Tukey.

a la observada en ratones no infectados (Fig. 26D-E), mientras que en los ratones IFN- γ KO infectados aumentó de manera significativa (Fig. 26D-E), lo cual sugiere que la IL-7 puede encargarse del mantenimiento de las células Tregs.

Además de analizar la expresión del gen de IL-7, se analizó la expresión del gen de IFN- γ y de la IL-2, lo cual confirmaría de una manera alterna los resultados obtenidos hasta el momento. Se observó una expresión basal del gen de IFN- γ en los ratones WT no infectados, la cual aumentó en los ratones WT infectados (Fig. 26D-E). También se observó una ligera expresión del gen de IFN- γ en los ratones IFN- γ KO no infectados e infectados, pero siempre por debajo de la expresión basal observada en ratones WT no infectados (Fig. 26D-E). Se observó que los ratones WT e IFN- γ KO no infectados expresaron el gen de la IL-2, mientras que la infección en ambas cepas de ratón produjo una reducida expresión del gen de la IL-2 (Fig. 26D-E). Estos resultados demuestran que durante la infección ip en ratones BALB/c WT hay un aumento en la expresión del gen del IFN- γ y una disminuida expresión del gen de IL-2, mientras que en los ratones IFN- γ KO hay una disminuida expresión tanto del gen del IFN- γ como del gen de IL-2. Todos estos resultados en conjunto sugieren que la IL-7 se encarga del mantenimiento del elevado porcentaje y número de células Tregs durante la infección ip de ratones BALB/c IFN- γ KO.

Debido a que los resultados del párrafo anterior sugieren que la IL-7 se encarga del mantenimiento de las células Tregs, se evaluó si la administración de IL-7 recombinante (rIL-7) a ratones BALB/c-Foxp3^{EGFP} podría mantener el porcentaje de células Tregs durante la infección con *T. gondii* y por lo tanto, evitar la disminución de células Tregs. Se infectó a ratones con 20 quistes por vía ip y a los 3 dpi se les inyectó 1 μ g de rIL-7 por vía

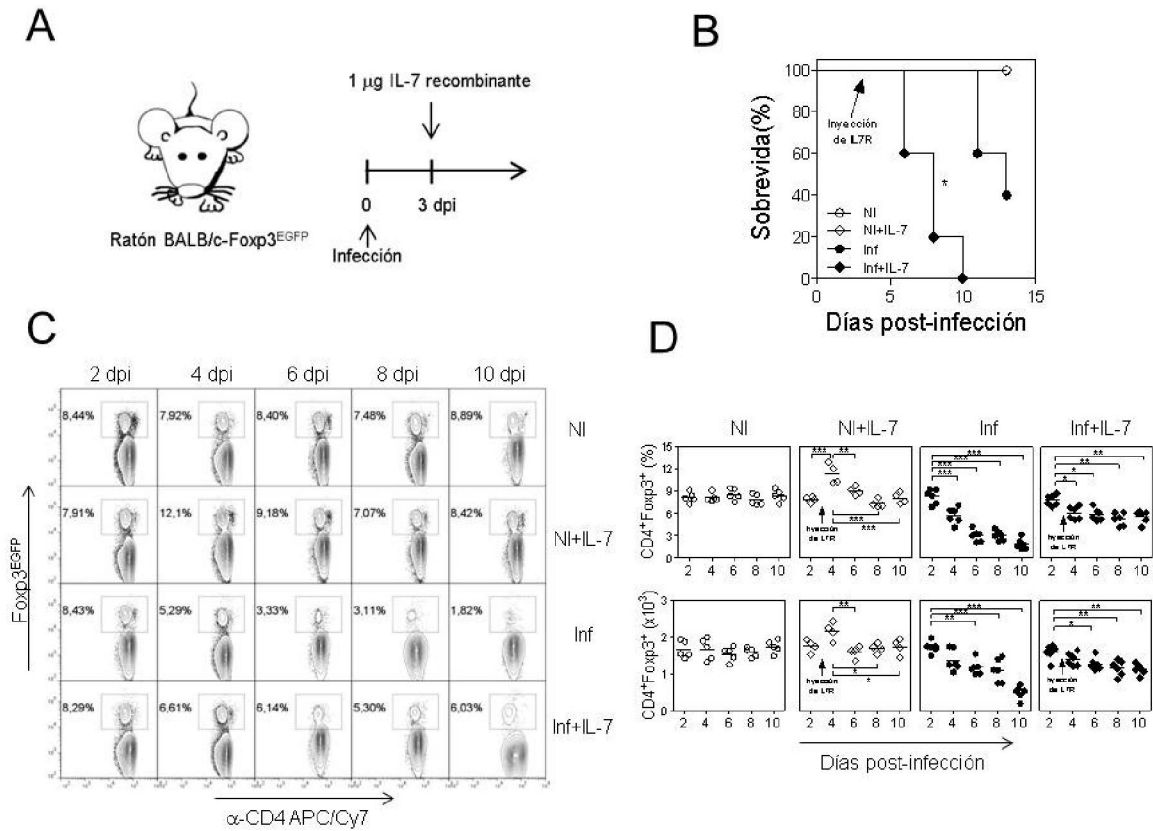


Fig. 27. La inyección de rIL-7 evita la disminución drástica de células Tregs durante la infección con *T. gondii*. Ratones BALB/c-Foxp3^{EGFP} fueron infectados con 20 quistes Me49 de *T. gondii* por vía ip. A) Estrategia experimental de la inyección de IL-7R. B) Sobrevivida de los ratones a lo largo de 13 dpi. *p<0.05, prueba Log Rank. C) Density-plots representativos de muestras de sangre. La región de linfocitos fue definida de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). La captura de las células se realizó tomando 20,000 eventos de células CD4⁺. D) Porcentaje y número de células Tregs por muestra de sangre. Ratones BALB/c-Foxp3^{EGFP} no infectados (○), infectados (●), no infectados + IL-7R (◇), infectados + IL-7R (◆) (B y D). Datos totales de 2 experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; prueba ANOVA de una vía con una post-prueba de Tukey.

ip (Fig. 27A). Se observó que los ratones infectados e inyectados con rIL-7 fueron susceptibles a la infección, alcanzando el 0% de supervivencia en los 10 dpi (Fig. 27B), lo cual es muy similar a lo observado en los ratones STAT-1 KO (Fig. 22A) o IFN- γ KO (Fig. 24A). Cuando se analizó el porcentaje y el número de células Tregs en la sangre, se observó que la inyección de rIL-7 a ratones no infectados indujo un aumento transitorio del porcentaje y número de células Tregs a los 4 dpi. Se observó que por la infección hay disminución de células Tregs en porcentaje y número, siendo más notable a partir de los 6 dpi y conforme avanza el tiempo del experimento. Sin embargo, en los ratones infectados que fueron inyectados con rIL-7 se observó únicamente una disminución ligera de células Tregs, que se mantuvo a lo largo del tiempo del experimento. Estos datos demuestran que la IL-7 evita la disminución exacerbada de las células Tregs y que puede encargarse del mantenimiento de las células Tregs durante la infección con *T. gondii* en los ratones IFN- γ KO infectados

Los resultados obtenidos en esta sección, serán el objeto de la siguiente publicación, que será sometida a la revista *Journal of Experimental Medicine*

A major role for IFN- γ in the reduction of
CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells
during lethal parasitic infection

Jonadab E. Olguín^{a,b}, Nohemí Salinas^{a,d}, Imelda Juárez^b, Jacquelina
Fernández^a, Miriam Rodríguez-Sosa^b, Luis Ignacio Terrazas^b and Rafael
Saavedra^{a*}

^aDepartamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City. ^bUnidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Los Reyes Iztacala, Estado de Mexico. ^dUnidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City Mexico.

*Corresponding author: Rafael Saavedra, PhD. Mailing address: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70228, Ciudad Universitaria, CP 04510, México City, México. Phone: (52) 5556223832. e-mail: saavedra@unam.mx

Abstract

A reduction of Treg cells during *T. gondii* infection has been described, and this reduction seems to be related by some mechanisms that include death and phenotypic transformation in Treg cells, and low IL-2 production by CD4⁺ cells. In the present paper we demonstrate that, in addition with low IL-2 production by CD4⁺ cells, IFN- γ is the major cause of Treg cell reduction, because is the cytokine that orchestrate the death and the phenotypic transformation in Treg cells during *T. gondii* infection. Surprisingly, in infected IFN- γ KO mice, Treg cells percentage and number are increased, but IL-2 production by CD4⁺ cells remains low. We described an IL-2-independent mechanism for the maintenance of Treg cells in infected IFN- γ KO mice. In these mice, IL-7 gene expression in spleen and IL-7 receptor (CD127) expression in Treg cells are increased. The administration of recombinant IL-7 to infected Foxp3^{EGFP} mice prevents the exacerbated reduction of Treg cells. Also, we demonstrate that exacerbated Treg cell reduction caused by high levels of IFN- γ is a hallmark of the susceptibility during *T. gondii* infection.

6. Discusión

El estudio de la participación de las células Tregs durante distintas enfermedades infecciosas ha sido muy amplio y diverso. Como se describió en la Introducción, en algunas enfermedades infecciosas se ha demostrado que el número de las células Tregs aumenta, lo cual limita la respuesta inmune y promueve la persistencia del parásito. En otras enfermedades infecciosas la capacidad supresora de las células Tregs disminuye, lo que favorece una respuesta inmune exacerbada que concluye en la muerte del hospedero (208-225,262-267).

Durante la infección con *T. gondii* ocurre un fenómeno interesante y ampliamente descrito, donde las células Tregs disminuyen durante la fase aguda de la infección (202-207) como consecuencia de varios eventos que ocurren al mismo tiempo, los cuales incluyen: una disminución en la capacidad de producir IL-2 por las células T-CD4⁺ (202,206), la muerte de las células Tregs y la expresión del factor de transcripción T-bet, el cual se asocia a una respuesta T_h1 (206).

Algo que ha resultado controversial son las conclusiones obtenidas por los distintos grupos que han estudiado el fenómeno de reducción de células Tregs. Por un lado se ha sugerido que como consecuencia de esta reducción existe la susceptibilidad (206), mientras que por otro lado se ha sugerido que esta reducción es necesaria para que exista resistencia (202).

