

Análisis de la población de células T reguladoras Foxp3 en el modelo murino de amibiasis intestinal

Cruz B. C. ¹ Sarrazola S. M. ² Laclette S. JP.

1. Universidad de Pamplona, Facultad de ciencias de la salud, departamento de Medicina.

2. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, departamento de Inmunología.

Correspondencia a Mauricio Sarrazola, msarrazola@unipamplona.edu.co

RESUMEN

La amibiasis es una infección causada por el parásito *E. histolytica*, que tiene alta incidencia en países en vía de desarrollo. Aunque estudios se han dirigido al entendimiento de la patogenia de la amibiasis; apenas se comienza a entender cómo es que la amiba burla al sistema inmune para sobrevivir y expandirse en el huésped.

Algunas investigaciones sugieren que un mecanismo utilizado por la amiba para invadir al huésped, consiste en suprimir la respuesta inmune. Al respecto, hace 10 años se ubicó la capacidad inmunosupresora en una subpoblación de células T, antes llamadas células T supresoras. Más recientemente, la evidencia acumulada ha justificado la nueva denominación como células Treg. Estas células, tienen un papel muy importante en la modulación de la respuesta inmune, lo que evita el daño colateral del tejido. Su función principal es suprimir la proliferación de las células efectoras; y juegan un papel clave en el control de la respuesta inflamatoria a nivel intestinal.

En los últimos cinco años se ha estudiado el papel de las células Treg en varias enfermedades parasitarias, se ha observado que pueden jugar papeles benéficos en algunas parasitosis al suprimir la respuesta inmune que provoca daño en el propio huésped, aunque también pueden ser perjudiciales por la supresión de células efectoras, impidiendo así la eliminación del parásito.

El objetivo central de este proyecto fue investigar la participación de las células Treg en un fenómeno de inmunosupresión cíclica observada previamente en un modelo murino de amibiasis intestinal. Para ello, se estudió el comportamiento poblacional de las células Treg a diferentes periodos posinfección, comparado con el de células obtenidas de animales no infectados. Sin embargo, los resultados obtenidos parecen sugerir que las células Treg no participan en este fenómeno de inmunosupresión.

INTRODUCCION

El parásito protozoario *Entamoeba histolytica* es el agente causante de la disentería amibiana y el absceso hepático amibiano. Se ha estimado que causa mundialmente más de 40 millones de casos de diarrea y que junto con el absceso hepático son responsables de 50 000 muertes anuales, siendo la tercera causa de muerte por parásitos (Walsh, J. A. 1986). La magnitud del problema en México es tal que la amibiasis es la principal causa de muerte por parasitosis. Se estima que un 20 a 25% de la población podría estar infectada, de los cuales más del 8% ha sufrido por lo menos un episodio de amibiasis invasora (Caballero, et al, 1994).

Aunque la infección aguda con *E. histolytica* induce una respuesta inmune en el hospedero, en muchas ocasiones la invasión de tejido por este parásito está asociada con supresión de la inmunidad mediada por células T (Ortiz-Ortiz L., et al, 1975). La mayoría de los estudios sobre inmunidad contra la amibiasis se han realizado en modelos experimentales en roedores. En dichos modelos también se ha demostrado que la anergia de células T en términos de capacidad proliferativa acompaña la invasión del hígado y la infección intestinal por amibas. Así, estudios realizados para evaluar la respuesta inmune en un modelo de amibiasis intestinal en ratones C3H/HeJ, el mejor conocido hasta ahora y el único susceptible a la infección, demostró que la inoculación de trofozoítos en el ciego de los animales y el establecimiento de la infección, cursó con una depresión cíclica de la síntesis de ADN cuando los linfocitos de

bazo fueron estimulados con Concanavalina A (mitógeno de células T), PWM (de células T y B) y extracto crudo de amiba (Ghosh P. et al. 1995). La supresión se observó en ciclos de 10 a 20 días durante los dos meses de seguimiento y se asoció con un defecto en la transducción de señales en los linfocitos. El mismo fenómeno se observó cuando se evaluó la respuesta de hipersensibilidad de tipo-retardada en dichos ratones infectados (Ghosh P. et al, 2000).

Por otra parte, un estudio mas reciente en el mismo modelo utilizando un chip de genes demostró que cuando hay activación de la respuesta inmune, la población de células T CD4+ activadas es orientada a una respuesta del tipo Th2, con marcada producción de IL-4, IL-13 e infiltración de eosinófilos y células cebadas, sugiriendo que el parásito inhibe la producción de citocinas del perfil Th1. Es interesante anotar que en ratones depletados de linfocitos T CD4+ se encontró menos carga parasitaria que los ratones no tratados, sugiriendo que la respuesta inmune del hospedero contribuye al daño causado por la amiba (Haupt E. et al. 2002).

De estos trabajos se desprende el hecho de que la respuesta celular tipo Th1 es la responsable de la inmunidad protectora contra la amibiasis, y que por lo tanto para poder establecerse, la amiba modula la respuesta inmune del hospedero a través de la desviación de la respuesta de células T hacia el perfil Th2, este fenómeno posiblemente contribuya al daño del tejido. Al igual que en la amibiasis, la infección murina con *Leishmania amazonensis* activa una respuesta de células T CD4+ que media la patogénesis del parásito. El análisis

de la población de células en el sitio de la infección, demostró acumulación de células T reguladoras CD4+CD25+CD86+ y de transcritos de FoxP3, IL-10 y TGF- β capaces de suprimir la proliferación y producción de citocinas (IL-2 e IFN γ) por células CD4+CD25-. Por otra parte, la transferencia de dicha población a ratones vírgenes antes de la infección, redujo el grado de la enfermedad, sugiriendo que desempeñan un papel protector en la patología inmune de la Leishmaniasis (Ji j. et al, 2005).

Hasta hace poco las células T reguladoras (Treg), antes llamadas células T supresoras comenzaron a tener un gran interés. Los primeros estudios fueron realizados por Sakaguchi y colaboradores, y observaron que las células Treg eran esenciales en la homeostasis del sistema inmune. Las células T reguladoras comprende de 5-10% de las células CD4+ periféricas (Maloy, et.al., 2001; Sakaguchi, et al., 2001; Gavin et.al., 2003; Piccirillo, et al.2004) y su función principal es controlar la respuesta inmune por medio de la supresión de la proliferación (Jonuleit et.al.,2001; Piccirillo, et al, 2001) , evitando así el daño colateral del tejido por la misma respuesta. Estas células T reguladoras están implicadas en una gama de enfermedades incluyendo enfermedades autoinmunes órgano-específica (Sakaguchi, S., et al. 1995), enfermedad inflamatoria del intestino (Read, S., et al.2000), esclerosis múltiple (Viglietta, V., et.al. 2004), enfermedad huésped versus trasplante (Cohen, J.L., et al, 2002, Hoffmann, P., et.al 2002, Taylor, P.A., et. al. 2002), alergia (Curotto de Lafaille, M. A., et. al. 2001) e inmunidad de esterilización a organismos infecciosos (Belkaid, Y., 2002). La acumulación de células T reguladoras ha sido observado en la sangre periférica y micro ambientes tumorales de pacientes

con cáncer (Woo, E. Y., et al. 2002; Liyanage, U. K., et. al. 2002; Wolf, A. M., et. al. 2003; Marshall, N. A., et. al. 2004; Viguier, M., et. al. 2004) y su remoción ha sido reportada que resulta en una efectiva inmunidad antitumoral, implicando estas células en evasión inmune por células cancerosas (Shimizu, J., et.al. 1999).

