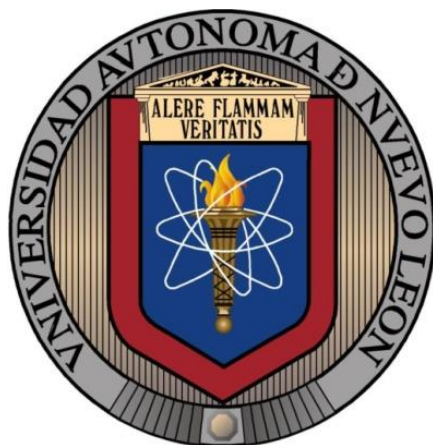


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**IDENTIFICACIÓN DE TIM-3 Y PD-1 EN LINFOCITOS T EN UN
MODELO DE ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL**

POR

DIANA IVONNE DUARTE MATA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

AGOSTO 2020

**IDENTIFICACIÓN DE TIM-3 Y PD-1 EN LINFOCITOS T EN UN MODELO DE
ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL**

Aprobación de la Tesis



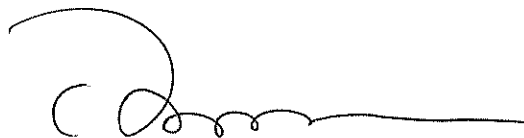
Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Director



Dra. C. Anna Velia Vazquez Marmolejo
Co-director



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Miembro de la Comisión



Dr. med Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

IDENTIFICACIÓN DE TIM-3 Y PD-1 EN LINFOCITOS T EN UN MODELO DE ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL

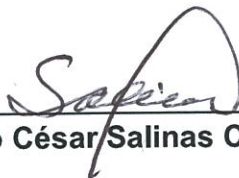
Presentado por:

Diana Ivonne Duarte Mata

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona y la co-dirección de la Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo.

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el número de registro: IN20-00003

Director de Tesis



Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Co-director de Tesis

Miembro de la comisión



Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco

Dedicatoria

A mi papá Juan Carlos Duarte Yanes

A mi mamá Leticia Mata Landaverde

A mi hermana Karla Leticia Duarte Mata

A mi hermana menor Karol Paola Duarte Mata

Por siempre estar presentes en los momentos más importantes de mi vida y por brindarme ese amor y apoyo incondicional que me ha hecho salir adelante y ser mejor persona.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Mario César Salinas Carmona por brindarme la oportunidad de crecer en conocimiento bajo su tutela, por sus consejos y disposición a lo largo de mi maestría, y por la confianza brindada en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Velia Vázquez que me acompañó desde principio a fin en todo el transcurso de mi trabajo, por sus consejos, paciencia, dedicación y entrega con el que se unió a este proyecto y por siempre estar presente cuando necesite de su ayuda.

Al Dr. Adrián Rosas por su gran disposición y ayuda a lo largo de este proyecto de tesis.

A todos los doctores pertenecientes al departamento de Inmunología: Dr. Manuel, Dr. Yairh, Dra. Angeles, Dra. Yolanda, Dr. Medina, Dra. Nallely por todos sus conocimientos compartidos y por brindarme el apoyo científico y moral durante mi estancia como su alumna.

Al M.C.P. Jorge Reyes por su gran apoyo y disposición en todo momento durante el desarrollo de este trabajo.

A mi amigo incondicional Luis Contreras por siempre estar presente en las buenas y en las malas motivándome a salir adelante, por su gran cariño y porque sin su apoyo mi recorrido hubiera sido más difícil.

A CONACYT y su apoyo financiero mediante la aceptación del Proyecto de infraestructura 2019 No.301133; así como a la beca otorgada No. 724338 que permitieron la realización de mis estudios de posgrado.

A la UANL y Paicyt por el apoyo financiero otorgado mediante los proyectos SA756-19 y SA818-19 que hicieron posible la realización de este proyecto.

Índice General

Contenido	Página
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 El micetoma y su patogénesis	2
1.2 Epidemiología del Micetoma	3
1.3 El Micetoma en México	6
1.4 Taxonomía del género <i>Nocardia</i>	7
2.1 Modelo experimental de actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>	7
2.2 Histopatología del Micetoma	9
3.1 Inmunidad Innata en el Micetoma	9
3.2 Inmunidad Humoral en la Infección por <i>Nocardia spp</i>	10
3.3 Inmunidad Celular en la Infección por <i>Nocardia spp</i>	11
3.4 Ambiente Supresor inducido por <i>Nocardia brasiliensis</i>	12
4.1 La Respuesta de Linfocitos T CD4+	13
4.2 La Respuesta de los Linfocitos T CD8+	14
5.1 Puntos De Control Inmunitarios	15
5.2 Desarrollo del agotamiento de Linfocitos T	18
5.3 Exposición Persistente al Antígeno	19
5.4 PD-1	21
5.5 TIM-3	24
5.6 Coexpresión de PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T	26
Capítulo 2. Justificación	27
Capítulo 3. Hipótesis	28
Capítulo 4. Objetivo general	29
Capítulo 5. Objetivos específicos	30
Capítulo 6. Materiales y Métodos	30
6.1 Animales	30
6.2 Cepa Bacteriana	30
6.3 Suspensión Unicelular Bacteriana	31
6.4 Infección Experimental	31
6.4.1 Eutanasia	32

6.4.2 Evaluación Clínica	32
6.4.3 Obtención de células de bazo y ganglio poplíteo	33
6.4.4 Obtención de células del cojinete plantar	34
6.4.5 Conteo Celular de Linfocitos	34
6.4.6 Determinación de Carga Bacteriana (Unidades Formadoras De Colonias)	34
6.5.1 Citometría De Flujo	35
6.5.2 Anticuerpos Monoclonales Utilizados	35
6.5.3 Estrategia de Análisis	36
6.6 Análisis Estadístico	38
Capítulo 7. Resultados	38
7.1 Cuantificación de la carga bacteriana en el tejido infectado durante las fases aguda y crónica de la infección.	39
7.2 Determinación del volumen del tejido infectado durante las fases aguda y crónica de la infección.	40
7.3 Cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el bazo durante las fases aguda y crónica de la infección.	47
7.4 Cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el ganglio poplíteo durante las fases aguda y crónica de la infección.	54
7.5 Cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el cojinete plantar durante las fases aguda y crónica de la infección.	61
7.6 Cuantificación de la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el bazo durante las fases aguda y crónica de la Infección.	71
7.7 Cuantificación de la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el ganglio poplíteo durante las fases aguda y crónica de la Infección.	81