Con el fin de discernir si la reducción de células Tregs es necesaria para la protección o si está implicada en la susceptibilidad, en la presente tesis se realizaron experimentos de transferencia adoptiva de células Tregs a ratones B6 infectados. Primero se tuvieron que definir algunas variables que ayudaron a la realización óptima de los experimentos. Estas

variables incluyeron: el enriquecimiento de células CD4⁺ de bazo, el tiempo en que debe realizarse la transferencia adoptiva, y que la protección inducida por células Tregs de ratones no infectados e infectados es la misma en términos de sobrevida y peso. El enriquecimiento de células CD4⁺ optimizó la viabilidad celular y el tiempo invertido para la obtención del número total de células Tregs requeridas para la realización de los experimentos de transferencia adoptiva. Se determinó que la transferencia adoptiva de células Tregs debe realizarse durante la infección, ya que al realizarse antes de infectar no se observaron diferencias en la sobrevida y en el peso al comparar con ratones que únicamente fueron infectados. Los resultados obtenidos apoyan lo publicado en la literatura, donde se describió que al transferir células Tregs a hembras preñadas durante la infección con *T. gondii* se genera protección (203,205).

La transferencia adoptiva de células Tregs prolongó la sobrevida y evitó la disminución drástica en el peso de los ratones B6 infectados. Sin embargo, se observó que la carga parasitaria en el cerebro aumentó a los 30 dpi. Debido a esto, se decidió analizar la respuesta inmune generada contra el parásito. En los ratones transferidos e infectados se observó una clara disminución de la respuesta inmune en el intestino aunque no disminuyó la carga parasitaria. Estos resultados sugieren que no hay una acción directa de las células Tregs transferidas sobre el parásito, sino que la respuesta inmune disminuida, que es consecuencia de la transferencia de células Tregs, favorece que el parásito se reproduzca, lo que posiblemente sea la causa de la muerte de los ratones durante la fase crónica de la infección. Es importante recordar que la causa de la susceptibilidad de la cepa de ratón B6 durante la infección con *T. gondii* es la respuesta inmune exacerbada y no la carga parasitaria (35,64,241).

Con los experimentos realizados en el bazo de los ratones B6, se observó una clara regulación de las células CD4⁺ por la transferencia adoptiva de células Tregs, que se tradujo en la disminución de la producción de citocinas pro-inflamatorias y en la disminución de las moléculas de activación. Sin embargo, un resultado sorprendente es que la transferencia adoptiva de células Tregs no disminuyó la activación de la respuesta CD8⁺. Se ha demostrado que las células Tregs pueden controlar la actividad efectora de las células CD8⁺ (268), y que éstas forman parte fundamental en la producción de IFN- γ durante la infección con *T. gondii* (55). Posiblemente, el tiempo en el que se pudiera observar un efecto regulador sobre la activación y la producción de IFN- γ en las células CD8⁺ por la transferencia de células Tregs, no fue el que se evaluó en el presente proyecto. También, probablemente las células Tregs transferidas modulen una acción efectora de las células T CD8⁺ distinta a la producción de IFN- γ o a la activación de moléculas de membrana, ya que las células CD8⁺ tienen otras funciones efectoras, como citotoxicidad (269).

No solo en el presente proyecto se ha sugerido que el restablecimiento de las células Tregs tiene un efecto regulador sobre la respuesta inmune durante la infección con *T. gondii*. Como ya se ha mencionado anteriormente, la transferencia adoptiva de células Tregs a hembras preñadas e infectadas con *T. gondii* disminuye el riesgo al aborto (203,205). Por otro lado, el tratamiento a ratones con los compuestos nutricionales resveratrol, curcumina y simvastatina durante la infección con *T. gondii*, evita que las células Tregs disminuyan y por lo tanto existe un efecto regulador de la respuesta inmune T_h1 exacerbada, lo que lleva a una sobrevida prolongada (270).

Las células Tregs tienen una capacidad supresora muy amplia, con muchos mecanismos directos e indirectos (Fig. 9). Debido a los requerimientos de la respuesta inmune durante la

toxoplasmosis en el ratón B6, las células Tregs disminuyen en la fase aguda de la infección, sin embargo lo hacen de una manera drástica, que causa un incremento exacerbado de la respuesta inmune inflamatoria caracterizada por el IFN- γ (Fig. 28). Al transferir células Tregs se prolongó la sobrevida y disminuyó la respuesta inmune exacerbada, pero en consecuencia hay una carga parasitaria incrementada y los ratones mueren en la fase crónica de la infección. Por lo tanto, la infección oral con *T. gondii* en el ratón B6 es un modelo agresivo, en donde habrá mortalidad en la fase aguda por causa de la respuesta inmune exacerbada, o en la fase crónica de la infección por causa de una carga parasitaria incrementada. Sin embargo en el ambiente, *T. gondii* ha desarrollado muchas estrategias de co-evolución para poder sobrevivir a la respuesta inmune generada en el hospedero intermediario.

Dos reportes descritos en la literatura son importantes para comparar los resultados obtenidos en la presente tesis y poder concluir en conjunto. Estos dos reportes tienen conclusiones contrastantes: uno sugiere que la reducción de las células Tregs concluye en la susceptibilidad (206), mientras que el otro sugiere que esta reducción es necesaria para la resistencia (202). Aunque se describan conclusiones contradictorias durante el estudio de la disminución de las células Tregs utilizando una misma cepa de ratón (B6), se debe tomar en cuenta la vía de inoculación del parásito, ya que un reporte estudió la disminución de las células Tregs por la vía oral (206), y el otro reporte lo hace por la vía ip (202). Los ratones B6 son susceptibles a la toxoplasmosis por la vía oral, pero son resistentes a la

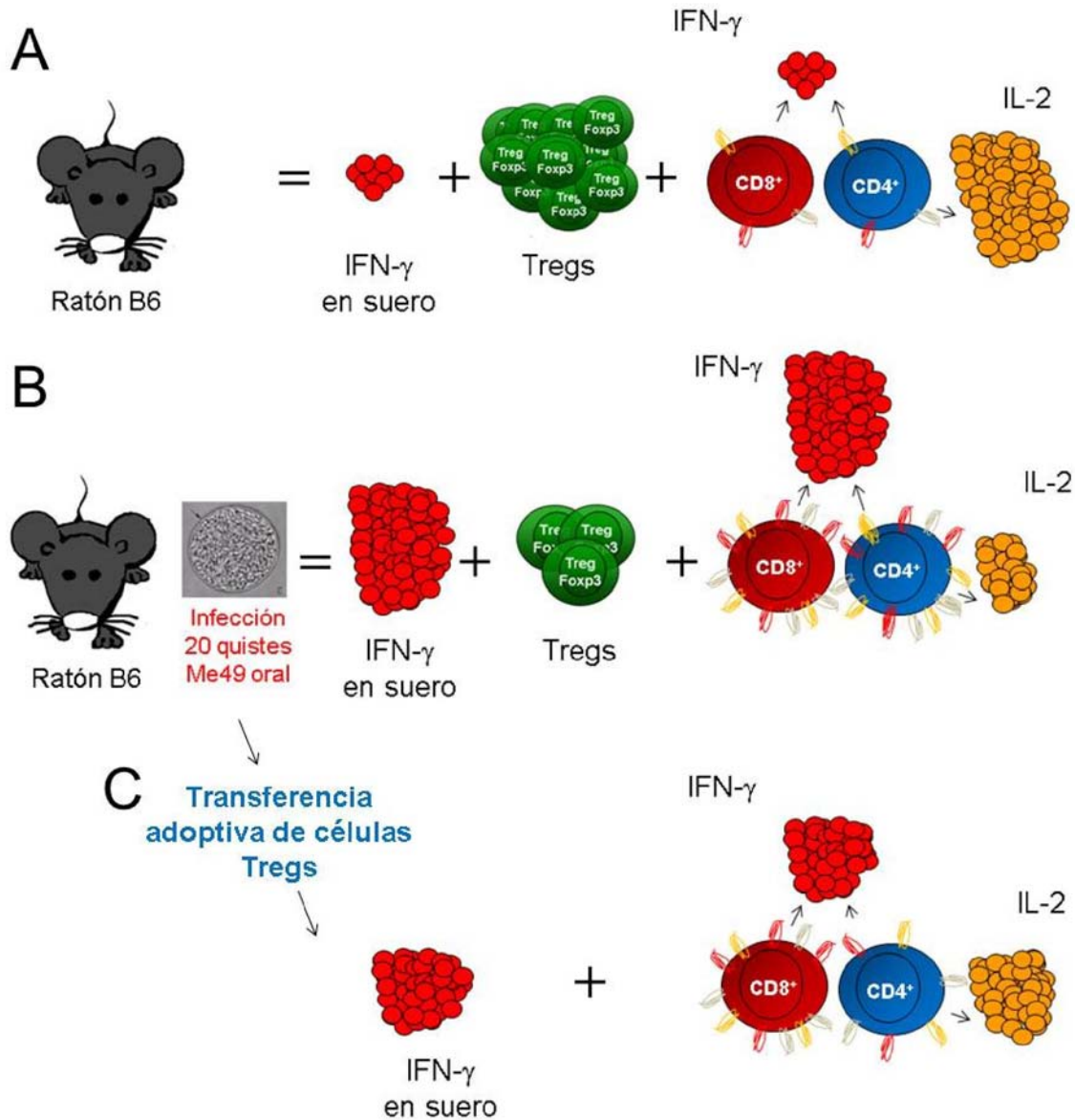


Fig. 28. La transferencia adoptiva de células Tregs controla la respuesta inmune durante la infección oral con *T. gondii* a ratones B6. A) Descripción gráfica de la respuesta inmune en un ratón B6 no infectado, donde hay bajos niveles de IFN- γ en suero, hay cierto porcentaje y número de células Tregs, las células CD4⁺ producen IFN- γ e IL-2 y no están activadas, las células CD8 estimuladas producen IFN- γ y no están activadas B) Cuando el ratón es infectado por la vía oral los niveles de IFN- γ en el suero aumentan, hay disminución en porcentaje y número de las células Tregs, las células CD4 y CD8 producen IFN- γ y se activan, mientras que disminuye la producción de IL-2 por células CD4⁺. C) Cuando al ratón se le transfieren células Tregs los niveles de IFN- γ en el suero disminuyen, en las células CD4 disminuye la producción de IFN- γ y disminuye la activación, mientras que se restaura la producción de IL-2 por células CD4⁺.

infección ip (45). Los resultados obtenidos en la presente tesis apoyan las conclusiones hechas por Benson A., et al, que describen que la disminución de células Tregs es necesaria, pero debe ser parcial y transitoria, lo cual genera protección (202). Si la disminución de células Tregs es exacerbada o se evita, el ratón será susceptible.