Por otra parte, recientemente se ha estudiado el papel de las células Treg en infecciones parasitarias. La supervivencia a una infección parasitaria requiere la generación de una respuesta inmune controlada que reconozca al patógeno invasor y que limita un potencial daño de la respuesta del huésped. Del punto de vista de los parásitos, microbios, han evitado la eliminación por la respuesta inmune del huésped y preserva su ciclo de vida mientras al mismo tiempo retrasa o previene la destrucción del huésped. La modulación de la respuesta del huésped por el parásito es logrado a través de reajustes complejos de la respuesta inmune.

La inducción de la respuesta regulatoria es una estrategia común usada por el parásito y normalmente se asocia con la terminación de la respuesta inmune efectora del huésped. (Belkaid Y., 2006). Pero en recientes estudios se ha observado el papel de las células Treg en diferentes parasitosis, que pueden ser perjudiciales o benéficas. Por ejemplo su papel perjudicial se ha observado en Malaria donde las células Treg controla la respuesta inmune efectora permitiendo la expansión incontrolada del parásito induciendo la muerte del huésped (Hisaeda H, et al.2004-2005); lo mismo ocurre con el parásito *Leishmania major*, las células Treg controla a través de mecanismos IL-10

dependiente e independiente, la respuesta Th1 permite la persistencia del parásito, remover las Treg induce la curación (Belkaid Y., et.al. 2002; Anderson CF, et. al. 2005; Mendez S, et. al. 2004; Suffia I. et. al. 2005; Murphy ML, et. al. 1998).

Además, las células Treg actúan como benéficas en otras parasitosis como son las enfermedades de Esquistosomiasis y Leishmaniasis (*Leishmania amazonensis*), debido a que estas células controlan la inmunopatología a través de la producción de la IL-10, permitiendo la supervivencia del huésped, la remoción de las células Treg permite el aumento del número de parásitos y por lo tanto aumenta la patología (Hesse M, et al, 2004; McKee AS, Pearce EJ, 2004; Singh KP, et. al. 2005; Ji J, et. al. 2004).

El objetivo central de este proyecto fue investigar la participación de las células Treg en un fenómeno de inmunosupresión cíclica observada previamente en un modelo murino de amibiasis intestinal. Para ello, se estudió el comportamiento poblacional de las células Treg a diferentes periodos posinfección, comparado con el de células obtenidas de animales no infectados. Sin embargo, los resultados obtenidos parecen sugerir que las células Treg no participan en este fenómeno de inmunosupresión.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVO Y COSECHA DE TROFOZOÍTOS DE *Entamoeba histolytica*

Trofozoítos axénicos de la cepa HM-1:IMSS recién obtenidos de hígado de hámster para incrementar su virulencia, se crecieron a 37°C en medio de cultivo TYI-33 suplementado con 10% de suero bovino adulto, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de sulfato de estreptomicina. Los trofozoítos se cosecharon después de dos días, se desprendieron de la pared de las cajas de cultivo por enfriamiento en hielo durante 10 minutos, y se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS 1X); luego se contaron utilizando la cámara de Neubauer, ajustando a 1×10^6 de trofozoítos en 100µl de PBS 1X.

PREPARACIÓN DE ANTÍGENO AMIBIANO TOTAL

Los trofozoítos cosechados como se describió arriba, se lavaron tres veces con PBS 1X en condiciones estériles. El pellet resultante de la última centrifugación se subdividió en tubos de 1,5 ml que se mantuvieron a -20°C hasta su uso. Para preparar el antígeno amibiano, los pellets fueron descongelados y resuspendidos en PBS 1X, preparándose diluciones seriales de 1:10, 1:100 y 1:1000 y se determinaron las concentraciones de proteína por el método de Bradford (azul de Coomassie) utilizando el reactivo de Bradford (SIGMA B-6916) en todas las diluciones.

EL MODELO MURINO DE AMIBIASIS INTESTINAL

Ratones C3H/HeJ. Se utilizaron ratones singénicos C3H/HeJ, hembras de 4-6 semanas de edad, obtenidos de la colonia mantenida en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Estos animales se mantienen en condiciones microbiológicas controladas y libres de parásitos. Existen estudios previos del grupo que demuestran que estos ratones son susceptibles a la infección con *E. histolytica* a nivel intestinal.

Inoculación intracecal de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Los ratones se anestesiaron con ketamina/xylazina, luego se les realizó una incisión fina en el abdomen y otra en el peritoneo. Se expuso el ciego y se inoculó un volumen de 100 μ l que contenga 1×10^6 trofozoítos de *E. histolytica*. La supervivencia de los ratones fue >95%.

El diseño experimental se basó en 9 grupos, cada uno de 6 ratones, de los cuales, 4 ratones fueron infectados con trofozoítos y 2 inyectados con PBS 1X (controles). Los ratones de cada grupo se mantuvieron en jaulas separadas; grupos de ratones fueron sacrificados a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 días postinfección. Todos los procedimientos de manipulación de ratones se llevaron a cabo de acuerdo con las normas humanitarias para el cuidado y uso de animales de laboratorio descritas en el Código Ético del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

EXTRACCIÓN DE CÉLULAS DE BAZO, DE GANGLIOS MESENTÉRICOS Y DE PLACAS DE PEYER

A cada ratón se le extrajo primero el bazo, cortando cuidadosamente sus ligamentos y vasos cortos, colocándolo en medio RPMI 1640 (GIBCO Cat. # 31800-014) a 4°C. A continuación se extrajeron los ganglios mesentéricos, que se ubican sobre los intestinos en forma de una red con irrigación sanguínea y grasa, cortando cuidadosamente los ligamentos que sostienen a la red y colocándola en un papel, para por medio de pinzas, apartar los 4 ganglios de la grasa y colocarlos en el mismo medio de cultivo a 4°C. Finalmente, se extrajeron las placas de Peyer que se encuentran a lo largo del intestino delgado, cortando superficialmente sin perforar el intestino, lavando después con medio RPMI a 4°C. Todos los anteriores procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad.

Posteriormente, cada órgano se disgregó con la ayuda de una malla estéril para obtener la suspensión de células. En el caso del bazo, se utilizó una solución hemolizante para eliminar los eritrocitos. Finalmente, las células de todos los órganos se lavaron tres veces con medio de cultivo y se determinó su índice de viabilidad en una cámara de Neubauer utilizando azul de tripano, para ajustar la densidad a 5×10^5 células en 100 μ l de medio.