7.8 Cuantificación de la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el cojinete plantar durante las fases aguda y crónica de la Infección.	91
Capítulo 8. Discusión	106
Capítulo 9. Conclusión	107
Capítulo 10. Perspectivas	108
Referencias bibliográficas	

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Diferencias entre un Linfocito T funcional y un Linfocito T agotado.	18
Tabla 2. Evaluación clínica de la infección.	32
Tabla 3. Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo.	35

Lista de Figuras

Contenido	Página
Figura 1. Epidemiología del micetoma.	3
Figura 2. Género, edad y ocupación que más afecta el micetoma.	4
Figura 3. Distribución del micetoma en México.	5
Figura 4. Tipo de micetoma y agente etiológico causal.	6
Figura 5. Imágenes de microscopia de tejido infectado con <i>N. brasiliensis</i> .	8
Figura 6. Estrategia de análisis para la citometría de flujo.	36
Figura 7. Cuantificación de la carga bacteriana en el cojinete plantar.	38
Figura 8. Evolución clínica del tejido infectado.	39
Figura 9. Dot plots representativos de la citometría de flujo en bazo.	40
Figura 10. Linfocitos T CD4+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección.	41
Figura 11. Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección.	42
Figura 12. Linfocitos T CD4+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección.	43
Figura 13. Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección.	44
Figura 14. Linfocitos T CD4+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección.	45
Figura 15. Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección.	46
Figura 16. Dot plots representativos de la citometría de flujo en ganglio poplíteo.	47
Figura 17. Linfocitos T CD4+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección.	48
Figura 18. Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección.	49

Figura 19. Linfocitos T CD4+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección.	50
Figura 20. Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección.	51
Figura 21. Linfocitos T CD4+ presentes en el ganglio poplíteo en las fases aguda y crónica de la infección.	52
Figura 22. Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en las fases aguda y crónica de la infección.	53
Figura 23. Dot plots representativos de la citometría de flujo en cojinete plantar.	54
Figura 24. Linfocitos T CD4+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección.	55
Figura 25. Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección.	56
Figura 26. Linfocitos T CD4+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección.	57
Figura 27. Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección.	58
Figura 28. Linfocitos T CD4+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección.	59
Figura 29. Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección.	60
Figura 30. Dot plots representativos de la citometría de flujo en bazo para el análisis de PD-1 y TIM-3.	61
Figura 31. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección.	62
Figura 32. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección.	63
Figura 33. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección.	64

Figura 34. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección.	65
Figura 35. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección.	66
Figura 36. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección.	67
Figura 37. Coexpresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección.	68
Figura 38. Coexpresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección.	69
Figura 39. Coexpresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección.	70
Figura 40. Dot plots representativos de la citometría de flujo en ganglio poplíteo para el análisis de PD-1 y TIM-3.	71
Figura 41. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección.	72
Figura 42. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección.	73
Figura 43. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en las fases aguda y crónica de la infección.	74
Figura 44. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección.	75
Figura 45. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección.	76

Figura 46. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en las fases aguda y crónica de la infección.	77
Figura 47. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección.	78
Figura 48. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección.	79
Figura 49. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda y crónica de la infección.	80
Figura 50. Dot plots representativos de la citometría de flujo en el cojinete plantar para el análisis de PD-1 y TIM-3.	81
Figura 51. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección.	82
Figura 52. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección.	83
Figura 53. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección.	84
Figura 54. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección.	85
Figura 55. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección.	86
Figura 56. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección.	87

Figura 57. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección.	88
Figura 58. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección.	89
Figura 59. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección.	90

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
APC	Aloficocianina
CTLA-4	Antígeno 4 del Linfocito T citotóxico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HBV	Virus de Hepatitis B
HCV	Virus de Hepatitis C
Gal-9	Galectina 9
IFN α/β	Interferón alfa/beta
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
ITIM	Inmunoreceptor con dominios de inhibición basados en tirosinas
ITSM	Inmunoreceptor con dominios de cambio basados en tirosinas
LAG-3	Gen 3 de activación de Linfocitos
LCMV	Virus de la Coriomeningitis Linfocítica
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	MiliMoles
NFAT	Factor Nuclear de los Linfocitos T activados
NK	Natural Killer
U	Unidades
PBS	Buffer Fosfato Salino
PD-1	Receptor de muerte celular programada
PD-L1/PD-L2	Ligando 1/2 del receptor de muerte celular programada
PE	Ficoeritrina
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
SIV	Virus de Inmunodeficiencia en Simios

TCR	Receptor de Células T
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TIM-3	Receptor de Inmunoglobulina de Linfocitos T y dominio de mucina 3
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Treg	Linfocito T Regulador
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VEB	Virus Epstein Bar
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

Resumen

Q.B.C. Diana Ivonne Duarte Mata

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del trabajo: Identificación de TIM-3 y PD-1 en Linfocitos T en un modelo de actinomicetoma experimental.

Número de páginas: 119

Propósito y método de estudio: En México *Nocardia brasiliensis* es la responsable del 85% de los casos de actinomicetoma, una enfermedad infecciosa de carácter inflamatoria, destructiva y discapacitante. Los eventos inmunológicos que se producen durante la infección por *N. brasiliensis* aún no han sido esclarecidos en humanos o modelos experimentales. PD-1 y TIM-3 pertenecen a la familia de moléculas que median la regulación negativa de los Linfocitos T; la coexpresión aumentada y sostenida de estos receptores ha sido ampliamente relacionado con el fenotipo de Linfocito T agotado. En el presente trabajo se utilizaron ratones Balb/c infectados en el cojinete plantar con *N. brasiliensis* y se evaluó por citometría de flujo la cinética de expresión de estos receptores en Linfocitos T. Se estudiaron órganos linfoides como ganglio poplíteo y bazo y el cojinete plantar durante la fase aguda y crónica de la infección. **Contribuciones y conclusiones:** Los resultados obtenidos muestran que la coexpresión de PD-1 y TIM-3 aumentó en Linfocitos T en la fase crónica de la infección en comparación con la fase aguda, ocurriendo tanto en los órganos linfoides estudiados como en el tejido infectado; por lo que se sugieren que la expresión de ambos receptores durante la fase crónica podría estar asociado al fenotipo de Linfocito T agotado, contribuyendo así a la persistencia de la infección, impidiendo la eliminación de *N. brasiliensis*.