En la presente tesis se utilizaron 2 modelos de ratón (ratones B6 infectados por la vía oral y ratones BALB/c infectados por la vía ip) que tienen un mismo resultado, la susceptibilidad. En ambos modelos se encontró una disminución exacerbada de células Tregs, lo que conduce a una respuesta inmune T_H1 descontrolada con altos niveles de $IFN-\gamma$ y a la muerte del hospedero en la fase aguda de la infección. Estos resultados sustentan lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (207,233). La infección oral de ratones BALB/c, que son resistentes a la toxoplasmosis, lleva a una reducción del 50% de las células Tregs. Sin embargo, la depleción de las células Tregs hasta en un 75% con el anticuerpo anti-CD25 PC61, lleva a la muerte de los animales, a pesar de que la cepa BALB/c es resistente (207). Por lo tanto, los niveles de células Tregs correlacionan con la susceptibilidad durante la toxoplasmosis en la fase aguda de la infección: si la reducción de células Tregs es moderada y transitoria, se podrá observar la resistencia característica de la cepa BALB/c durante la infección por la vía oral (207) o de la cepa B6 infectada por vía ip (202). Sin embargo, si la reducción se exagera y no se revierte, como en el caso de la infección oral de ratones B6 (206), de la infección oral de ratones BALB/c depletados con el anticuerpo anti-CD25 (207) o como en el caso de la presente tesis, durante la infección ip de ratones BALB/c, existirá susceptibilidad.

Como ya se había mencionado en la Introducción, el $IFN-\gamma$ es la principal citocina implicada en la resistencia a la toxoplasmosis (58), pero su producción exacerbada es la

principal causa de la susceptibilidad (64). En los primeros resultados obtenidos en esta tesis en la cepa de ratón BALB/c, se observó una correlación entre la disminución de las células Tregs con un incremento sistémico exacerbado en los niveles de IFN- γ , lo cual nos hizo pensar que posiblemente el IFN- γ es otro mecanismo implicado en la disminución de las células Tregs. Se demostró que el IFN- γ causa directamente la disminución de células Tregs, ya que en su ausencia o en ausencia de su señalización, el porcentaje y número de células Tregs no disminuye en la sangre e incluso aumenta en el bazo. De manera muy relevante y primordial, se demostró que el IFN- γ no sólo es un mecanismo más, sino que es el mecanismo que orquesta la muerte de las células Tregs, causando la transformación de su fenotipo hacia un fenotipo inflamatorio T_H1 $CD4^+$ $Foxp3^+$ $T-bet^+$ por la inducción de la expresión del receptor de IFN- γ .

Se han descrito múltiples funciones para el IFN- γ en la respuesta inmune. Es el principal activador de macrófagos y de su función efectora como la secreción de intermediarios reactivos de oxígeno y el incremento en las moléculas de la presentación antigénica (158,188). También favorece la atracción de leucocitos, así como su maduración y diferenciación (158,188); está implicado en la función efectora de las células NK (152,188) y también regula el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas producidas por los linfocitos B (159,188). Aunque el IFN- γ es indispensable para la eliminación de varios patógenos por los mecanismos descritos anteriormente (55,56,180,181,183,186,188), también se ha demostrado que el IFN- γ en exceso puede generar consecuencias adversas durante el desarrollo de la respuesta inmune, como la disminución en la proliferación celular y la apoptosis de las células (168,190,191).

En el caso de la infección con *T. gondii*, la producción en exceso del IFN- γ induce apoptosis masiva en el bazo (271), así como necrosis en el intestino y la muerte del hospedero (64,242). En la presente tesis se describe un efecto adverso del IFN- γ , adicional a lo que ya se ha descrito, ya que los altos niveles de IFN- γ favorecen la muerte y la transformación en el fenotipo de las células Tregs hacia un fenotipo pro-inflamatorio T_h1 caracterizado por la expresión del factor de transcripción T-bet. (229). La señalización por STAT-1 es indispensable para la función del IFN- γ vía su receptor (171-173). Los resultados con los ratones STAT-1 KO infectados sugieren que la disminución de células Tregs es dependiente del IFN- γ y de su señalización vía STAT-1. Ya que se ha descrito que las células T de ratones STAT-1^{-/-} son deficientes en la inducción de apoptosis debido a niveles insuficientes de caspasas (184), probablemente el bajo número de células Tregs muertas en estos animales se deba a la ausencia de apoptosis.

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que el IFN- γ es el mecanismo que orquesta la disminución de las células Tregs a través de la muerte celular y de la transformación en el fenotipo, lo que confirma la hipótesis propuesta por Ge Y., et al, que sugirió la existencia de una relación entre los altos niveles de IFN- γ y la disminución de células Tregs durante la toxoplasmosis (203). Nuestros resultados también reproducen lo observado por Oldenhove G., et al, y por Benson A., et al, (202,206) ya que observamos una producción disminuida de IL-2 por las células T-CD4⁺ durante la infección aguda en ratones WT infectados por la vía intraperitoneal. Por lo tanto, la disminución de células Tregs observada en ratones BALB/c WT infectados por la vía ip, es consecuencia de los altos niveles de IFN- γ producidos por células T-CD4⁺ y T-CD8⁺, así como del colapso en la producción de IL-2 por células CD4⁺. Además de la presente tesis, se demostró que existe

un papel importante para el IFN- γ sobre las células Tregs durante la toxoplasmosis, ya que el IFN- γ y la IL-27 son necesarios para que las células Tregs expresen T-bet, STAT-1 y STAT-3 en su forma activa, así como el receptor de quimiocinas CXCR3, lo que favorece su transformación en el fenotipo y su utilidad supresora en un contexto altamente inflamatorio T_H1, característico de esta infección (229).

Como ya se había mencionado anteriormente, los resultados de la presente tesis apoyan las conclusiones hechas por Benson. A. et al (202)., que sugiere que la disminución de células Tregs es necesaria para que exista protección. Sin embargo, estas conclusiones contrastan con un artículo que se publicó recientemente, donde se sugiere que para que exista protección no es necesaria la disminución de las células Tregs (234). Posiblemente estas diferencias se deban a que los autores utilizaron una cepa altamente virulenta de *T. gondii*, mientras que en la presente tesis y en el artículo publicado por Benson. A. et al., se utilizó la cepa ME49, que es avirulenta (202). Por lo tanto, la cepa de *T. gondii* también podría influir en la disminución de las células Tregs.

En este trabajo se demostró que el IFN- γ causa la disminución de las células Tregs de manera directa, lo cual no había sido reportado hasta la fecha (Fig. 29). Sin embargo, un resultado sorprendente en los ratones STAT-1 KO infectados e IFN- γ KO infectados, es el elevado porcentaje y número de células Tregs aun cuando hay baja producción de IL-2 por células CD4⁺. Este resultado fue totalmente inesperado, ya que como ha sido ampliamente demostrado, la IL-2 es indispensable para el mantenimiento de las células Tregs (110,137,249); además Benson A. et al ., y Oldenhove G. et al., demostraron que la disminución de células Tregs es consecuencia de una baja producción de IL-2 por las células CD4⁺ (202,206). Hay diferentes explicaciones a nuestros resultados: 1) que exista

otra citocina (similar a la IL-2) que sea capaz de mantener a las células Tregs; 2) que los bajos niveles de IL-2 sean suficientes para mantener a las células Tregs; y 3) que exista otra población celular, diferente a las células T CD4⁺, capaz de producir IL-2.

Paralelamente al papel que juega la IL-2 en el mantenimiento de los linfocitos, particularmente de las células Tregs (249), se han descrito que la IL7 y la IL-15 también están implicadas en el mantenimiento de los linfocitos T y de la células Tregs (258). La IL-7 se requiere para el desarrollo de las células T en el timo, mientras que en la periferia promueve la supervivencia de las células T naïve y de memoria a través de la sobre-regulación de la molécula anti-apoptótica Bcl-2 (272). La IL-15 induce la proliferación de las células T-CD8⁺ de memoria, incrementando su función efectora (citotoxicidad) (272). La IL-2, la IL-7 y la IL-15, además de unirse a sus receptores, se unen a una cadena común γ de membrana (249,258,259), lo que genera una señal para el desarrollo, proliferación y homeostasis de las células T. De estas tres citocinas, la IL-2 es producida principalmente por linfocitos T-CD4⁺ y de manera secundaria por linfocitos T-CD8⁺, células T-NK y NK (249). Se desconoce si poblaciones de células del sistema inmune producen la IL-7, pero se sabe que es producida por células no linfoides en los órganos linfoides (260,272). El RNA mensajero de la IL-15 es inducido de manera rápida en macrófagos y DC en respuesta a estímulos vía TLRs y a interferones del tipo I (272). La IL-7 juega un papel primordial en el mantenimiento de las células Tregs de memoria en la piel, ya que estas células presentan una expresión incrementada del receptor de la IL-7 y una expresión disminuida del receptor CD25 (258,259). Tanto la IL-7 como la IL-15 inducen la fosforilación de STAT-5 así como la sobre-regulación de Foxp3 en las células Tregs (273), lo cual apoya los resultados obtenidos en el presente trabajo.