DIAGNÓSTICO DE LA AMIBIASIS INTESTINAL EN LOS RATONES

A cada ratón se le extrajo el ciego para fijarlo en 10% de formaldehído. Las características macroscópicas del ciego permitieron definir el establecimiento

de la amibiasis intestinal en los ratones: ciego contraído y de color pálido, tamaño mayor de lo normal con predominante irrigación sanguínea, todo ello en comparación con los ciegos de los ratones no infectados.

MARCACIÓN DE LOS LINFOCITOS CON CFDAE (CARBOXIFLUOROCEINDIACETATO)

Se tomaron 2×10^6 células de cada órgano y se lavaron dos veces con PBS, y se resuspendieron en 500 μ l de PBS para luego agregar 500 μ l de una solución 2 μ M de CFDAE (INVITROGEN Cell Trace CFSE Cell proliferation kit for flow cytometry C34554), lo que resultó en una dilución final de 1 μ M. Se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos en la oscuridad, agitando los tubos ocasionalmente. La reacción se detuvo agregando 5 ml de RPMI con 10% de suero fetal bovino y se centrifugó a 200 gravedades por 5 minutos a 10°C para luego lavar las células en PBS con suero fetal bovino al 5% y ajustar la densidad a 5×10^5 de células en 100 μ l del medio suplementado. Todos los procedimientos anteriores se realizaron en condiciones de esterilidad.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Para los ensayos de proliferación celular se utilizaron placas para ELISA de 96 pozos, se colocaron en cada pozo 5×10^5 células en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 1 g/L de bicarbonato de sodio (GIBCO), 20 mM de HEPES, suero fetal bovino al 10% (GIBCO Cat.895-1810), 0,1 mM de la mezcla de aminoácidos no esenciales (GIBCO 10 mM), 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO 100 Mm), penicilina/estreptomicina (GIBCO 100 unidades/ml), y

50 μ M de 2-mercaptoetanol. Las células fueron estimuladas con 1 μ g concanavalina A (SIGMA C-2010) o con 50 μ g de antígeno amibiano total. Otras células no fueron estimuladas y se utilizaron como control. Todos los ensayos se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 72 horas.

Al cumplirse las 72 h, las células teñidas con CFDASE, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron cuidadosamente en 1 ml de PBS con 0,5 mM de EDTA, para posteriormente ser incubadas a 37°C por 5 minutos en baño María. Posteriormente, se centrifugaron y se resuspendieron en 200 μ l de buffer de tinción (PBS pH 7,3 con 2% de suero fetal bovino, y 0,02% de azida de sodio) y se fijaron agregando 57 μ l de paraformaldehído al 4% y se almacenaban a 4°C hasta que eran analizadas en el citofluorómetro.

MARCAJE DE LAS CÉLULAS TREG

Se utilizó un kit para identificar células Treg basado en la detección de los marcadores celulares CD4, CD25 y Foxp3 (e-Bioscience, Mouse Regulatory T cell Staining Kit # 3, Cat. 88-8115). Para ello, se tomaron 3×10^6 células de cada órgano: células de bazo, placas de Peyer y ganglios mesentéricos, y se lavaron dos veces con buffer de tinción, para después agregar 30 μ l de una mezcla de dos anticuerpos marcados con distintos fluorocromos: IgG anti-CD4 FITC (Cat. 11-0042) dilución 1/100 y IgG anti-CD25 PE (Cat.12-0251) dilución 1/200; y se dejó incubar por 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Luego se lavaron dos veces con el mismo buffer de tinción arriba descrito; después se adicionaron

200 µl de un buffer de fijación/permeabilización (paraformaldehído 4%, saponina 0,05% P/V, PBS y 5% de suero), se mantuvo la incubación a 4°C durante 2-18 horas en la oscuridad.

Finalmente, se lavó la mezcla con buffer de tinción y después dos veces con buffer de permeabilización. El marcaje de Foxp3 se realizó agregando 30 µl de IgG anti-Foxp3 PECy5 (Cat.15-5773) dilución 1/50, que se incubó a 4°C por 30 minutos en la oscuridad y se lavó dos veces con buffer de permeabilización. La mezcla de células con el triple marcaje finalmente se resuspendió en 200 µl de buffer de tinción y se almacenaron a 4°C hasta ser leídas en el citofluorómetro.

CITOFLUOROMETRÍA

El citófluorómetro que se utilizó es un FACScalibur de Becton Dickinson, capaz de analizar hasta 4 colores diferentes y 8 parámetros (FSC, SSC, 4 colores, *pulse processing* y tiempo); tiene dos lasers, 1 Ar (488nm) y 1 *solid state red diode laser* (635nm), tiene capacidad de Sorter, para dos tubos. Usa Cell Quest Pro como programa de adquisición y análisis. El FACScalibur permite analizar muestras marcadas con los siguientes fluorocromos: FL1: FITC, FL2: PE, FL3: PE-Cy5 (cychrome), y FL4: AP.

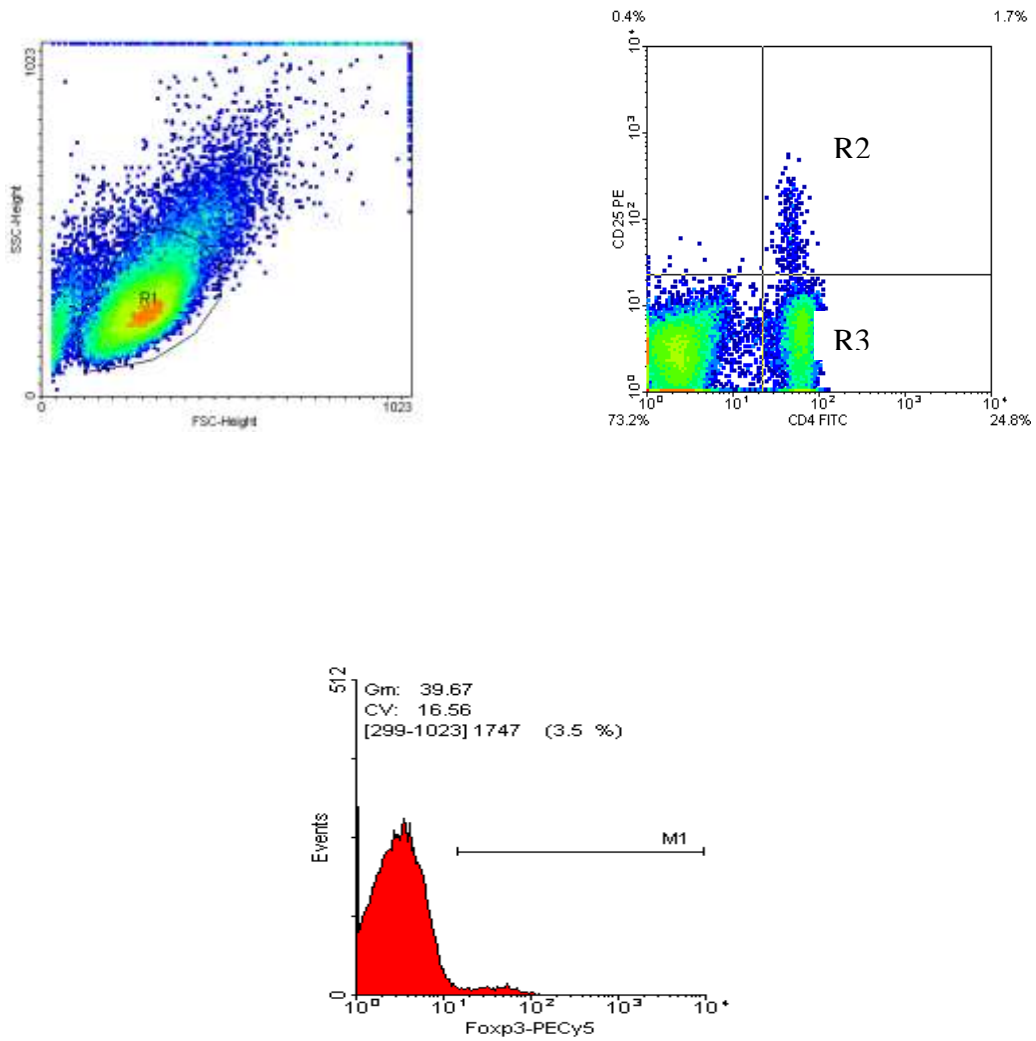
Adquisición de células proliferadas mediante CFSE. Al utilizar el citofluorómetro para analizar el grado de inmunosupresión, primero se ubicó una región donde se encuentra la población de linfocitos en un *dot plots* teniendo en cuenta el tamaño y la granularidad, y luego a partir de esa región