Director de Tesis

Dr. C. Mario César Salinas Carmona

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 El micetoma y su patogénesis

El micetoma es una Infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes con tendencia a afectar huesos. Se caracteriza por un aumento de volumen relativamente indoloro y fístulas a través de las cuales se elimina pus y granos, constituidos por filamentos. Los agentes causales son de origen exógeno y pueden ser hongos (eumicetoma) o bacterias Actinomycetales (actinomictoma)»¹.

En la actualidad, se sugiere que más de 56 microorganismos diferentes (bacterias y hongos) son agentes causantes de micetoma. A algunos de los cuales se han encontrado en el suelo o en el intestino y los moldes de lombrices de la tierra, lo que sugiere que su nicho principal es el suelo².

Los microorganismos causantes de la infección penetran los tejidos cutáneos y subcutáneos a través de traumas menores (como un pinchazo de espina, una astilla de madera o un corte de piedra)³. El micetoma comienza como una pequeña y dura tumefacción o nódulo (probablemente en el lugar de un pinchazo de espina u otra brecha en la piel) que evoluciona para formar microabscesos que descargan un exudado purulento a través de las fístulas de la piel. El exudado contiene gránulos formados a partir de los filamentos de los organismos causantes que son el centro de la actividad inflamatoria. Sorprendentemente, incluso en la enfermedad crónica, generalmente no hay dolor ni manifestaciones sistémicas; sin embargo, los síntomas respiratorios y neurológicos, entre otros, pueden manifestarse cuando la enfermedad afecta el tórax, la cabeza y el cuello, o la columna vertebral.⁴ Finalmente, la masa sólida causa la destrucción del tejido, así como la deformidad y la pérdida de la función^{2,5}.

El resultado de la infección está determinado por el microorganismo, el sitio de la infección y los factores del hospedero que incluyen las respuestas inmunitarias y el estado hormonal².

En general, el micetoma involucra aquellas partes del cuerpo que entran en contacto con el suelo. El pie y la mano se ven afectados en el 84% de los casos, seguidos de otras partes de la pierna o el brazo (10%). El perineo, el abdomen, el tórax, la cabeza, el cuello y la cavidad oral están involucrados con menos frecuencia (menos del 1%). En México, la espalda es el segundo lugar más común porque los trabajadores rurales llevan madera y troncos en sus espaldas².

En todo el mundo, alrededor del 60% de los casos son causados por actinomicetos, mientras que el resto son causados por verdaderos hongos. Las especies de los géneros *Nocardia*, *Streptomyces* y *Actinomadura* son los principales agentes causales del actinomicetoma⁶.

El Actinomicetoma se disemina lentamente hacia áreas adyacentes y, en algunos casos, puede propagarse por diseminación linfática o hematológica⁴. Las lesiones metastásicas pueden ocurrir en varias estaciones de ganglios linfáticos, que pueden volverse supurativas³.

Debido a la cronicidad de esta patología y a las secuelas incapacitantes, se considera que es un problema de salud principalmente de zonas rurales que debe ser atendido con mayor interés por las instituciones de salud⁴.

1.2 Epidemiología del Micetoma

El micetoma es un problema de salud importante en muchas áreas tropicales y subtropicales. La mayoría de los casos ocurren en el cinturón de micetoma entre las latitudes 15° sur y 30° norte; y se han reportado en estudios retrospectivos de Sudán y México. Sin embargo, el área endémica real se extiende más allá del cinturón de micetoma.² Los casos de eumicetoma predominan en África y Asia, mientras que los del actinomicetoma son más comunes en América; estos se presentan frecuentemente en regiones tropicales y subtropicales entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio. Los países más afectados son: Sudan, Somalia, Senegal, India, Yemen, México y Venezuela¹.

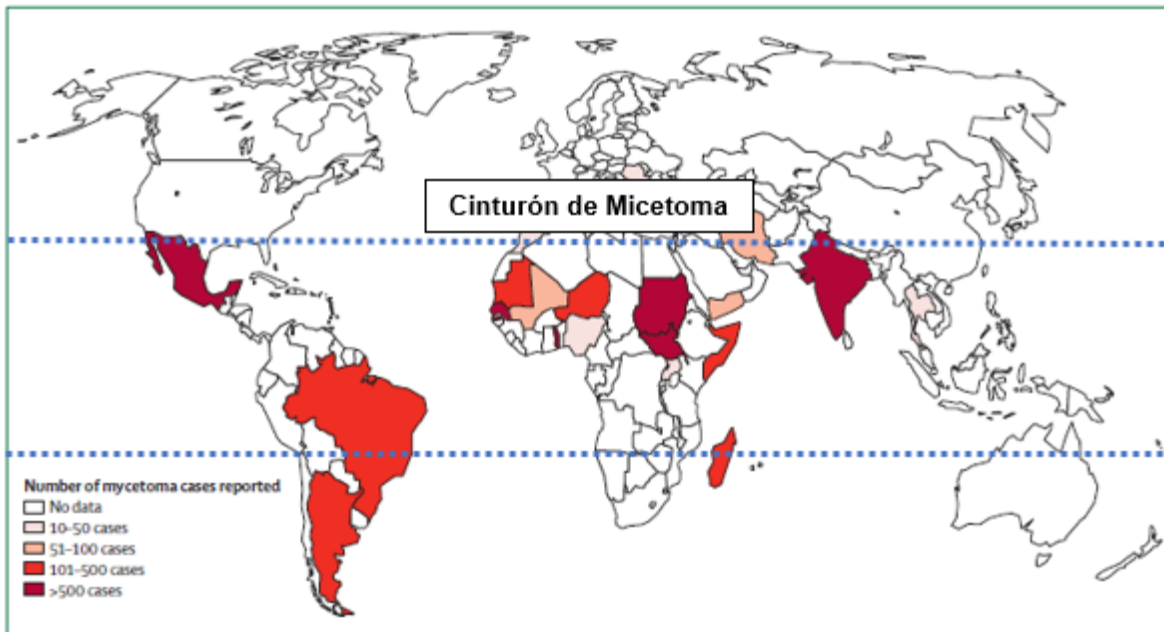


Figura 1. Epidemiología del micetoma. La mayoría de los casos ocurren en el cinturón de micetoma entre las latitudes 15° sur y 30° norte.