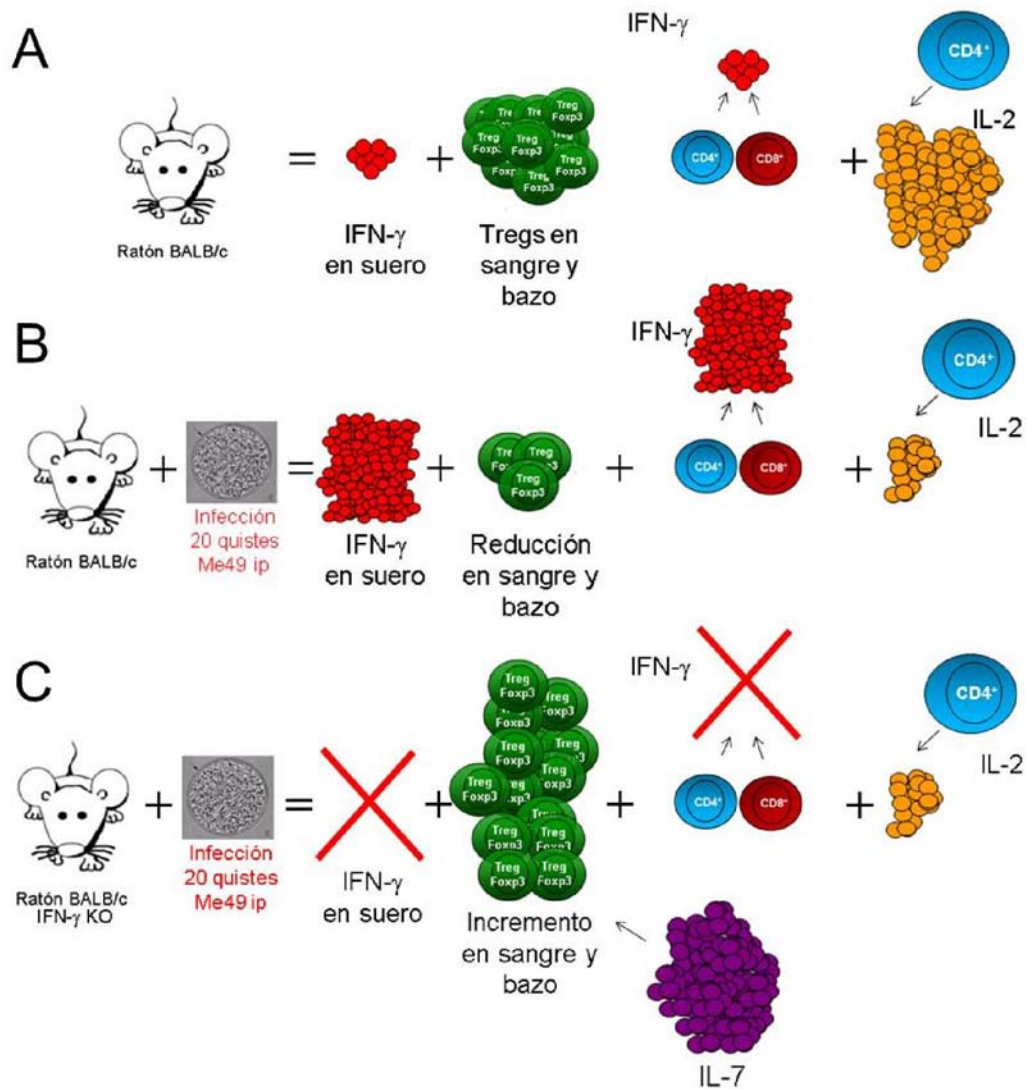


Fig. 29. El IFN- γ y causa la disminución de las células Tregs durante la infección ip con *T. gondii*. A) Descripción gráfica de la respuesta inmune en un ratón BALB/c no infectado, donde hay bajos niveles de IFN- γ en suero, hay cierto porcentaje y número de células Tregs sistémicas y en bazo, así como las células CD4⁺ estimuladas producen IFN- γ e IL-2 y las células CD8 estimuladas producen IFN- γ . B) Cuando el ratón es infectado por la vía ip incrementan los niveles de IFN- γ en el suero, hay disminución en porcentaje y número de las células Tregs, las células CD4 y CD8 producen IFN- γ y disminuye la producción de IL-2 por células CD4⁺. C) Cuando el ratón IFN- γ KO es infectado, no hay producción de IFN- γ en el suero, hay un incremento en porcentaje y número de las células Tregs, las células CD4 y CD8 no producen IFN- γ y sigue reducida la producción de IL-2 por células CD4⁺, de manera interesante en este caso, la IL-7 se encarga del mantenimiento de las células Tregs.

Debido a la poca disponibilidad de reactivos para la detección de la IL-15 y a que se ha propuesto que la IL-7 puede tener un papel en el mantenimiento de los linfocitos T cuando hay disrupción en la señalización de la IL-2 (260), se decidió conocer si la IL-7 es quien mantiene el alto número de células Tregs en los ratones IFN- γ KO infectados, los cuales presentan bajos niveles de la IL-2. Se encontró una clara participación de la IL-7 en el mantenimiento de las células Tregs aún con bajos niveles de IL-2 en los ratones IFN- γ KO infectados. Un resultado que llamó la atención fue que los ratones IFN- γ KO no infectados mostraron una expresión elevada del receptor de IL-7 y esta expresión no se modifica por la infección. Hasta la fecha no se había descrito en la literatura que en las células Tregs de ratones IFN- γ KO existen niveles aumentados del receptor CD127 de manera constitutiva. Se conoce que en las células Tregs de humanos la fosforilación de STAT5 es a través del receptor de la IL-7 o a través del receptor de la IL-2, pero para obtener los mismos niveles de fosforilación de STAT5 se requiere una alta concentración de IL-7 o bajas concentraciones de IL-2 (274). Posiblemente las células Tregs de los ratones IFN- γ KO sean más sensibles a la IL-7 porque expresan constitutivamente el receptor, y ésta es la causa de que no disminuyan durante la infección con *T. gondii*. Además de los resultados obtenidos con el receptor de la IL-7 y con la expresión aumentada del RNA mensajero de la IL-7 en los ratones IFN- γ KO infectados, observamos que cuando se inyectó la IL-7 recombinante en ratones Foxp3^{EGFP} no hubo una disminución drástica de células Tregs, lo cual demuestra que la IL-7 se encarga del mantenimiento de las células Tregs cuando existen bajos niveles de IL-2. Además, probablemente los altos niveles de IFN- γ inhiban directamente la producción de IL-7 durante la infección con *T. gondii*, lo cual evita que la IL-7 intervenga en el mantenimiento de las células Tregs en los ratones WT infectados.

Estos resultados no descartan que la IL-15 pueda formar parte del mantenimiento de las células Tregs en los ratones IFN- γ KO infectados, pero queda como un campo de estudio abierto.

Se demostró que la IL-7 se encarga del mantenimiento de las células Tregs cuando hay bajos niveles de IL-2 en los ratones IFN- γ KO infectados, pero también se propuso que posiblemente los bajos niveles de IL-2 son suficientes para mantener el alto número de células Tregs. Para investigar esta posibilidad necesitaríamos tener ratones dobles KO, para IFN- γ y para IL-2, infectados, lo cual eliminaría absolutamente los niveles de IL-2. La otra posibilidad planteada es que otra población celular diferente a los linfocitos T-CD4⁺ en el bazo, produzca la IL-2 que se requiere para el mantenimiento de las células Tregs. La IL-2 también es producida por células T-CD8⁺, células T-NK, células NK y en menor cantidad por DC o por mastocitos (249). En los experimentos realizados en la presente tesis, evaluamos en el bazo total la producción de IL-2 por células T al estimular el cultivo de células totales de bazo con α -CD3 y tener la co-estimulación de las DC, y se observó que aún en el sobrenadante de células de ratones IFN- γ KO infectados existe una producción disminuida de IL-2, lo cual descarta que otra población de células T (CD4⁺, CD8⁺ o T-NK) en el bazo produzca IL-2. Se requiere estudiar si al estimular DC o mastocitos provenientes de ratones IFN- γ KO infectados existe producción de IL-2 y de existir este fenómeno, conocer si la IL-2 interviene en su desarrollo.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto con respecto a los ratones IFN- γ KO infectados no contradicen ni se contraponen al papel de la IL-2 en el mantenimiento de los linfocitos T. La importancia de la funcionalidad de la IL-2 en el mantenimiento de

múltiples poblaciones celulares ha sido ampliamente descrita (116,249,275-277). Con respecto a las células Tregs, la IL-2 es una citocina requerida para su mantenimiento y función (116,137,249,277), ya que expresan constitutivamente el receptor de alta afinidad de la IL-2 (CD25) (79,81,91,278). La IL-2 participa en la inducción de la expresión de receptores de citocinas y de factores de transcripción como STAT-5, PI3K o MAPK, promoviendo o inhibiendo cascadas de señalización, lo que favorece el desarrollo de la respuesta inmune (279). Posiblemente la producción disminuida de IL-2 observada en los ratones IFN- γ KO infectados favorezca el desarrollo de la respuesta inflamatoria T_h1 y por lo tanto de los niveles elevados de IFN- γ .

Dados los resultados obtenidos en el presente proyecto en las cepas de ratón B6 y BALB/c, se puede concluir que el papel de las células Tregs durante la toxoplasmosis murina es controlar la respuesta inmune que se genera contra el parásito. Sin embargo, debido a los requerimientos de coevolución entre *T. gondii* y el sistema inmune de su hospedero intermediario, se ha requerido que las células Tregs disminuyan, lo que generará una respuesta inmune óptima que controle al parásito en la fase aguda de la infección, que genere inmunidad ante una reinfección y favorezca la persistencia del parásito en su hospedero de manera definitiva.

En los dos modelos utilizados en el presente proyecto, se observó el efecto de la disminución de las células Tregs durante una respuesta inflamatoria exacerbada, caracterizada por los altos niveles de IFN- γ (Fig. 30). En el caso de que la disminución de células Tregs sea exacerbada e irreversible, la conclusión es la muerte del hospedero (Fig. 30B). En el caso de que no exista disminución de células Tregs, el hospedero no genera una respuesta inmune eficiente que pueda combatir al parásito, y como resultado también

observaremos la muerte (Fig. 30C). Para que exista protección y sobrevida, se requiere que en la fase aguda de la toxoplasmosis la disminución de células Tregs sea parcial y transitoria, lo que va a garantizar el desarrollo de una respuesta inmune eficiente que generará el enquistamiento del parásito y su persistencia en el hospedero (Fig. 30D). Se ha requerido de cientos de años de coevolución entre *T. gondii* y el sistema inmunológico del hospedero intermediario, para que exista esta estrecha y compleja relación hospedero-parásito.