se hace un histograma donde se observó varios picos de CFSE que indica el número de divisiones hechas por los linfocitos estimulados y esto se comparó con los linfocitos no estimulados; este dato se indica en porcentaje y se utilizó canal FL1 en el citómetro para la adquisición de las muestras.

Adquisición de células Treg marcadas con fluorocromos. Las células obtenidas de los órganos fueron identificadas con anticuerpos marcados con fluorocromos, dirigidos contra antígenos de superficie CD4 y CD25, y luego a nivel intracelular contra Foxp3. Se adquirieron 10 000 eventos de una región seleccionada donde se ubican los linfocitos (región R1), se utilizó el canal FL2 para PE anti-CD25, FL1 para FITC anti- CD4 y FL3 para PECy5 anti-Foxp3. Luego se ubicó una región donde se analizó el porcentaje de linfocitos dobles positivos CD4⁺CD25⁺ (Región R2) y linfocitos CD4⁺ (Región R3); en cada región se analizó el porcentaje de linfocitos que son Foxp3⁺ por medio de un histograma (gráfico 1). Se observó varias poblaciones CD4⁺, CD25⁺ y Foxp3⁺ en bazo, ganglios mesentéricos y placas de Peyer de ratones infectados y no infectados en varios intervalos de tiempo.

Los datos obtenidos en el citofluorómetro fueron analizados con el software Winmdi 2.9, se tuvo en cuenta el porcentaje total de células Foxp3⁺, células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y células CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ presentes en los diferentes órganos linfoides secundarios, y el índice de proliferación de los ratones en los diferentes tiempos posinfección, en comparación con los grupos de ratones no infectados. El análisis de varianza y prueba postHoc se encuentra al final de este trabajo en anexos.

Gráfico 1. Análisis de poblaciones de células Treg



Nota: R1 es la población total de linfocitos, a partir de ésta región se realizó otro dot plot y se ubicó R2 que son los linfocitos que son dobles positivas para CD4 y CD25 y R3 los linfocitos que son sólo CD4. A partir de estas regiones se realizaron histogramas para saber qué porcentaje de estas células eran Fxp3.

RESULTADOS

IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO MURINO DE AMIBIASIS INTESTINAL

Los grupos de ratones singénicos C3H/HeJ, hembras de 4-6 semanas de edad, que fueron inoculados intracecalmente con 1×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* mostraron una supervivencia >95% en todos los tiempos experimentales: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 días postinfección. El diagnóstico de amibiasis intestinal se llevó a cabo por observaciones macroscópicas de los ciegos y basados en estudios anteriores que demuestran que más del 90% de los ratones suelen infectarse presentando una colitis activa, a diferencia de los ratones no infectados.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA EN RATONES INFECTADOS Y NO INFECTADOS

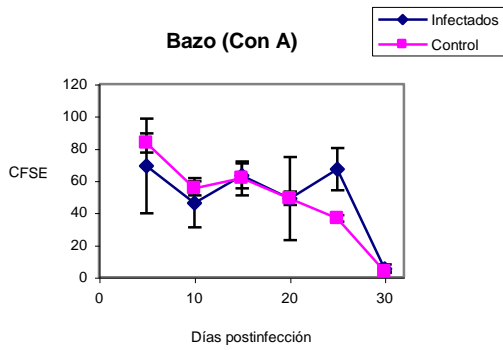
Para realizar los ensayos de proliferación se decidió probar el método de captación de un compuesto fluorescente (CFDASE: carboxifluoresceindiacetato), que se evalúa por medio de un citofluorómetro. El principio del método se basa en la captación celular del colorante por difusión pasiva, el cual al llegar al citoplasma de las células activas se convierte en un emisor de fluorescencia. Incluso, es posible monitorear la división celular, puesto que cuando se dividen las células también se divide la cantidad del fluorocromo. Se realizaron estimulaciones por concanavalina A (ConA) y por antígeno total amibiano. La ConA es un mitógeno de células T y se utiliza como

control para evaluar la proliferación inespecífica de los linfocitos. En contraste, la estimulación por antígeno amibiano induce la proliferación de las poblaciones celulares que reconocen específicamente a los antígenos, y por consecuencia, es de una magnitud menor.

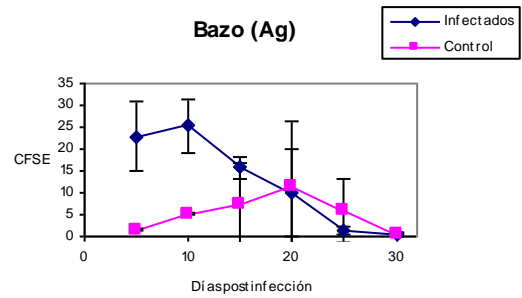
Como se muestra en la figura 2, las células de bazo provenientes de ratones infectados, proliferaron ante la estimulación por ConA (gráfico 2a), aproximadamente igual al de células de los ratones no infectados. Resultados similares se obtuvieron con células de ganglios mesentéricos (gráfico 2b) y placas de Peyer (gráfico 2c), provenientes de ratones infectados y no infectados. En contraste, las células de bazo de los ratones infectados respondieron más activamente al estímulo del antígeno amibiano en los tiempos cortos del cultivo (antes de los 20 días postinfección) (gráfico 2d). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la respuesta proliferativa al antígeno amibiano, entre las células de ganglios mesentéricos (gráfico 2e) y de placas de Peyer (gráfico 2f) en ratones infectados y no infectados, a pesar de que en el caso de las células de placas de Peyer se observó una diferencia considerable al día 10 de postinfección.