El micetoma es endémico en muchos países de los trópicos y subtropicales, aunque la mayoría de los casos se notifican en Sudán, México y la India^{2,7}.

En México, el número de casos registrados no es tan elevado como en los países africanos; sin embargo, es el país latinoamericano que registra el mayor número de casos de Micetoma. En países como Brasil y Venezuela, el número de casos reportados es bajo¹.

1.3 El Micetoma en México

En nuestro país el micetoma es una infección subcutánea crónica de gran importancia, tanto por su frecuencia como por la gravedad de algunos casos. La población más afectada son los habitantes de áreas rurales, quienes por sus actividades laborales tienen un mayor riesgo de sufrir heridas traumáticas sépticas y, en consecuencia, una mayor exposición a los agentes causales, además de tener acceso limitado a los servicios de salud¹.

En un estudio epidemiológico realizado se demuestra que, en relación con la frecuencia por género, la mayoría de las encuestas demuestra que el micetoma afecta con mayor frecuencia al hombre que a la mujer, en una relación aproximada de 4:1; puede afectar a todos los grupos de edad, pero ocurre con mayor frecuencia en hombres jóvenes con edades comprendidas entre 20 y 40 años. Este predominio de hombres sobre mujeres puede relacionarse también con factores laborales, como es el caso de los agricultores, albañiles, mecánicos y cargadores, en quienes se observa la frecuencia más elevada de esta infección, por su cotidiana exposición a los agentes causales a través de heridas traumáticas contaminadas¹.

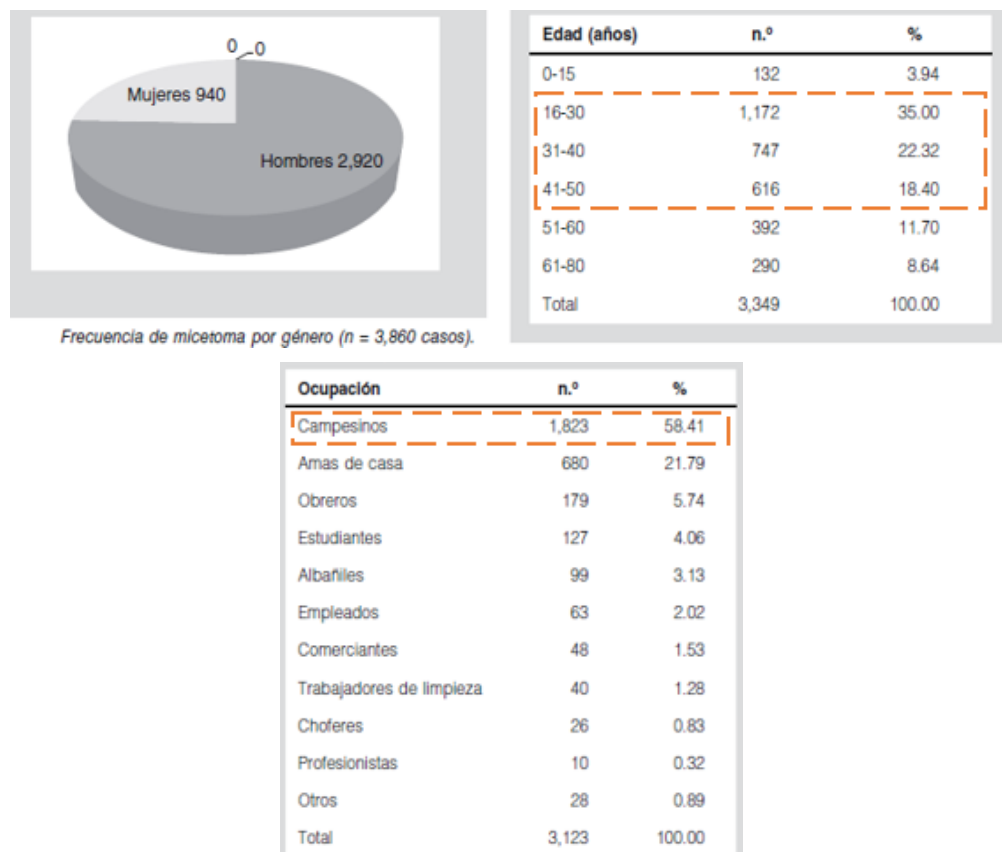


Figura 2. Género, edad y ocupación que más afecta el micetoma. En un estudio epidemiológico se demuestra que el micetoma afecta más a hombres que a mujeres de entre 20-40 años debido al trabajo que ejercen¹.

La distribución geográfica del micetoma en México es muy amplia, ya que en 24 de los 31 estados que forman la República Mexicana se han reportado casos. Las casuísticas más numerosas correspondieron a: Jalisco (676 casos), Morelos (429 casos), Nuevo León (347 casos), Guerrero (302 casos) y Veracruz (264 casos). La distribución geográfica de los micetomas está en relación con el hábitat natural de los agentes causales¹. En general, la mayoría de los casos ocurren en climas áridos y cálidos, que tienen un período corto de lluvias intensas con temperaturas más suaves².



Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos
(1) Jalisco	676	(6) Michoacán	243	(11) Yucatán	94	(16) Edo. de México	44	(21) Colima	13
(2) Morelos	429	(7) San Luis Potosí	229	(12) Hidalgo	67	(17) Coahuila	36	(22) Campeche	9
(3) Nuevo León	347	(8) Oaxaca	172	(13) Tamaulipas	66	(18) Sinaloa	34	(23) Tabasco	6
(4) Guerrero	302	(9) Guanajuato	163	(14) Distrito Federal	49	(19) Nayarit	24	(24) Chiapas	3
(5) Veracruz	264	(10) Puebla	138	(15) Zacatecas	49	(20) Querétaro	14	Sin reportar	462

Figura 3. Distribución del micetoma en México. Los mayores casos de micetoma se presentan en los estados de Jalisco, Morelos, Nuevo León y Guerrero¹.