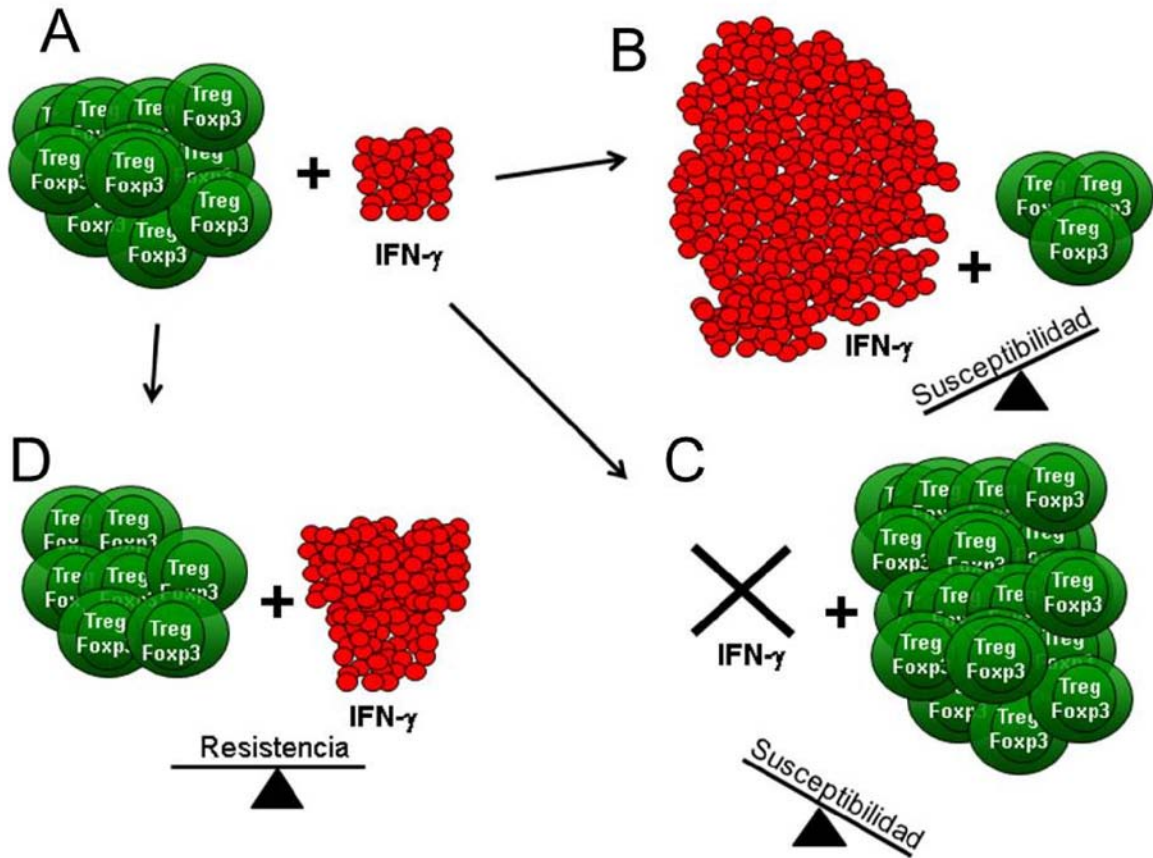


Fig. 30. Relación entre la respuesta inmune y las células Tregs durante la infección con *T. gondii*. A) Estado basal de las células Tregs y la respuesta inmune inflamatoria en un ratón no infectado. B) Cuando el ratón B6 es infectado por vía oral o el BALB/c por vía ip, la respuesta inmune y la disminución de células Tregs se exagera, lo que induce susceptibilidad. C) El control de la respuesta inmune genera susceptibilidad cuando se transfieren células Tregs a un ratón B6 infectado o si se infecta a un ratón BALB/c IFN- γ KO por vía ip. D) Cuando se infecta al ratón BALB/c por vía oral, existe el perfecto balance entre una respuesta inmune eficiente y la disminución de células Tregs que se restablecen parcialmente en la fase crónica de la infección.

Bibliografia

1. Dubey, J. P., D. S. Lindsay, and C. A. Speer. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 267-299.
2. Kohler, S., C. F. Delwiche, P. W. Denny, L. G. Tilney, P. Webster, R. J. Wilson, J. D. Palmer, and D. S. Roos. 1997. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 275: 1485-1489.
3. Wilhelm, C. L., and F. Yarovinsky. 2014. Apicomplexan infections in the gut. *Parasite Immunol.* 36: 409-420.
4. Dubey, J. P., and J. L. Jones. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 38: 1257-1278.
5. Peng, H. J., X. G. Chen, and D. S. Lindsay. 2011. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *J. Parasitol.* 97: 620-628.
6. Innes, E. A. 2010. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses. Public Health* 57: 1-7.
7. Radke, J. R., M. N. Guerini, M. Jerome, and M. W. White. 2003. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 131: 119-127.
8. de, C. S., J. P. Dubey, and W. J. Saville. 2008. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in zoo animals in selected zoos in the midwestern United States. *J. Parasitol.* 94: 648-653.
9. Dubey, J. P. 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J. Parasitol.* 87: 215-219.
10. Dubey, J. P. 2009. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39: 877-882.
11. Elmore, S. A., J. L. Jones, P. A. Conrad, S. Patton, D. S. Lindsay, and J. P. Dubey. 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* 26: 190-196.
12. Dubey, J. P., and J. K. Frenkel. 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 19: 155-177.

13. Dubey, J. P. 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J. Parasitol.* 81: 410-415.
14. Jackson, M. H., and W. M. Hutchison. 1989. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* 28: 55-105.
15. Torrey, E. F., and R. H. Yolken. 2013. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. *Trends Parasitol.* 29: 380-384.
16. Harker, K. S., N. Ueno, and M. B. Lodoen. 2015. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol.* 37: 141-149.
17. White, M. W., J. R. Radke, and J. B. Radke. 2014. *Toxoplasma* development - turn the switch on or off? *Cell Microbiol.* 16: 466-472.
18. Montoya, J. G., and O. Liesenfeld. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-1976.
19. Sukthana, Y. 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends Parasitol.* 22: 137-142.
20. Robert-Gangneux, F., and M. L. Darde. 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 264-296.
21. Tenter, A. M., A. R. Heckeroth, and L. M. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30: 1217-1258.
22. Galvan-Ramirez, M. L., R. Troyo, S. Roman, C. Calvillo-Sanchez, and R. Bernal-Redondo. 2012. A systematic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* infection among the Mexican population. *Parasit. Vectors.* 5: 271.
23. Howe, D. K., and L. D. Sibley. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172: 1561-1566.
24. Ajzenberg, D. 2015. 1995-2015: it is time to celebrate 20 years of (intensive) genotyping of *Toxoplasma gondii* strains. *Future. Microbiol.* 10: 689-691.
25. Shwab, E. K., X. Q. Zhu, D. Majumdar, H. F. Pena, S. M. Gennari, J. P. Dubey, and C. Su. 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141: 453-461.
26. Simon, R., S. M. Tennant, J. E. Galen, and M. M. Levine. 2011. Mouse models to assess the efficacy of non-typhoidal *Salmonella* vaccines: revisiting the role of host innate susceptibility and routes of challenge. *Vaccine* 29: 5094-5106.
27. Houpt, E. R., D. J. Glembocki, T. G. Obrig, C. A. Moskaluk, L. A. Lockhart, R. L. Wright, R. M. Seaner, T. R. Keepers, T. D. Wilkins, and W. A. Petri, Jr. 2002. The

- mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 169: 4496-4503.
28. Reyes, J. L., C. A. Terrazas, L. Vera-Arias, and L. I. Terrazas. 2009. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infect. Genet. Evol.* 9: 1115-1127.
 29. Su, C., E. K. Shwab, P. Zhou, X. Q. Zhu, and J. P. Dubey. 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137: 1-11.
 30. Khan, A., J. P. Dubey, C. Su, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal, and L. D. Sibley. 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int. J. Parasitol.* 41: 645-655.
 31. Pena, H. F., S. M. Gennari, J. P. Dubey, and C. Su. 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38: 561-569.
 32. Dubey, J. P., X. Q. Zhu, N. Sundar, H. Zhang, O. C. Kwok, and C. Su. 2007. Genetic and biologic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates of cats from China. *Vet. Parasitol.* 145: 352-356.
 33. Araujo, F. G., D. M. Williams, F. C. Grumet, and J. S. Remington. 1976. Strain-dependent differences in murine susceptibility to toxoplasma. *Infect. Immun.* 13: 1528-1530.
 34. Williams, D. M., F. C. Grumet, and J. S. Remington. 1978. Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 19: 416-420.
 35. McLeod, R., P. Eisenhauer, D. Mack, C. Brown, G. Filice, and G. Spitalny. 1989. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 142: 3247-3255.
 36. Brown, C. R., and R. McLeod. 1990. Class I MHC genes and CD8⁺ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 145: 3438-3441.
 37. Blanchard, N., F. Gonzalez, M. Schaeffer, N. T. Joncker, T. Cheng, A. J. Shastri, E. A. Robey, and N. Shastri. 2008. Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* 9: 937-944.
 38. Watanabe, H., K. Numata, T. Ito, K. Takagi, and A. Matsukawa. 2004. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 22: 460-466.
 39. Darde, M. L. 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanita* 40: 57-63.

40. Darde, M. L. 2008. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite* 15: 366-371.
41. Suzuki, Y., M. A. Orellana, S. Y. Wong, F. K. Conley, and J. S. Remington. 1993. Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. *Infect. Immun.* 61: 2284-2288.
42. Liesenfeld, O., T. A. Nguyen, C. Pharke, and Y. Suzuki. 2001. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J. Parasitol.* 87: 1491-1493.
43. Roberts, C. W., S. M. Cruickshank, and J. Alexander. 1995. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect. Immun.* 63: 2549-2555.
44. Walker, W., C. W. Roberts, D. J. Ferguson, H. Jebbari, and J. Alexander. 1997. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect. Immun.* 65: 1119-1121.
45. Subauste, C., and J. Remington. 2001. Animal models for *Toxoplasma gondii* infection. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 19: Unit.
46. Neal, L. M., and L. J. Knoll. 2014. *Toxoplasma gondii* profilin promotes recruitment of Ly6Chi CCR2+ inflammatory monocytes that can confer resistance to bacterial infection. *PLoS. Pathog.* 10: e1004203.
47. Aliberti, J., Reis e Sousa, M. Schito, S. Hieny, T. Wells, G. B. Huffnagle, and A. Sher. 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 1: 83-87.
48. Aliberti, J., J. G. Valenzuela, V. B. Carruthers, S. Hieny, J. Andersen, H. Charest, Reis e Sousa, A. Fairlamb, J. M. Ribeiro, and A. Sher. 2003. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 4: 485-490.
49. Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308: 1626-1629.
50. Yarovinsky, F., and A. Sher. 2006. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 36: 255-259.
51. Denkers, E. Y. 2010. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 737125.

52. Scanga, C. A., J. Aliberti, D. Jankovic, F. Tilloy, S. Bennouna, E. Y. Denkers, R. Medzhitov, and A. Sher. 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168: 5997-6001.
53. Liu, C. H., Y. T. Fan, A. Dias, L. Esper, R. A. Corn, A. Bafica, F. S. Machado, and J. Aliberti. 2006. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 177: 31-35.
54. Hunter, C. A., C. S. Subauste, V. H. Van Cleave, and J. S. Remington. 1994. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 62: 2818-2824.
55. Gazzinelli, R. T., F. T. Hakim, S. Hieny, G. M. Shearer, and A. Sher. 1991. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 146: 286-292.
56. Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hayashi, E. Y. Denkers, S. Hieny, P. Caspar, G. Trinchieri, and A. Sher. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 153: 2533-2543.
57. Aliberti, J. 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 162-170.
58. Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber, and J. S. Remington. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516-518.
59. Scharton-Kersten, T. M., T. A. Wynn, E. Y. Denkers, S. Bala, E. Grunvald, S. Hieny, R. T. Gazzinelli, and A. Sher. 1996. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J. Immunol.* 157: 4045-4054.
60. Lieberman, L. A., M. Banica, S. L. Reiner, and C. A. Hunter. 2004. STAT1 plays a critical role in the regulation of antimicrobial effector mechanisms, but not in the development of Th1-type responses during toxoplasmosis. *J. Immunol.* 172: 457-463.
61. Black, C. M., J. R. Catterall, and J. S. Remington. 1987. In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J. Immunol.* 138: 491-495.
62. Murray, H. W., B. Y. Rubin, S. M. Carriero, A. M. Harris, and E. A. Jaffee. 1985. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs

- oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 134: 1982-1988.
63. Sibley, L. D., L. B. Adams, Y. Fukutomi, and J. L. Krahenbuhl. 1991. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. *J. Immunol.* 147: 2340-2345.
 64. Liesenfeld, O., J. Kosek, J. S. Remington, and Y. Suzuki. 1996. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 184: 597-607.
 65. Suzuki, Y., A. Sher, G. Yap, D. Park, L. E. Neyer, O. Liesenfeld, M. Fort, H. Kang, and E. Gufwoli. 2000. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 164: 5375-5382.
 66. Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hieny, T. Schariton-Kersten, A. Cheever, R. Kuhn, W. Muller, G. Trinchieri, and A. Sher. 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.* 157: 798-805.
 67. Neyer, L. E., G. Grunig, M. Fort, J. S. Remington, D. Rennick, and C. A. Hunter. 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 65: 1675-1682.
 68. Buzoni-Gatel, D., H. Debbabi, F. J. Mennechet, V. Martin, A. C. Lepage, J. D. Schwartzman, and L. H. Kasper. 2001. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120: 914-924.
 69. Hunter, C. A., A. Villarino, D. Artis, and P. Scott. 2004. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol. Rev.* 202: 106-114.
 70. Aliberti, J., S. Hieny, Reis e Sousa, C. N. Serhan, and A. Sher. 2002. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat. Immunol.* 3: 76-82.
 71. Kang, H., J. S. Remington, and Y. Suzuki. 2000. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 164: 2629-2634.

72. Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166: 753-755.
73. Kojima, A., and R. T. Prehn. 1981. Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. *Immunogenetics* 14: 15-27.
74. Penhale, W. J., A. Farmer, R. P. McKenna, and W. J. Irvine. 1973. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin. Exp. Immunol.* 15: 225-236.
75. Germain, R. N. 2008. Special regulatory T-cell review: A rose by any other name: from suppressor T cells to Tregs, approbation to unbridled enthusiasm. *Immunology* 123: 20-27.
76. Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara. 2007. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1: S116-S123.
77. Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi, and T. Masuda. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 161: 72-87.
78. Powrie, F., and D. Mason. 1990. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J. Exp. Med.* 172: 1701-1708.
79. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 2011. Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 195. *J. Immunol.* 186: 3808-3821.
80. Sakaguchi, S., D. A. Vignali, A. Y. Rudensky, R. E. Niec, and H. Waldmann. 2013. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 461-467.
81. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-787.
82. Ohkura, N., Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi. 2013. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*. 38: 414-423.
83. Corthay, A. 2009. How do regulatory T cells work? *Scand. J. Immunol.* 70: 326-336.
84. Becker, C., S. Stoll, T. Bopp, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2006. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med. Microbiol. Immunol.* 195: 113-124.

85. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4: 330-336.
86. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.
87. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepers, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27: 68-73.
88. Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Prohl, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27: 18-20.
89. Ziegler, S. F. 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 209-226.
90. Chatila, T. A. 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 949-959.
91. Miyara, M., and S. Sakaguchi. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* 13: 108-116.
92. Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink, and A. H. Enk. 2001. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 22: 394-400.
93. Adorini, L., N. Giarratana, and G. Penna. 2004. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin. Immunol.* 16: 127-134.
94. Levings, M. K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini, and M. G. Roncarolo. 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105: 1162-1169.
95. Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi. 2008. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105: 10113-10118.
96. Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198: 235-247.
97. Mahnke, K., E. Schmitt, L. Bonifaz, A. H. Enk, and H. Jonuleit. 2002. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 80: 477-483.

98. Maldonado, R. A., and U. H. von Andrian. 2010. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.* 108: 111-165.
99. Apostolou, I., and B. H. von. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* 199: 1401-1408.
100. Povoleri, G. A., C. Scotta, E. A. Nova-Lamperti, S. John, G. Lombardi, and B. Afzali. 2013. Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators? *Front Immunol.* 4: 169.
101. Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and B. H. von. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 6: 1219-1227.
102. Barrat, F. J., D. J. Cua, A. Boonstra, D. F. Richards, C. Crain, H. F. Savelkoul, R. de Waal-Malefyt, R. L. Coffman, C. M. Hawrylowicz, and A. O'Garra. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.* 195: 603-616.
103. Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz, and G. Schuler. 2002. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J. Exp. Med.* 196: 247-253.
104. Kemper, C., A. C. Chan, J. M. Green, K. A. Brett, K. M. Murphy, and J. P. Atkinson. 2003. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 421: 388-392.
105. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* 182: 68-79.
106. Weiner, H. L. 2001. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes. Infect.* 3: 947-954.
107. Peterson, R. A. 2012. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol. Pathol.* 40: 186-204.
108. Piccirillo, C. A., and E. M. Shevach. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 167: 1137-1140.
109. Shevach, E. M., R. S. McHugh, C. A. Piccirillo, and A. M. Thornton. 2001. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol. Rev.* 182: 58-67.
110. Salinas, N., J. E. Olguin, C. Castellanos, and R. Saavedra. 2014. T cell suppression in vitro during *Toxoplasma gondii* infection is the result of IL-2 competition between Tregs and T cells leading to death of proliferating T cells. *Scand. J. Immunol.* 79: 1-11.

111. Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 30: 636-645.
112. Lim, H. W., P. Hillsamer, A. H. Banham, and C. H. Kim. 2005. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 175: 4180-4183.
113. Ghiringhelli, F., C. Menard, M. Terme, C. Flament, J. Taieb, N. Chaput, P. E. Puig, S. Novault, B. Escudier, E. Vivier, A. Lecesne, C. Robert, J. Y. Blay, J. Bernard, S. Caillat-Zucman, A. Freitas, T. Tursz, O. Wagner-Ballon, C. Capron, W. Vainchenker, F. Martin, and L. Zitvogel. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* 202: 1075-1085.
114. Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri. 2004. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol.* 172: 4676-4680.
115. Hagness, M., K. Henjum, J. Landskron, K. W. Brudvik, B. A. Bjornbeth, A. Foss, K. Tasken, and E. M. Aandahl. 2012. Kinetics and activation requirements of contact-dependent immune suppression by human regulatory T cells. *J. Immunol.* 188: 5459-5466.
116. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188: 287-296.
117. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 762-774.
118. Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B. C. McGrath, D. R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M. L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* 176: 6752-6761.
119. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 523-532.
120. Schneider, H., E. Valk, D. S. da Rocha, B. Wei, and C. E. Rudd. 2005. CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102: 12861-12866.
121. Tang, Q., E. K. Boden, K. J. Henriksen, H. Bour-Jordan, M. Bi, and J. A. Bluestone. 2004. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34: 2996-3005.

122. Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4: 1206-1212.
123. Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake, and D. A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 21: 503-513.
124. Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 190: 995-1004.
125. Saraiva, M., and A. O'Garra. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 170-181.
126. Kingsley, C. I., M. Karim, A. R. Bushell, and K. J. Wood. 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J. Immunol.* 168: 1080-1086.
127. Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J. Immunol.* 172: 834-842.
128. Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E. M. Shevach. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J. Exp. Med.* 196: 237-246.
129. Aoki, C. A., A. T. Borchers, M. Li, R. A. Flavell, C. L. Bowlus, A. A. Ansari, and M. E. Gershwin. 2005. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 4: 450-459.
130. Huber, S., C. Schramm, H. A. Lehr, A. Mann, S. Schmitt, C. Becker, M. Protschka, P. R. Galle, M. F. Neurath, and M. Blessing. 2004. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol.* 173: 6526-6531.
131. Yaswen, L., A. B. Kulkarni, T. Fredrickson, B. Mittleman, R. Schiffman, S. Payne, G. Longenecker, E. Mozes, and S. Karlsson. 1996. Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood* 87: 1439-1445.
132. Collison, L. W., M. R. Pillai, V. Chaturvedi, and D. A. Vignali. 2009. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J. Immunol.* 182: 6121-6128.

133. Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, and D. A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450: 566-569.
134. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34: 2480-2488.
135. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6: 1142-1151.
136. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201: 723-735.
137. Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 8: 1353-1362.
138. Hofer, T., O. Krichevsky, and G. Altan-Bonnet. 2012. Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Front Immunol.* 3: 268.
139. Wang, G., M. Khattar, Z. Guo, Y. Miyahara, S. P. Linkes, Z. Sun, X. He, S. M. Stepkowski, and W. Chen. 2010. IL-2-deprivation and TGF-beta are two non-redundant suppressor mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cell which jointly restrain CD4+. *Immunol. Lett.* 132: 61-68.
140. Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204: 1257-1265.
141. Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, M. D. Di, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110: 1225-1232.
142. Kobie, J. J., P. R. Shah, L. Yang, J. A. Rebhahn, D. J. Fowell, and T. R. Mosmann. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol.* 177: 6780-6786.

143. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 21: 589-601.
144. Zhao, D. M., A. M. Thornton, R. J. DiPaolo, and E. M. Shevach. 2006. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107: 3925-3932.
145. Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, and T. J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 27: 635-646.
146. Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 147: 258-267.
147. Kotenko, S. V., G. Gallagher, V. V. Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N. K. Shah, J. A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets, and R. P. Donnelly. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4: 69-77.
148. Bach, E. A., M. Aguet, and R. D. Schreiber. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 563-591.
149. Young, H. A. 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 16: 563-568.
150. Ank, N., H. West, C. Bartholdy, K. Eriksson, A. R. Thomsen, and S. R. Paludan. 2006. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J. Virol.* 80: 4501-4509.
151. Farrar, M. A., and R. D. Schreiber. 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 571-611.
152. Carnaud, C., D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka, and A. Bendelac. 1999. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* 163: 4647-4650.
153. Frucht, D. M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J. J. O'Shea, and S. Koyasu. 2001. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22: 556-560.
154. Gessani, S., and F. Belardelli. 1998. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9: 117-123.
155. Harris, D. P., L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, S. L. Swain, and F. E. Lund. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* 1: 475-482.