Gráfico 2. Análisis de la proliferación celular de diferentes órganos linfoides de ratones infectados y no infectados con *E. histolytica*

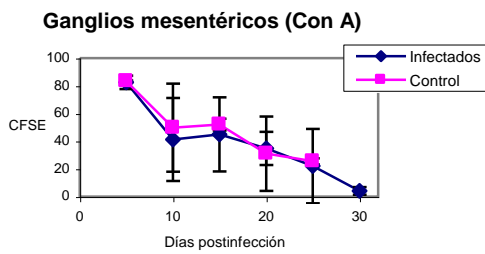
(a)



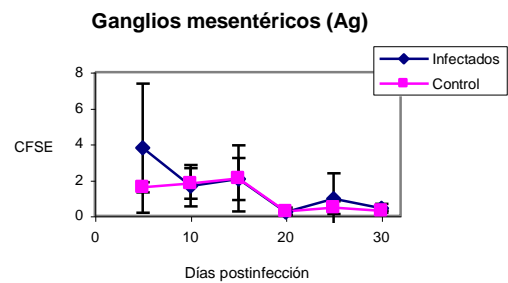
(d)



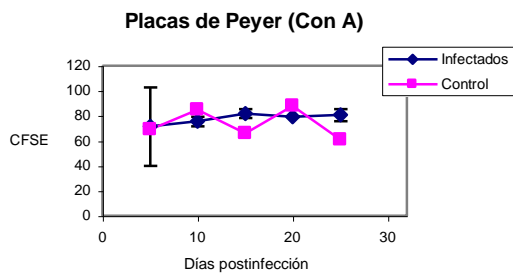
(b)



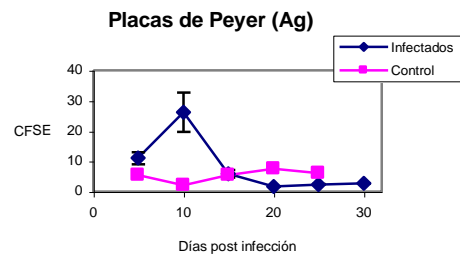
(e)



(c)



(f)



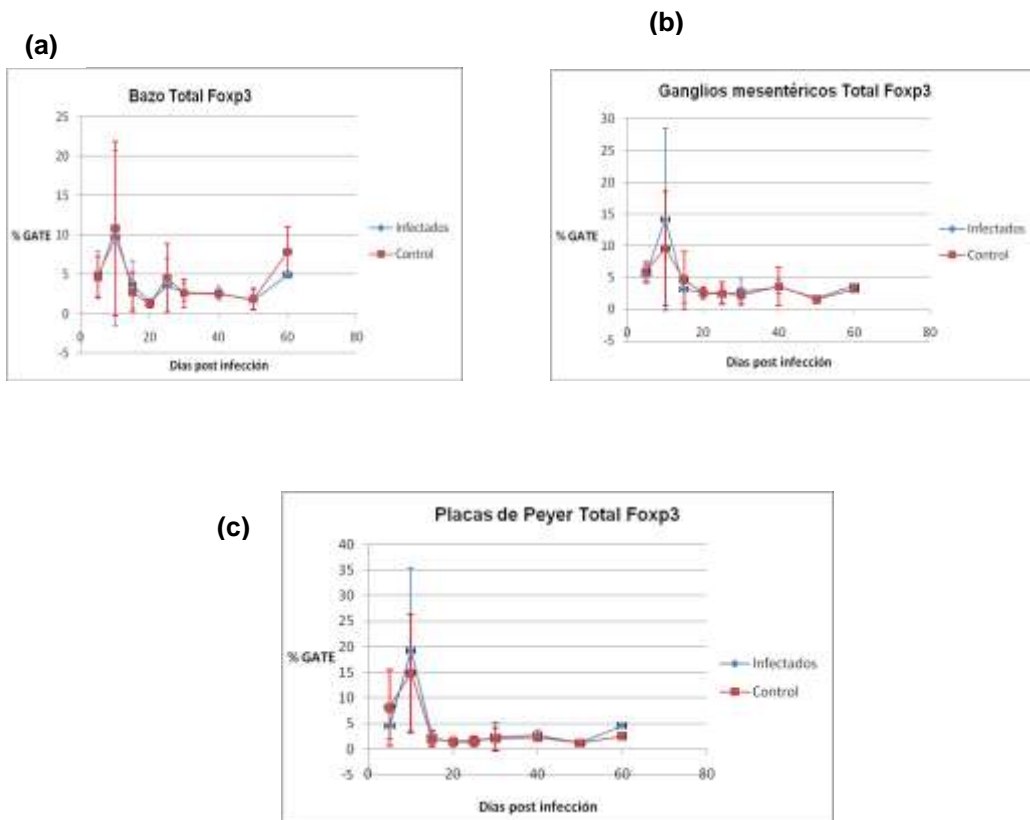
ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS TREG EN RATONES INFECTADOS Y NO INFECTADOS

El siguiente paso consistió en determinar la cantidad de células Treg a lo largo de la infección. Para ello, se marcaron las células de los ratones infectados y no infectados con anticuerpos fluorescentes que reconocen marcadores característicos de células Treg (CD4, CD25 y Foxp3). Una vez marcadas las células de bazo, ganglio mesentérico y placa de Peyer, se analizaron las poblaciones en un citófluorómetro. Se tomó en cuenta la cantidad de células identificadas en una determinada región (% GATE), así como la intensidad media de fluorescencia (G mean) que se obtiene por el marcaje de cada molécula de superficie (CD4⁺, CD25⁺ y Foxp3⁺). Este último parámetro permite conocer el nivel de expresión de los marcadores por célula, y de esta manera, conocer el comportamiento de la población de las células Treg. Se analizaron las siguientes poblaciones: (1). Foxp3⁺, (2). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y (3). CD4⁺Foxp3⁺.

Como se describe en los siguientes encabezados, los resultados no mostraron diferencias significativas en las poblaciones de células Treg entre ratones infectados y no infectados, con la excepción de la población CD4⁺Foxp3⁺ proveniente de ganglios mesentéricos de ratones infectados, que estaban aumentados en los días 10 y 25 en comparación con los ratones no infectados. Todos los datos fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza y prueba Post Hoc para determinar su significancia.

Población de Células Foxp3⁺ evaluadas como porcentaje de la población total (% GATE). La evaluación cuantitativa obtenida a través del parámetro % GATE, mostró que en células de bazo (gráfico 3a), ganglio mesentérico (gráfico 3b) y placa de Peyer (gráfico 3c), la evolución de las poblaciones Foxp3⁺ fue muy similar entre los ratones infectados y no infectados a lo largo de los 60 días de seguimiento. El análisis de varianza determinó que las mínimas diferencias fueron no significativas. Cabe destacar el aparente incremento sincrónico de las células Foxp3⁺ entre los días 5 y 10 de postinfección, en ambos tipos de ratones, donde la magnitud de las desviaciones estándar posiblemente se debió a la manipulación experimental.