Considerando los tipos de micetoma, en México predomina el Actinomicetoma (96.52%) sobre el Eumicetoma (3.48%), lo que da una relación de 28 Actinomicetomas por cada Eumicetoma.¹ Los actinomicetos son el principal agente etiológico, ya que representan aproximadamente el 98% de los casos, y *Nocardia brasiliensis* es la responsable del 86% de las infecciones⁴.



Figura 4. Tipo de micetoma y agente etiológico causal. Los casos de actinomycetoma predominan en la República Mexicana, siendo *Nocardia brasiliensis* el principal agente etiológico.

1.4 Taxonomía del género *Nocardia*

El Genero *Nocardia* es un grupo de bacterias de la Familia *Nocardiaceae* que pertenece al Orden de los Actinomycetales. Este grupo de bacterias tienden a formar filamentos y a ramificarse⁸.

Se han descrito más de 30 especies del género *Nocardia*, aunque en la actualidad sólo 11 especies son válidas, las cuales forman hifas extensamente ramificadas que a menudo se fragmentan *in situ* o por disrupción mecánica dando origen a elementos cocoidales o bacilares⁹.

Las bacterias del género *Nocardia* crecen a una temperatura de 37°C en medios convencionales como agar Sabouraud y originan colonias rugosas secas cuyo color varía de blanco al naranja dependiendo de la composición del medio y de las condiciones del cultivo¹⁰.

Las microcolonias del agente etiológico en el tejido se llaman granos o gránulos, cuyo color y morfología es importante porque tanto hongos como bacterias causantes de micetoma producen granos o gránulos de color característico. Por ejemplo, los gránulos blancos son producidos por el complejo *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. caviae*¹¹.

Las *Nocardias* se caracterizan por ser microorganismos Gram positivos, aerobios que en estado temprano de crecimiento muestran células ramificadas y filamentosas¹.

2.1 Modelo experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

En 1999 Salinas Carmona y colaboradores desarrollaron un modelo de actinomicetoma por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c infectados en el cojinete plantar. En este modelo experimental, al inducir el actinomicetoma con el agente causal antes mencionado, se produce inflamación aguda en el sitio de la infección en los primeros 15 días, presentando un pico máximo alrededor de una semana después de la inoculación y posteriormente una disminución de volumen después del día 7, hasta desaparecer la inflamación alrededor del día 15. Después del día 30 en adelante, la inflamación aumenta notablemente, considerando a la infección como establecida (infección crónica). Conforme progresa la infección, el tamaño de la lesión sigue aumentando y con el paso del tiempo provoca deformación tisular, formación de fístulas y secreción de gránulos. Por todo lo anterior, en este modelo experimental, se denomina que la fase aguda de la infección abarca del día 1 al 15, mientras que la fase crónica comienza a partir del día 30 de infección. Los ratones BALB/c infectados reproducen de manera muy similar la enfermedad que se desarrolla en humanos. La gravedad de la lesión comúnmente es clasificada de acuerdo con el tamaño, la presencia de úlceras, abscesos, fístulas y el drenaje de microcolonias o gránulos del agente causal¹².

2.2 Histopatología del Micetoma

Los hallazgos histopatológicos en las lesiones de actinomicetoma humano producidas por *N. brasiliensis* son idénticos a los inducidos en ratones experimentales. La apariencia macroscópica también es muy parecida; 3 a 5 días después de infectar un ratón en el cojinete plantar, se observa una inflamación progresiva, el área afectada continúa su inflamación hasta el día 14, luego se

alcanza un estado estable aparente y dura aproximadamente una semana. Después de un mes de infección, los abscesos son visibles a través de la piel del cojinete plantar, algunos de ellos abiertos que comienzan a descargar granos blancos¹³.

Histológicamente, las lesiones revelan la presencia de una reacción inflamatoria granulomatosa con abscesos que contienen gránulos del organismo infeccioso, los cuales consisten en masas de filamentos incrustados en un material conocido como cemento intercelular⁴.

Durante los primeros cuatro días, el foco inflamatorio está compuesto principalmente por neutrófilos que rodean a las bacterias; después de cuatro días, se forman microabscesos, y el cemento intercelular que consiste en una capa de neutrófilos, rodeados de linfocitos y macrófagos espumosos. El microabsceso está limitado por un borde de células fibroblásticas, fibras de colágeno en una orientación concéntrica y una línea adyacente de mastocitos¹⁴.

Sin importar el agente causal, el cuadro clínico del micetoma es bastante similar; sin embargo, las características histológicas, el tamaño, la forma y el color de los gránulos pueden ser indicativos del agente etiológico⁴.

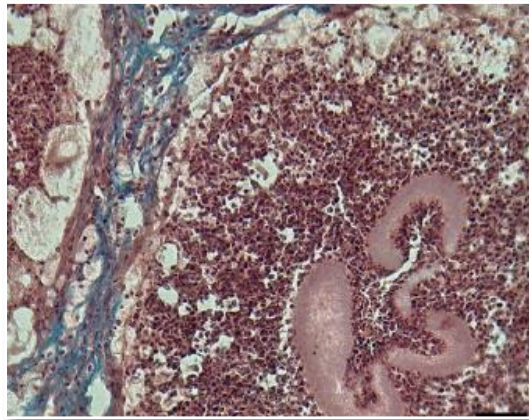


Figura 5. Imágenes de microscopía de tejido infectado con *N. brasiliensis*. Se muestran microabscesos rodeados de fibras de colágeno, en el centro una colonia de la bacteria causal¹⁴.

3.1 Inmunidad Innata en el Micetoma

Aunque muchas personas están expuestas a agentes etiológicos que causan el micetoma, pocas desarrollan la enfermedad. El papel de la inmunidad innata en la resistencia del huésped a los hongos y bacterias que producen micetoma se ha estudiado *in vitro* y en modelos animales, pero pocos estudios se han realizado en seres humanos. La respuesta local del hospedero, caracterizada por la quimiotaxis de neutrófilos y la congestión de pequeños vasos, inicialmente es inespecífica. Posteriormente se observan macrófagos y monocitos presentes en el sitio de la infección. El Interferón C y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) son citocinas que mejoran la actividad microbicida de estas células^{6,10,13}.