156. Perussia, B., E. T. Dayton, V. Fanning, P. Thiagarajan, J. Hoxie, and G. Trinchieri. 1983. Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J. Exp. Med.* 158: 2058-2080.
157. Young, H. A., and K. J. Hardy. 1995. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.* 58: 373-381.
158. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 749-795.
159. Finkelman, F. D., I. M. Katona, T. R. Mosmann, and R. L. Coffman. 1988. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol.* 140: 1022-1027.
160. Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 301-331.
161. Salazar-Mather, T. P., T. A. Hamilton, and C. A. Biron. 2000. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J. Clin. Invest* 105: 985-993.
162. Fukao, T., S. Matsuda, and S. Koyasu. 2000. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J. Immunol.* 164: 64-71.
163. Otani, T., S. Nakamura, M. Toki, R. Motoda, M. Kurimoto, and K. Orita. 1999. Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice. *Cell Immunol.* 198: 111-119.
164. Fukao, T., D. M. Frucht, G. Yap, M. Gadina, J. J. O'Shea, and S. Koyasu. 2001. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 166: 4446-4455.
165. Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, and M. O'Keeffe. 2001. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 166: 5448-5455.
166. Bazan, J. F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 6934-6938.
167. Thoreau, E., B. Petridou, P. A. Kelly, J. Djiane, and J. P. Mornon. 1991. Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis. *FEBS Lett.* 282: 26-31.
168. Bernabei, P., E. M. Coccia, L. Rigamonti, M. Bosticardo, G. Forni, S. Pestka, C. D. Krause, A. Battistini, and F. Novelli. 2001. Interferon-gamma receptor 2 expression

- as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J. Leukoc. Biol.* 70: 950-960.
169. Kaplan, D. H., A. C. Greenlund, J. W. Tanner, A. S. Shaw, and R. D. Schreiber. 1996. Identification of an interferon-gamma receptor alpha chain sequence required for JAK-1 binding. *J. Biol. Chem.* 271: 9-12.
 170. Greenlund, A. C., M. A. Farrar, B. L. Viviano, and R. D. Schreiber. 1994. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* 13: 1591-1600.
 171. Kovarik, P., D. Stoiber, P. A. Eyers, R. Menghini, A. Neining, M. Gaestel, P. Cohen, and T. Decker. 1999. Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 13956-13961.
 172. Kovarik, P., D. Stoiber, M. Novy, and T. Decker. 1998. Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation. *EMBO J.* 17: 3660-3668.
 173. Gollob, J. A., C. P. Schnipper, E. A. Murphy, J. Ritz, and D. A. Frank. 1999. The functional synergy between IL-12 and IL-2 involves p38 mitogen-activated protein kinase and is associated with the augmentation of STAT serine phosphorylation. *J. Immunol.* 162: 4472-4481.
 174. Singh, K., J. L. Balligand, T. A. Fischer, T. W. Smith, and R. A. Kelly. 1996. Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and STAT1 alpha. *J. Biol. Chem.* 271: 1111-1117.
 175. Chan, E. D., and D. W. Riches. 2001. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280: C441-C450.
 176. Taniguchi, T., K. Ogasawara, A. Takaoka, and N. Tanaka. 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 623-655.
 177. Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 227-264.
 178. Alexander, W. S., R. Starr, J. E. Fenner, C. L. Scott, E. Handman, N. S. Sprigg, J. E. Corbin, A. L. Cornish, R. Darwiche, C. M. Owczarek, T. W. Kay, N. A. Nicola, P. J. Hertzog, D. Metcalf, and D. J. Hilton. 1999. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 98: 597-608.

179. Marine, J. C., D. J. Topham, C. McKay, D. Wang, E. Parganas, D. Stravopodis, A. Yoshimura, and J. N. Ihle. 1999. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 98: 609-616.
180. Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259: 1742-1745.
181. van den Broek, M. F., U. Muller, S. Huang, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1995. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol. Rev.* 148: 5-18.
182. Buchmeier, N. A., and R. D. Schreiber. 1985. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82: 7404-7408.
183. Kamijo, R., J. Le, D. Shapiro, E. A. Havell, S. Huang, M. Aguet, M. Bosland, and J. Vilcek. 1993. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guerin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 178: 1435-1440.
184. Lee, C. K., E. Smith, R. Gimeno, R. Gertner, and D. E. Levy. 2000. STAT1 affects lymphocyte survival and proliferation partially independent of its role downstream of IFN-gamma. *J. Immunol.* 164: 1286-1292.
185. Jouanguy, E., S. Lamhamedi-Cherradi, D. Lammass, S. E. Dorman, M. C. Fondaneche, S. Dupuis, R. Doffinger, F. Altare, J. Girdlestone, J. F. Emile, H. Ducoulombier, D. Edgar, J. Clarke, V. A. Oxelius, M. Brai, V. Novelli, K. Heyne, A. Fischer, S. M. Holland, D. S. Kumararatne, R. D. Schreiber, and J. L. Casanova. 1999. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat. Genet.* 21: 370-378.
186. Jouanguy, E., F. Altare, S. Lamhamedi-Cherradi, and J. L. Casanova. 1997. Infections in IFNGR-1-deficient children. *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 583-587.
187. Lio, D., L. Scola, A. Crivello, M. Bonafe, C. Franceschi, F. Olivieri, G. Colonna-Romano, G. Candore, and C. Caruso. 2002. Allele frequencies of +874T-->A single nucleotide polymorphism at the first intron of interferon-gamma gene in a group of Italian centenarians. *Exp. Gerontol.* 37: 315-319.
188. Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75: 163-189.
189. Xaus, J., M. Comalada, A. F. Valledor, M. Cardo, C. Herrero, C. Soler, J. Lloberas, and A. Celada. 2001. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology* 204: 543-550.

190. Novelli, F., P. Bernabei, L. Ozmen, L. Rigamonti, A. Allione, S. Pestka, G. Garotta, and G. Forni. 1996. Switching on of the proliferation or apoptosis of activated human T lymphocytes by IFN-gamma is correlated with the differential expression of the alpha- and beta-chains of its receptor. *J. Immunol.* 157: 1935-1943.
191. Bernabei, P., A. Allione, L. Rigamonti, M. Bosticardo, G. Losana, I. Borghi, G. Forni, and F. Novelli. 2001. Regulation of interferon-gamma receptor (INF-gammaR) chains: a peculiar way to rule the life and death of human lymphocytes. *Eur. Cytokine Netw.* 12: 6-14.
192. Chin, Y. E., M. Kitagawa, K. Kuida, R. A. Flavell, and X. Y. Fu. 1997. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 17: 5328-5337.
193. Xu, X., X. Y. Fu, J. Plate, and A. S. Chong. 1998. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res.* 58: 2832-2837.
194. Tsujimoto, M., Y. K. Yip, and J. Vilcek. 1986. Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 136: 2441-2444.
195. Baecher-Allan, C., and D. E. Anderson. 2006. Regulatory cells and human cancer. *Semin. Cancer Biol.* 16: 98-105.
196. Battaglia, M., and M. G. Roncarolo. 2006. Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 5: 157-165.
197. Zenclussen, A. C. 2006. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin. Immunopathol.* 28: 31-39.
198. Mills, K. H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.* 4: 841-855.
199. Finlay, C. M., K. P. Walsh, and K. H. Mills. 2014. Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunol. Rev.* 259: 206-230.
200. Sanchez, A. M., and Y. Yang. 2011. The role of natural regulatory T cells in infection. *Immunol. Res.* 49: 124-134.
201. Belkaid, Y., and K. Tarbell. 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). *Annu. Rev. Immunol.* 27: 551-589.
202. Benson, A., S. Murray, P. Divakar, N. Burnaevskiy, R. Pifer, J. Forman, and F. Yarovsky. 2012. Microbial infection-induced expansion of effector T cells overcomes the suppressive effects of regulatory T cells via an IL-2 deprivation mechanism. *J. Immunol.* 188: 800-810.

203. Ge, Y. Y., L. Zhang, G. Zhang, J. P. Wu, M. J. Tan, E. Hu, Y. J. Liang, and Y. Wang. 2008. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+CD25+ -regulatory T cells. *Parasite Immunol.* 30: 471-481.
204. Jankovic, D., M. C. Kullberg, C. G. Feng, R. S. Goldszmid, C. M. Collazo, M. Wilson, T. A. Wynn, M. Kamanaka, R. A. Flavell, and A. Sher. 2007. Conventional T-bet(+)*Foxp3*(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.* 204: 273-283.
205. Liu, Y., M. Zhao, X. Xu, X. Liu, H. Zhang, Y. Jiang, L. Zhang, and X. Hu. 2014. Adoptive transfer of Treg cells counters adverse effects of *Toxoplasma gondii* infection on pregnancy. *J. Infect. Dis.* 210: 1435-1443.
206. Oldenhove, G., N. Bouladoux, E. A. Wohlfert, J. A. Hall, D. Chou, S. L. Dos, S. O'Brien, R. Blank, E. Lamb, S. Natarajan, R. Kastenmayer, C. Hunter, M. E. Grigg, and Y. Belkaid. 2009. Decrease of *Foxp3*+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity.* 31: 772-786.
207. Tenorio, E. P., J. E. Olguin, J. Fernandez, P. Vieyra, and R. Saavedra. 2010. Reduction of *Foxp3*+ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 786078.
208. Peters, N., and D. Sacks. 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 213: 159-179.
209. Belkaid, Y., K. F. Hoffmann, S. Mendez, S. Kamhawi, M. C. Udey, T. A. Wynn, and D. L. Sacks. 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J. Exp. Med.* 194: 1497-1506.
210. Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach, and D. L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420: 502-507.
211. Belkaid, Y., R. B. Blank, and I. Suffia. 2006. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol. Rev.* 212: 287-300.
212. Hesse, M., C. A. Piccirillo, Y. Belkaid, J. Prufer, M. Mentink-Kane, M. Leusink, A. W. Cheever, E. M. Shevach, and T. A. Wynn. 2004. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172: 3157-3166.
213. McKee, A. S., and E. J. Pearce. 2004. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J. Immunol.* 173: 1224-1231.

214. Singh, K. P., H. C. Gerard, A. P. Hudson, T. R. Reddy, and D. L. Boros. 2005. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology* 114: 410-417.
215. Wei, G., and H. Tabel. 2008. Regulatory T cells prevent control of experimental African trypanosomiasis. *J. Immunol.* 180: 2514-2521.
216. Finney, C. A., M. D. Taylor, M. S. Wilson, and R. M. Maizels. 2007. Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur. J. Immunol.* 37: 1874-1886.
217. Setiawan, T., A. Metwali, A. M. Blum, M. N. Ince, J. F. Urban, Jr., D. E. Elliott, and J. V. Weinstock. 2007. *Heligmosomoides polygyrus* promotes regulatory T-cell cytokine production in the murine normal distal intestine. *Infect. Immun.* 75: 4655-4663.
218. Taylor, M. D., L. LeGoff, A. Harris, E. Malone, J. E. Allen, and R. M. Maizels. 2005. Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J. Immunol.* 174: 4924-4933.
219. Taylor, M. D., A. Harris, S. A. Babayan, O. Bain, A. Culshaw, J. E. Allen, and R. M. Maizels. 2007. CTLA-4 and CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo. *J. Immunol.* 179: 4626-4634.
220. Hubner, M. P., J. T. Stocker, and E. Mitre. 2009. Inhibition of type 1 diabetes in filaria-infected non-obese diabetic mice is associated with a T helper type 2 shift and induction of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunology* 127: 512-522.
221. Long, T. T., S. Nakazawa, S. Onizuka, M. C. Huaman, and H. Kanbara. 2003. Influence of CD4+CD25+ T cells on *Plasmodium berghei* NK65 infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 33: 175-183.
222. Hisaeda, H., Y. Maekawa, D. Iwakawa, H. Okada, K. Himeno, K. Kishihara, S. Tsukumo, and K. Yasutomo. 2004. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat. Med.* 10: 29-30.
223. Shafiani, S., G. Tucker-Heard, A. Kariyone, K. Takatsu, and K. B. Urdahl. 2010. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J. Exp. Med.* 207: 1409-1420.
224. Kotner, J., and R. Tarleton. 2007. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun.* 75: 861-869.
225. Mariano, F. S., F. R. Gutierrez, W. R. Pavanelli, C. M. Milanezi, K. A. Cavassani, A. P. Moreira, B. R. Ferreira, F. Q. Cunha, C. R. Cardoso, and J. S. Silva. 2008. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes. Infect.* 10: 825-833.

226. Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis, and A. G. Betz. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 5: 266-271.
227. Darrasse-Jeze, G., D. Klatzmann, F. Charlotte, B. L. Salomon, and J. L. Cohen. 2006. CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol. Lett.* 102: 106-109.
228. Tenorio, E. P., J. Fernandez, C. Castellanos, J. E. Olguin, and R. Saavedra. 2011. CD4+ Foxp3+ regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. *Eur. J. Immunol.* 41: 3529-3541.
229. Hall, A. O., D. P. Beiting, C. Tato, B. John, G. Oldenhove, C. G. Lombana, G. H. Pritchard, J. S. Silver, N. Bouladoux, J. S. Stumhofer, T. H. Harris, J. Grainger, E. D. Wojno, S. Wagage, D. S. Roos, P. Scott, L. A. Turka, S. Cherry, S. L. Reiner, D. Cua, Y. Belkaid, M. M. Elloso, and C. A. Hunter. 2012. The cytokines interleukin 27 and interferon-gamma promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology. *Immunity.* 37: 511-523.
230. Francois, V., H. Shehade, V. Acolty, N. Preyat, P. Delree, M. Moser, and G. Oldenhove. 2015. Intestinal immunopathology is associated with decreased CD73-generated adenosine during lethal infection. *Mucosal. Immunol.* 8: 773-784.
231. Akbar, H., S. Germon, P. Berthon, I. Dimier-Poisson, and N. Moire. 2012. Depletion of CD25(+) cells during acute toxoplasmosis does not significantly increase mortality in Swiss OF1 mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107: 155-162.
232. Morampudi, V., C. S. De, M. A. Le, S. Detienne, M. Y. Braun, and S. D'Souza. 2011. Partial depletion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase *Toxoplasma gondii* infection in resistant BALB/c mice. *Microbes. Infect.* 13: 394-404.
233. Tenorio, E. P., J. Fernandez, J. E. Olguin, and R. Saavedra. 2011. Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly Tregs in BALB/c mice, but activated cells in C57BL/6J mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62: 362-367.
234. Akbar, H., I. Dimier-Poisson, and N. Moire. 2015. Role of CD4+ Foxp3+ Regulatory T Cells in Protection Induced by a Live Attenuated, Replicating Type I Vaccine Strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 83: 3601-3611.
235. Renshaw, M., J. Rockwell, C. Engleman, A. Gewirtz, J. Katz, and S. Sambhara. 2002. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J. Immunol.* 169: 4697-4701.
236. Ulett, G. C., N. Ketheesan, and R. G. Hirst. 2000. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 68: 2034-2042.

237. Cho, Y. C., G. Yoon, K. Y. Lee, H. J. Choi, and B. Y. Kang. 2007. Inhibition of interleukin-2 production by myricetin in mouse EL-4 T cells. *Arch. Pharm. Res.* 30: 1075-1079.
238. Watanabe, M., Y. Ueno, T. Yajima, S. Okamoto, T. Hayashi, M. Yamazaki, Y. Iwao, H. Ishii, S. Habu, M. Uehira, H. Nishimoto, H. Ishikawa, J. Hata, and T. Hibi. 1998. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J. Exp. Med.* 187: 389-402.
239. Sun, Y., Y. Li, D. Luo, and D. J. Liao. 2012. Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. *PLoS. One.* 7: e41659.
240. Homan, W. L., M. Vercammen, B. J. De, and H. Verschueren. 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30: 69-75.
241. Liesenfeld, O., H. Kang, D. Park, T. A. Nguyen, C. V. Parkhe, H. Watanabe, T. Abo, A. Sher, J. S. Remington, and Y. Suzuki. 1999. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 21: 365-376.
242. Liesenfeld, O. 2002. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect. Dis.* 185 Suppl 1: S96-101.
243. Couper, K. N., P. A. Lanthier, G. Perona-Wright, L. W. Kummer, W. Chen, S. T. Smiley, M. Mohrs, and L. L. Johnson. 2009. Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 182: 3985-3994.
244. Pina-Vazquez, C., R. Saavedra, and P. Herion. 2008. A quantitative competitive PCR method to determine the parasite load in the brain of *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Parasitol. Int.* 57: 347-353.
245. Sanchez, Y., J. D. Rosado, L. Vega, G. Elizondo, E. Estrada-Muniz, R. Saavedra, I. Juarez, and M. Rodriguez-Sosa. 2010. The unexpected role for the aryl hydrocarbon receptor on susceptibility to experimental toxoplasmosis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 505694.
246. Kang, H., J. S. Remington, and Y. Suzuki. 2000. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 164: 2629-2634.
247. Johnson, A. M. 1984. Strain-dependent, route of challenge-dependent, murine susceptibility to toxoplasmosis. *Z. Parasitenkd.* 70: 303-309.

248. Marzio, R., J. Mael, and S. Betz-Corradin. 1999. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 21: 565-582.
249. Boyman, O., and J. Sprent. 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 180-190.
250. Grailer, J. J., M. Koder, and D. A. Steeber. 2009. L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *J. Dermatol. Sci.* 56: 141-147.
251. Nicholson, I. C. 2002. CD62L (L-selectin). *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 16: 144-146.
252. Ivetic, A. 2013. Signals regulating L-selectin-dependent leucocyte adhesion and transmigration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45: 550-555.
253. Akira, S. 1999. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17: 138-146.
254. Stephanou, A., and D. S. Latchman. 2005. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 23: 177-182.
255. Kulkarni, M. M., S. Varikuti, C. Terrazas, J. L. Kimble, A. R. Satoskar, and B. S. McGwire. 2015. Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) plays a critical role in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* 145: 225-231.
256. Liston, A., and C. A. Piccirillo. 2013. Developmental plasticity of murine and human Foxp3(+) regulatory T cells. *Adv. Immunol.* 119: 85-106.
257. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 657-679.
258. Gratz, I. K., and D. J. Campbell. 2014. Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance. *Front Immunol.* 5: 333.
259. Gratz, I. K., H. A. Truong, S. H. Yang, M. M. Maurano, K. Lee, A. K. Abbas, and M. D. Rosenblum. 2013. Cutting Edge: memory regulatory t cells require IL-7 and not IL-2 for their maintenance in peripheral tissues. *J. Immunol.* 190: 4483-4487.
260. Bayer, A. L., J. Y. Lee, A. de la Barrera, C. D. Surh, and T. R. Malek. 2008. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 181: 225-234.
261. Simonetta, F., A. Chiali, C. Cordier, A. Urrutia, I. Girault, S. Bloquet, C. Tanchot, and C. Bourgeois. 2010. Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 40: 2528-2538.
262. Kandulski, A., T. Wex, D. Kuester, U. Peitz, I. Gebert, A. Roessner, and P. Malfertheiner. 2008. Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25high,

- FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher *H. pylori* colonization and increased gene expression of TGF- β . *Helicobacter*. 13: 295-303.
263. Lundgren, A., E. Suri-Payer, K. Enarsson, A. M. Svennerholm, and B. S. Lundin. 2003. Helicobacter pylori-specific CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect. Immun.* 71: 1755-1762.
264. Raghavan, S., E. Suri-Payer, and J. Holmgren. 2004. Antigen-specific in vitro suppression of murine Helicobacter pylori-reactive immunopathological T cells by CD4CD25 regulatory T cells. *Scand. J. Immunol.* 60: 82-88.
265. Netea, M. G., R. Suttmuller, C. Hermann, C. A. Van der Graaf, J. W. Van der Meer, J. H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, and B. J. Kullberg. 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172: 3712-3718.
266. Kursar, M., M. Koch, H. W. Mittrucker, G. Nouailles, K. Bonhagen, T. Kamradt, and S. H. Kaufmann. 2007. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 178: 2661-2665.
267. Scott-Browne, J. P., S. Shafiani, G. Tucker-Heard, K. Ishida-Tsubota, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, M. J. Bevan, and K. B. Urdahl. 2007. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J. Exp. Med.* 204: 2159-2169.
268. Kursar, M., K. Bonhagen, J. Fensterle, A. Kohler, R. Hurwitz, T. Kamradt, S. H. Kaufmann, and H. W. Mittrucker. 2002. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells restrict memory CD8⁺ T cell responses. *J. Exp. Med.* 196: 1585-1592.
269. Zhang, N., and M. J. Bevan. 2011. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 35: 161-168.
270. Bereswill, S., M. Munoz, A. Fischer, R. Plickert, L. M. Haag, B. Otto, A. A. Kuhl, C. Loddenkemper, U. B. Gobel, and M. M. Heimesaat. 2010. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS. One.* 5: e15099.
271. Gavrilescu, L. C., and E. Y. Denkers. 2001. IFN- γ overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 167: 902-909.
272. Kim, H. R., K. A. Hwang, S. H. Park, and I. Kang. 2008. IL-7 and IL-15: biology and roles in T-Cell immunity in health and disease. *Crit Rev. Immunol.* 28: 325-339.
273. Wuest, T. Y., J. Willette-Brown, S. K. Durum, and A. A. Hurwitz. 2008. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 84: 973-980.

274. Dupont, G., J. Demaret, F. Venet, F. Malergue, C. Malcus, F. Poitevin-Later, J. Morel, and G. Monneret. 2014. Comparative dose-responses of recombinant human IL-2 and IL-7 on STAT5 phosphorylation in CD4⁺F. *Cytokine* 69: 146-149.
275. Ganusov, V. V., D. Milutinovic, and R. J. De Boer. 2007. IL-2 regulates expansion of CD4⁺ T cell populations by affecting cell death: insights from modeling CFSE data. *J. Immunol.* 179: 950-957.
276. Nelson, B. H. 2002. Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. *Curr. Dir. Autoimmun.* 5: 92-112.
277. Smigiel, K. S., S. Srivastava, J. M. Stolley, and D. J. Campbell. 2014. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunol. Rev.* 259: 40-59.
278. Turka, L. A., and P. T. Walsh. 2008. IL-2 signaling and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Front Biosci.* 13: 1440-1446.
279. Liao, W., J. X. Lin, and W. J. Leonard. 2011. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 23: 598-604.