Gráfico 3. Porcentaje GATE del total de linfocitos que son Foxp3⁺



Los otros análisis realizados en las otras poblaciones celulares seleccionadas, muestran el mismo comportamiento.

DISCUSION

La amibiasis intestinal en ratones C3H/HeJ, que es el mejor modelo animal disponible, cursa con una inmunosupresión cíclica que se observa en ciclos de 10 a 20 días. Algunas observaciones preliminares hacen pensar que el fenómeno está asociado con un defecto en la transducción de señales en los linfocitos (Ghosh, 1995). El tracto gastrointestinal juega un papel de gran importancia en la definición de los antígenos que son tolerados y de los que provocarán una respuesta inmune. Al respecto, se ha involucrado a la población de células Treg CD4⁺ (Treg) en el fenómeno global de la regulación inmune en el intestino.

El objetivo del presente proyecto de tesis fue el de investigar la participación de las células Treg en la supresión de la proliferación observada en el modelo de amibiasis intestinal en ratones C3H/HeJ. Los objetivos presentados en este documento fueron cumplidos a cabalidad en lo que se refiere al montaje del modelo de amibiasis intestinal en ratones C3H/HeJ; a la obtención de poblaciones totales de células en ganglios mesentéricos, placas de Peyer y bazo, de ratones sanos e infectados. Mención especial merece la determinación de la respuesta proliferativa a concanavalina A y antígeno amibiano en las células de ganglios mesentéricos, placas de Peyer y bazo, obtenidas de ratones sanos e infectados, puesto que se llevaron a cabo a través de ensayos de CFDASE (carboxifluoresceindiacetato), lo que significó

montar una nueva metodología que no se empleaba en el grupo, en donde los ensayos de proliferación se realizaban por el método tradicional de incorporación de timidina tritiada.

Inesperadamente, los esplenocitos y las células derivadas de los ganglios mesentéricos, tanto de los ratones infectados como de aquellos no infectados, mostraron una tendencia a disminuir su proliferación ante ambos estímulos con el paso del tiempo. Las razones de esa disminución se desconocen, aún más en los ratones no infectados que normalmente presentan niveles de proliferación más elevados. Estos resultados contrastan con aquellos que mostraron un patrón cíclico de inmunosupresión en esplenocitos a los días postinfección que aquí se ensayaron (Ghosh, 2000). Por otra parte, los niveles de proliferación de las células de Placas de Peyer no variaron durante todo el experimento en ninguno de los grupos, lo cual sugiere que estas no fueron ni activadas ni suprimidas.

Asimismo, la identificación y cuantificación de las células Treg en ratones, requirió desarrollar una estrategia de marcaje combinado, utilizando tres diferentes moléculas: CD4⁺, CD25⁺ y Foxp3⁺. El marcaje con anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos, y analizados en el citofluorómetro, necesitó un considerable número de ensayos. En resumen, en el presente documento de tesis se describe el cumplimiento de los objetivos planteados al inicio del proyecto. Cabe mencionar que las anteriores metodologías son de utilidad general en los estudios modernos de la respuesta inmune.

Sin embargo, los resultados no permiten adscribir un papel a las células Treg, dentro del fenómeno de supresión proliferativa en el modelo murino de amibiasis intestinal. Entre las causas que pueden involucrarse para explicar esta carencia, se puede mencionar la considerable variación experimental que impidió visualizar un fenómeno que debe ocurrir en niveles extremadamente bajos, por ejemplo, en algunas parasitosis se han observado cambios en la población de Treg entre 0,5 a 1%, dependiendo del modelo experimental. Por ello, aunque es posible que las células Treg, no estén involucradas en el fenómeno de inmunosupresión cíclica observado en el modelo de amibiasis intestinal en ratones, los resultados presentados en el presente proyecto de tesis no permiten una conclusión definitiva, debido a la sincronidad observada en los resultados de todos los tejidos (bazo, ganglios mesentéricos y placas de Peyer) obtenidos en ratones infectados y no infectados.

Como se insistió en el capítulo de resultados, la posibilidad de un efecto debido a la propia manipulación experimental no puede ser descartada. Sin embargo, el comportamiento oscilatorio tanto en linfocitos de ratones infectados como ratones no infectados también puede estar estrechamente relacionado con el papel que tiene Treg en la homeostasis del intestino; teniendo en cuenta que el intestino es un órgano expuesto a una gran cantidad de antígenos externos, los alimentos o la flora bacteriana normal puede iniciar un proceso inflamatorio, varios estudios han demostrado que la células las Treg se acumulan en el sitio de la inflamación y evita la respuesta contra estos factores no patogénicos (para ver una revisión acerca del papel de las células Treg en la homeostasis del intestino, se recomienda ver el artículo de Izcue, 2006)

Se desconocen las razones por las cuales el nivel de células Treg en los tres órganos fue el mismo entre infectados y no infectados. Sin embargo, se podría especular que la simple inyección de PBS en los ratones no infectados a través de la jeringa podría haber causado un daño tisular en el ciego que desencadenara una reacción inflamatoria que desatara las variaciones observadas a los diferentes tiempos de análisis. Ya que las evidencias de infección en los ratones inyectados con las amibas son pobres, es probable que las comparaciones se estén realizando en realidad entre grupos de ratones no infectados pero con pequeñas lesiones derivadas de la inyección.

Nuevamente, las evidencias obtenidas de los experimentos no son contundentes para relacionar las Treg como un mecanismo regulatorio en este fenómeno, es decir, que para asentar una respuesta definitiva con respecto al papel de las células Treg, se requiere depurar los experimentos hasta alcanzar la suficiente sensibilidad.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto permiten sugerir otras estrategias para el análisis de población de Treg en la amibiasis intestinal, por ejemplo, estudiar el comportamiento de los ratones no infectados para determinar si las oscilaciones observadas se deben a que reaccionaron al pinchazo cuando se inyectó el PBS.

Otro asunto que merece la mayor consideración en el presente proyecto, se refiere al valor diagnóstico de las observaciones macroscópicas, que se

utilizaron aquí, para dar seguimiento a la infección en los ratones: ciego contraído y de color pálido, mayor tamaño de lo normal con predominante irrigación sanguínea, todo ello en comparación con los ciegos de los ratones no infectados. Si bien es cierto que estos cambios han sido utilizados en otros estudios de menor duración, es posible que en estudios de largo plazo (hasta 60 días) no basten para establecer la certeza diagnóstica. En consecuencia, se recomienda complementar el diagnóstico con determinaciones de antígenos amibianos en heces, y estudios histológicos.

Finalmente, los datos obtenidos en el análisis de las Placas de Peyer, que se esperaba fuera el sitio donde se manifestarán los mayores cambios, no fueron claras debido, en cierta parte, a la pequeña cantidad de células obtenidas, obligó a realizar estos ensayos con el pool de células de placas de Peyer de los cuatro ratones de cada grupo infectado. Ya que es posible que alguno de los ratones no se hubiese infectado, el pool podría haber contenido células no comprometidas en una respuesta inmune. Además, el unir las cuatro muestras en un pool, tuvo como consecuencia que sólo se realizara una única medición por día de ensayo para este órgano, lo que influye en la confiabilidad de los datos producidos.