3.2 Inmunidad Humoral en la Infección por *Nocardia spp*

Varios estudios en ratones experimentales infectados con *M. tuberculosis*, *L. monocytogenes* o *N. asteroides* han sugerido que la inmunidad humoral no es importante en la protección del huésped¹⁵. Sin embargo, un ensayo reciente con ratones BALB/c inmunocompetentes demostró que los anticuerpos anti-*N. brasiliensis* inducidos por antígenos proteicos purificados previenen el desarrollo de una infección experimental por *N. brasiliensis*. La inmunización activa con 3 antígenos solubles diferentes confirió una protección completa, aunque el efecto protector fue transitorio y no tenía memoria^{16,17}.

La transferencia de anticuerpos IgM anti-*N. brasiliensis* específicos de antígeno purificados a ratones sin tratamiento previo, después de la infección con este microorganismo, produjo un efecto microbicida notable. Por el contrario, los sueros hiperinmunes que contienen un alto título de anticuerpos IgG anti- *N. brasiliensis* no produjeron un efecto protector¹⁶. Este hallazgo inesperado puede explicar el retraso de 5 meses necesario para el desarrollo de lesiones de micetoma después de la infección por *N. brasiliensis* de ratones macho híbridos F1 CBA/N x DBA2. Estos animales tienen un defecto de anticuerpo manifestado por la incapacidad de producir el isotipo de anticuerpo IgG, pero conservan la capacidad de producir

anticuerpos IgM. Los anticuerpos IgM anti- *N. brasiliensis* disminuyen la carga bacteriana inicial, pero después de disminuir el título de IgM, los bacilos restantes se multiplican nuevamente, produciendo las lesiones de micetoma. Sin embargo, se ha demostrado que los anticuerpos tempranos antinocárdicos IgM son efectivos para controlar *N. brasiliensis* en la infección experimental¹⁶⁻¹⁸.

3.3 Inmunidad Celular en la Infección por *Nocardia spp*

La inmunidad adaptativa difiere de la inmunidad innata porque es específica, inducible, transferible y tiene memoria. Los únicos componentes de la inmunidad adaptativa son las células llamadas Linfocitos y sus productos de secreción, como los anticuerpos¹⁹. El papel de las células efectoras de linfocitos B y T en la infección nocardial se ha estudiado en animales. Los ratones desnudos, que son animales atímicos con deficiencia de linfocitos T, son susceptibles a la infección con *N. asteroides* y desarrollan una infección letal a diferencia de sus compañeros de camada (que llevan solo una parte del defecto de las células T) heterocigotos (nude -/+) y presentan una reacción local al desafío con el antígeno *Nocardia*, pero no mueren de una infección sistémica^{20,21}. Esto también se ha observado con *N. brasiliensis* utilizando un modelo de infección en ratas atímicas²².

El papel de los Linfocitos T en la resistencia del huésped a la infección por *Nocardia spp.* está en parte mediada por macrófagos activados por citocinas. Sobre la base de éste y otros hallazgos, se acepta que la respuesta inmunitaria mediada por células es responsable de la protección del huésped en patógenos intracelulares como *L. monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*¹⁵. Utilizando animales experimentales, Deem et al. encontraron que los Linfocitos T pueden matar directamente a *N. asteroides* cuando se obtienen de animales previamente inmunizados. Este efecto fue específico del antígeno porque los microorganismos no relacionados no se vieron afectados y fue necesario el contacto directo entre *N. asteroides* y los Linfocitos T para producir destrucción bacteriana.

Se han encontrado respuestas similares a Th2 (IL-10 e IL-4) en lesiones primarias y en ganglios linfáticos drenantes en la infección por *Streptomyces somaliensis*²³. La infección experimental por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c hace que se desarrolle una lesión después de 30 días con senos, microabscesos y gránulos causados por la expresión de la interleucina 10 (IL-10)²⁴.

3.4 Ambiente Supresor inducido por *Nocardia brasiliensis*

En modelos experimentales de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* se ha demostrado que la estimulación antigénica por la bacteria aumenta la respuesta proliferativa de linfocitos. Estos resultados sugieren que se está produciendo una potente respuesta inmune adquirida durante la infección, sin embargo, los mecanismos orquestados por la respuesta inmune son ineficientes para lograr eliminar la infección²⁵. Publicaciones recientes demuestran que diferentes mecanismos patógenos son útiles para el agente invasor para evadir una respuesta inmune mediada por células para controlar o erradicar la infección.

Los patógenos facultativos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia brasiliensis* y muchos otros adquieren mecanismos efectivos y evasivos que evitan su destrucción y se adaptan para multiplicarse en las células huésped²⁶.

Hoy en día, está ampliamente demostrado que *N. brasiliensis* induce un entorno local inmunosupresor que favorece su supervivencia y enfermedad crónica. La Interleucina-10 (IL-10) es una citocina inmunorreguladora producida por varias células, incluidos macrófagos, células dendríticas y Linfocitos T reguladores (Tregs). Se ha propuesto que la producción de IL-10 podría ser modificada por diferentes patógenos para suprimir la respuesta inmune; este mecanismo, se ha relacionado con la supervivencia de bacterias intracelulares para promover la infección, por ejemplo, se ha asociado con la progresión de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y la susceptibilidad a la infección por *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*²⁷⁻²⁹.

Así mismo, en ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*, se ha observado que la IL-10 está presente en gran cantidad en el tejido infectado durante la fase aguda y crónica de la infección, y que el nivel de esta citocina es mayor en la fase crónica, en comparación con la fase aguda de la misma, de igual manera el nivel de IL-10 se correlaciona con una carga bacteriana alta. El nivel aumentado de esta citocina podría estar asociado con la susceptibilidad a *N. brasiliensis* y su persistencia en la infección crónica en ratones BALB/c¹⁴.

Conjuntamente, en un modelo experimental, en donde se infectó el cojinete plantar de ratones BALB/c con *Nocardia brasiliensis*, se demostró que existe un ambiente inmunosupresor en el tejido infectado; este ambiente está caracterizado por la presencia sostenida de las citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β durante las fases aguda y crónica de la infección, así como por la disminución de la citocina protectora IFN- γ en la fase crónica de la infección. Este ambiente de citocinas demostró que favorece la persistencia del patógeno *Nocardia brasiliensis* en las lesiones desarrolladas en las almohadillas de los ratones infectados²⁴.

4.1 La Respuesta de Linfocitos T CD4+

Los Linfocitos T CD4+ tienen múltiples efectos sobre la respuesta inmune general después de la infección y a menudo son necesarios para obtener respuestas óptimas de los Linfocitos T CD8+. Los Linfocitos T CD4+ ofrecen estas funciones auxiliares de varias maneras. Activan células presentadoras de antígenos profesionales, como las células dendríticas, a través de interacciones de CD40 y su ligando; secretan quimiocinas y citocinas, que guían a los Linfocitos T virgen a los sitios de cebado en los órganos linfoides secundarios y a los Linfocitos T activados a la ubicación de la infección; también producen citocinas de apoyo, como la IL-2 y la IL-21, que pueden actuar directamente sobre los Linfocitos T CD8+ que responden³⁰⁻³². Como consecuencia, cualquier anomalía o pérdida de Linfocitos T CD4+ durante el curso de una infección, que puede ocurrir durante las infecciones por HBV, HCV o LCMV o VIH-1, probablemente afecta a los Linfocitos T CD8+, lo que los hace menos efectivos. La ausencia de Linfocitos T CD4+ durante las

infecciones agudas puede generar Linfocitos T CD8+ con memoria defectuosa, que pueden presentar alteraciones en el recambio homeostático, un repertorio funcional reducido que incluye la pérdida de la producción de IL-2 y la incapacidad de montar respuestas secundarias vigorosas³³.

4.2 La Respuesta de los Linfocitos T CD8+

Los Linfocitos T CD8+ restringidos por el complejo principal de histocompatibilidad I son un componente importante de las respuestas inmunitarias adaptativas a los patógenos intracelulares. Los Linfocitos T CD8+ efectores resuelven las infecciones bacterianas agudas en un lapso de 5 a 7 días al producir citocinas y mediadores citotóxicos^{34,35}. Durante las respuestas inmunes agudas a bacterias como en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, los Linfocitos T CD8+ vírgenes experimentan una rápida proliferación y diferenciación al reconocer su antígeno afín. Al igual que sus "contrapartes innatas", las células NK, los Linfocitos CD8+ "matan" al someterse a la desgranulación y la secreción de mediadores citotóxicos como la perforina y las granzimas³⁶. Esto se asocia con otras características de la respuesta efectora, como la proliferación y producción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α , necesarias para eliminar patógenos y resolver infecciones³⁷.

Tras la eliminación del antígeno, aproximadamente el 90% de los Linfocitos T CD8+ efectores mueren por muerte celular inducida por la activación, mientras que el 10% restante persiste como células de memoria, capaces de sufrir la proliferación homeostática independiente del antígeno y dependiente de IL-7- e IL-15³⁸. Las células T CD8+ de memoria al exponerse nuevamente al antígeno son capaces de montar una respuesta más rápida y efectiva en comparación con las respuestas primarias mediadas primeramente por las células T CD8+ de memoria efectoras altamente citotóxicas y posteriormente las células T de memoria central con alta capacidad proliferativa³⁴.

5.1 Puntos De Control Inmunitarios

El sistema inmunitario de los mamíferos funciona para proteger al hospedero de los desafíos provocados por antígenos extraños, así como a la prevención de la autoinmunidad al limitar el reconocimiento de los antígenos propios. La duración de la actividad del sistema inmunitario del hospedero varía desde respuestas innatas que responden en cuestión de horas a la respuesta adaptativa especializada para reconocer antígenos específicos y resolver infecciones³⁵.

En el cáncer y en infecciones crónicas, los Linfocitos T están expuestos a la estimulación antigénica persistente. Esto da como resultado, la expresión de múltiples receptores inhibidores, también llamados "puntos de control inmunitarios", que desencadenan vías de señalización inmunosupresoras, que van desde el secuestro de los ligandos del correceptor estimulador, la regulación positiva de los genes inhibidores hasta el empleo de dominios de secuencias inhibitorias como los ITIM y los ITSM^{35,39,40}.

Los puntos de control inmunitario son expresados por células inmunitarias. Estos receptores son cruciales para mantener la auto tolerancia y para modular la longitud y magnitud de las respuestas inmunes efectoras en los tejidos periféricos para minimizar el daño colateral del tejido⁴¹. La señalización a través de estos receptores y su expresión sostenida desencadena en las células inmunes efectoras, especialmente en los Linfocitos T, un deterioro de la función: fenómeno llamado agotamiento.

Aunque la expresión individual de receptores inhibidores no es indicativa de agotamiento, la expresión conjunta de múltiples receptores inhibidores es una característica fundamental⁴². Durante la última década, varios estudios han vinculado aún más la expresión de múltiples y diferentes combinaciones de receptores inhibidores (PD1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, CD160, BTLA y 2B4) con el fenómeno del "agotamiento de Linfocitos T" tanto en modelos de ratón como en pacientes, en infecciones crónicas, incluido el VIH, el virus de la hepatitis C, el VEB, la malaria, así como trastornos autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico y en varios tipos de cáncer⁴³⁻⁴⁶. En consecuencia, en estos diversos escenarios

patológicos, estos receptores se han denominado generalmente "marcadores de agotamiento"³⁹.

Es probable que la naturaleza de diferentes infecciones crónicas y cánceres influya en el nivel, la composición y el patrón de los receptores inhibidores expresados por los Linfocitos T que responden³⁵.

Ahora está claro que muchos patógenos promueven interacciones inhibitorias entre las células inmunitarias a través de los receptores del punto de control inmunitario para escapar del control inmunológico⁴⁰.

5.2 Desarrollo del agotamiento de Linfocitos T

Los linfocitos T son componentes principales del sistema inmunitario adaptativo que consiste en Linfocitos T cooperadores CD4+ y Linfocitos T citotóxicos CD8+. Ambos subconjuntos poseen un receptor de células T de reconocimiento de antígeno (TCR) generado por recombinación genética, que promueve la diversidad de respuestas de Linfocitos T⁴⁷. Los Linfocitos T CD4+ y CD8+ provocados en respuesta a la invasión microbiana están sujetas a control inmune para evitar inmunopatología indebida y autoinmunidad⁴⁸. Varios grupos de regulación inmune están implicados, incluidas las células naturales derivadas del timo, T reguladoras inducibles (Treg), y los correceptores inhibidores, como el de muerte celular programada 1 (PD-1) y el antígeno-linfocito T citotóxico (CTLA-4)^{49,50}.