Se trata pues de un proyecto metodológicamente sofisticado, dirigido a resolver una pregunta de actualidad en la inmunología. Los elementos presentados sin duda permitirán afinar las estrategias para definir la participación de las células Treg en estudios futuros.

CONCLUSIONES

*Las células T reguladoras no intervienen en la infección con *Entamoeba histolytica*.

* El mayor número de células T reguladoras se observa en el bazo.

*Se necesita realizar otros ensayos para definir el papel de las células T reguladoras en la infección con *Entamoeba histolytica* .

BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, CF., Mendez, S., Sacks, DL. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 174:2934–2941. 2005.

BELKAID, Y., Blank, RB., Suffia, J.. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol Rev Review.* Aug; 212: 287-300. 2006.

BELKAID, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. and Sacks, D. L.. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* 420: 502–507. 2002.

CABALLERO, A., Viveros, M., Salvatierra, B., Tapia, R., Sepúlveda, J., Gutierrez, G. y Ortiz-Ortiz, L. Seroepidemiology of amebiasis in México. *Am J Trop. Med. Hyg.* 50: 412-9. 1994.

COHEN, J. L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D. and Salomon, B. L., CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 196: 401–406.11. 2002.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A., Muriglan, S., Sunshine, M. J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G. C., Wensky, A. K., Olivares-Lialgomez, D. and

Lafaille, J. J., Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 194: 1349–1359. 2001.

GAVIN, M., and Rudensky, A.. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 690–696.4. 2003.

GHOSH P., et al. Intestinal amebiasis: cyclic suppression of the immune response. *Parasitol Res.* 81 p. 475-480. 1995.

GHOSH P., et al.. Experimental Amebiasis: Immunohistochemical Study of Immune Cells Populations. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47(4) p.395-399. 2000.

HESSE, M., et. al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10- producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol.* 172: 3157–3166. 2004.

HISAEDA, H., et al. Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced TNFR family-related protein (GITR) during *Plasmodium yoelii* infection. *Eur J Immunol.* 35: 3516–3524. 2005.

HISAEDA, H., et al.. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat. Med.* 10: 29–30. 2004.

HOFFMANN, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C. G. and Strober, S., Donor-type CD4+CD25+ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-

host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 196: 389–399. 2002.

HOUPT E., et al. The Mouse Model of Amebic Colitis Reveals Mouse Strain Susceptibility to Infection and Exacerbation of Disease by CD4⁺T Cells. *J. Immunol.* 169 p. 4496-4503. 2002.

Ji, J., Masterson, J., Sun, J., Soong, L.. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 174: 7147–7153. 2005.

LIYANAGE, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S. and Linehan, D. C.. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol.* 169: 2756–2761. 2002.

MALOY, K. J., and Powrie, F.. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2: 816–822. 2001.

MARSHALL, N. A., Christie, L. E., Munro, L. R., Culligan, D. J., Johnston, P. W., Barker, R. N. and Vickers, M. A.. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 103: 1755–1762. 2004.

MCKEE, AS., Pearce, EJ.. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol.* 173: 1224–1231. 2004.

MENDEZ, S., Reckling, SK., Piccirillo, CA., Sacks D., Belkaid, Y.. Role for CD4+ CD25+ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med.* 200: 201–210. 2004.

MURPHY, ML., Cotterell, SE., Gorak, PM., Engwerda, CR., Kaye, PM.. Blockade of CTLA-4 enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. *J Immunol.* 161: 4153–4160. 1998.

ORTIZ-ORTIZ, L., Zamacona, G., Sepúlveda, B., Capín, NR.. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. *Clin Immunol Immunopathol.* May; 4(1): 127-34. 1975.

PICCIRILLO, C. A., and Shevach, E. M.. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin. Immunol.* 16: 81–88.5. 2004.

READ, S., Malmstr_m, V. and Powrie, F., Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory T cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 192: 295–302. 2000.

SAKAGUCHI, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155: 1151–1164.8. 1995.

SAKAGUCHI, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M. and Takahashi, T., Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182: 18–32.3. 2001.

SHIMIZU, J., Yamazaki, S. and Sakaguchi, S.. Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 163: 5211–5218. 1999.

SINGH, KP., Gerard, HC., Hudson, AP., Reddy, TR., Boros, DL.. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology.* 114: 410–417. 2005.

SUFFIA, I., Reckling, SK., Salay, G., Belkaid, Y.. A role for CD103 in the retention of CD4⁺CD25⁺ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 174: 5444–5455. 2005.

.

TAYLOR, P. A., Lees, C. J. and Blazar, B. R., The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus host disease lethality. *Blood*. 99: 3493–3499.1. 2002.

VIGLIETTA, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. and Hafler, D. A., Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199: 971–979. 2004.

VIGUIER, M., Lema_tre, F., Verola, O., Cho, M.-S., Gorochov, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P. and Ferradini, L.. Foxp3 expressing CD4+CD25high regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J. Immunol.* 173: 1444–1453. 2004.

WALSH, JA.. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitud of morbidity and mortality. *Rev. Infec. Dis.* 8: 228-238. 1986

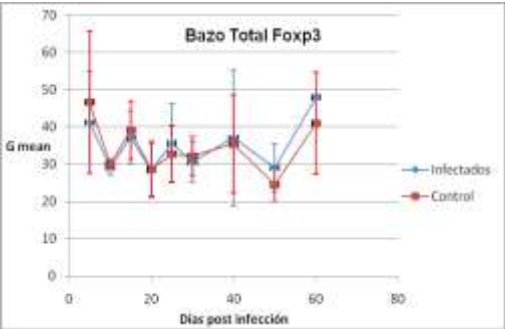
WOLF, A. M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E. and Grubeck-Loebenstein, B.. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 9: 606–612. 2003.

WOO, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R. and June, C. H.. Cutting edge: regulatory T cells from

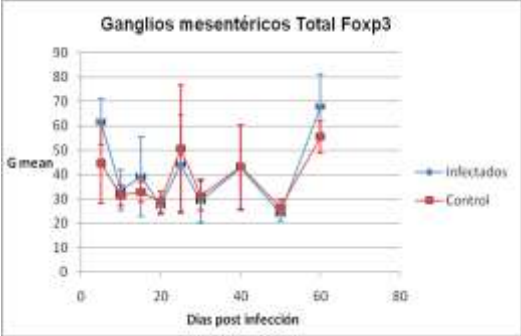
lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J. Immunol.*
168: 4272–4276. 2002.

Intensidad media de fluorescencia del total de linfocitos que son F_{oxp3}⁺

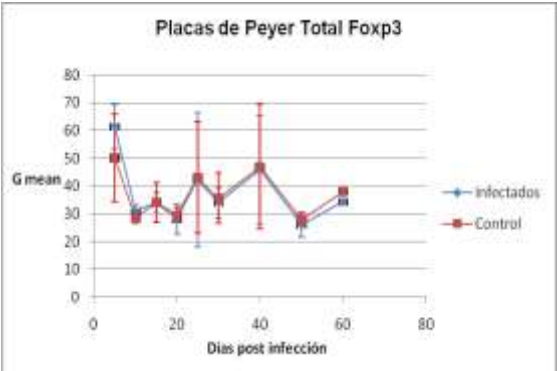
(a)



(b)

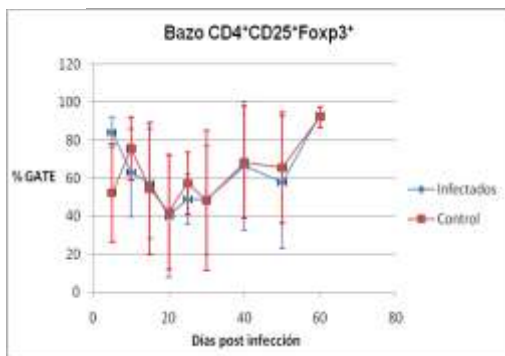


(c)

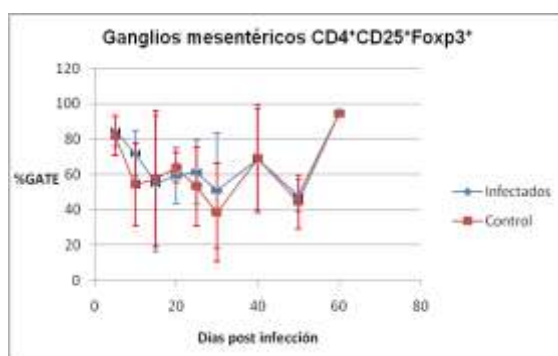


Porcentaje GATE de linfocitos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

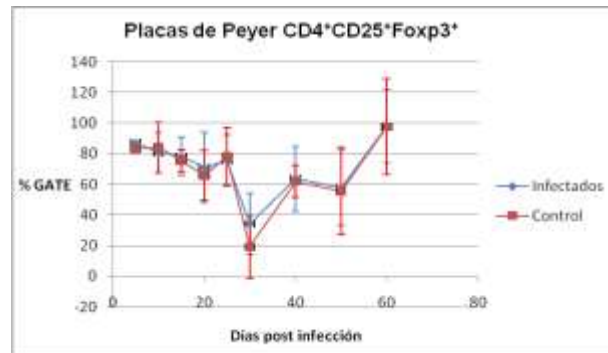
(a)



(b)

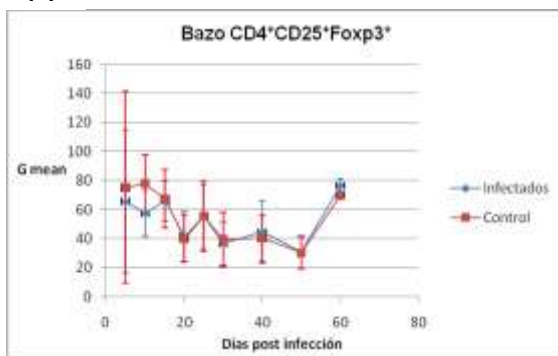


(c)

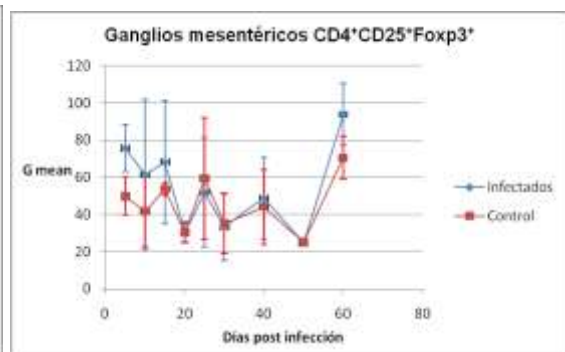


Intensidad media de fluorescencia de linfocitos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

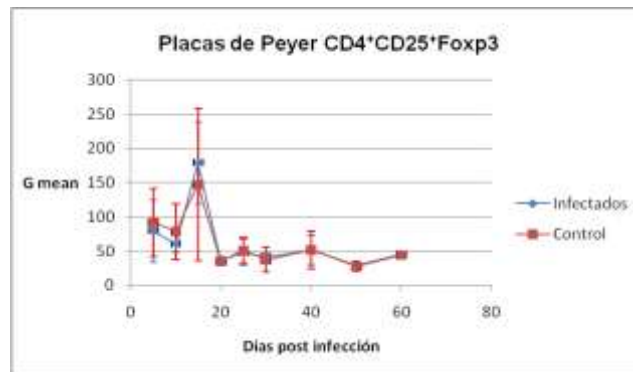
(a)



(b)

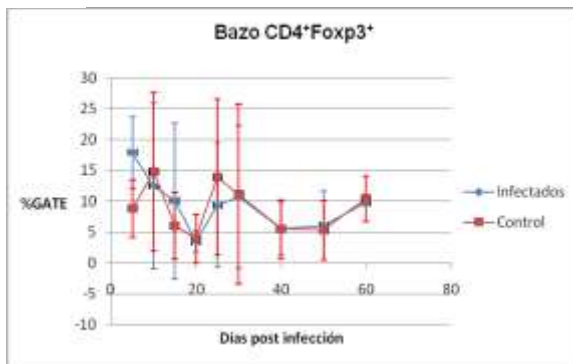


(c)

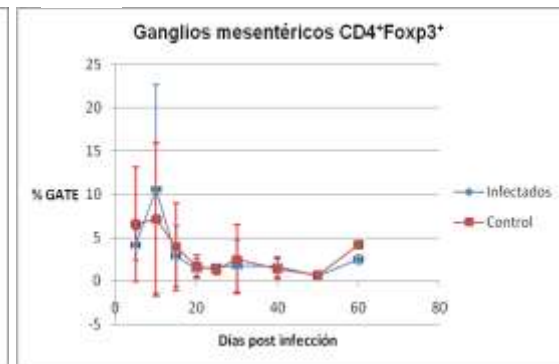


Porcentaje GATE de linfocitos CD4⁺Foxp3⁺

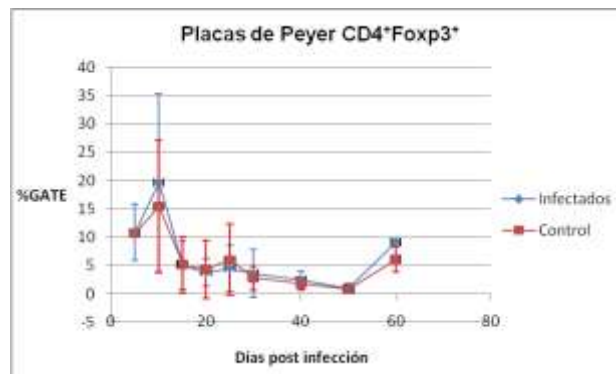
(a)



(b)



(c)



Intensidad media de fluorescencia de linfocitos CD4⁺Foxp3⁺