Durante las infecciones agudas los Linfocitos T vírgenes se activan y se diferencian en Linfocitos T efectores en el transcurso de 1 a 2 semanas⁵¹. Tras el pico de expansión efector, la resolución de la inflamación y la eliminación del antígeno, la mayoría de los Linfocitos T activados mueren, pero un subconjunto persiste y se diferencia a Linfocitos T de memoria^{42,52}. Sin embargo, un aspecto clave del desarrollo de los Linfocitos T de memoria funcionales y persistentes es que después de la fase efectora, el desarrollo de la memoria se produce en ausencia de una estimulación continua del antígeno y altos niveles de inflamación persistente⁴².

Por el contrario, durante las infecciones crónicas, que implican una exposición persistente a antígenos y/o inflamación, se desarrollan defectos graves en las respuestas de los Linfocitos T, así mismo el programa de diferenciación de Linfocitos T de memoria está notablemente alterado, todas estas características en conjunto dan paso al fenómeno denominado agotamiento^{50,53}.

El agotamiento de Linfocitos T, generalmente se manifiesta con varios rasgos característicos, en donde estas células experimentan una pérdida progresiva de funciones efectoras, un aumento en la expresión sostenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto al de los Linfocitos T efectoras o de memoria funcionales que culmina con la eliminación de las células afectadas. El agotamiento también se clasifica de acuerdo con el número de receptores inhibidores coexpresados por las células afectadas^{42,54}, y se ha demostrado que los receptores inhibidores como el PD-1 son más indicativos de este estado en comparación con otros⁵⁵. Aunque los receptores inhibidores se expresan de forma transitoria en los Linfocitos T efectoras funcionales durante la activación; la regulación y la expresión más alta y sostenida de receptores inhibidores se consideran el sello distintivo del agotamiento de los Linfocitos T^{35,41}.

Por lo general, cuanto mayor sea el número de receptores inhibidores expresados por los Linfocitos T agotados, más grave será el agotamiento. De hecho, aunque la expresión individual de PD-1 u otros receptores inhibidores no es indicativo de agotamiento, la expresión conjunta de múltiples receptores inhibidores es una característica fundamental^{56,57}.

En estudios recientes se ha demostrado que la coexpresión de TIM-3 y PD-1 en infecciones crónicas causadas por bacterias y virus se asocian con un agotamiento más severo de los Linfocitos T, esto en términos de proliferación y secreción de citocinas efectoras como IFN- γ , TNF- α e IL-2. Curiosamente, los Linfocitos T CD8+ que expresan ambos receptores inhibitorios también producen la citocina supresora IL-10^{58,59}.

Existen investigaciones recientes que han comparado directamente los programas de transcripción de Linfocitos T agotados CD4+ y CD8+ en el modelo del virus de la

coriomeningitis linfocítica (LCMV)⁶⁰. Estos estudios confirman una firma transcripcional central del agotamiento de Linfocitos T común entre CD4+ y CD8+, que incluye algunos factores de transcripción, receptores inhibidores, genes asociados a IFN α / β y vías alteradas como la de proliferación celular. Sin embargo, a pesar de este programa central similar, los Linfocitos T CD4+ agotados eran distintos de los Linfocitos T CD8+ agotados. Por ejemplo, mientras que la expresión de PD-1 era común a ambos linajes, el patrón de expresión de otros receptores inhibitorios era distinto para cada subconjunto^{42,61}.

Una pregunta central en este campo ha sido: ¿Qué causa el agotamiento de los Linfocitos T? El desarrollo del agotamiento de los Linfocitos T probablemente integra información de microambientes inflamatorios y tisulares alterados, otras poblaciones de linfocitos como los Linfocitos B y los Linfocitos T Reguladores (TReg), señales inhibitoras de citocinas y la coestimulación inhibitoria y coestimuladora de la superficie celular receptores⁴².

La aparición del agotamiento de los Linfocitos T depende en gran medida de la exposición persistente a una amplia gama de antígenos y estímulos derivados del patógeno y patrones moleculares asociados al daño⁶². En consecuencia, la naturaleza fenotípica y funcional de los Linfocitos T agotados puede variar de acuerdo con la naturaleza de los antígenos provocadores.

Es importante destacar que los Linfocitos T agotados no son inertes. Estas células retienen subóptimas pero cruciales funciones que limitan la replicación del patógeno en curso o la progresión del tumor. A pesar de este "estancamiento" del patógeno-hospedero mediado por los Linfocitos T agotados, estas células no son efectivas para erradicar patógenos o tumores⁴².

Aunque el agotamiento de los Linfocitos T se describió por primera vez en la infección viral crónica en ratones⁶³, también se ha observado en humanos durante infecciones como el VIH y el virus de la hepatitis C (VHC), infecciones bacterianas crónicas como *Mycobacterium tuberculosis*, así como en el cáncer^{50,64}.

Tabla 1. Diferencias entre un Linfocito T funcional y un Linfocito T agotado. Existen varias características distintivas que debe presentar un Linfocito T para considerarse agotado.

Característica	Linfocito T de Memoria Funcional	Linfocito T Agotado
Potencial Proliferativo	+++	-/+
Producción de Citocinas	+++	-/+
Receptores Inhibitorios	-	+++
Dependencia del Antígeno	-	+
Citotoxicidad	+++	-/+

5.3 Exposición Persistente al Antígeno

Una característica clave para el desarrollo del agotamiento de los Linfocitos T parece ser la exposición crónica y probablemente continua al antígeno en lugar de la exposición aguda o intermitente. Factores adicionales, como la falta de ayuda de otras poblaciones celulares y quizás señales instructivas directamente de receptores inhibitorios, probablemente también contribuyan al agotamiento de los Linfocitos T⁶⁵. Los primeros estudios en el modelo del virus de la coriomeningitis linfocítica crónica (LCMV) demostraron que la gravedad del agotamiento (y, en última instancia, la eliminación de los Linfocitos T específicos de antígeno) se correlacionaba con el nivel de estimulación antigénica⁶⁶. La importancia del nivel de persistencia de antígeno en el agotamiento también se confirmó en otros modelos de ratón y en la infección por VIH-1 en humanos⁶⁷. De hecho, se demostró que solamente la persistencia antigénica en ausencia de inflamación y bloqueando el correceptor PD-1 es suficiente para generar el fenotipo de agotamiento en los Linfocitos T CD8+⁶⁸. Por otro lado, si los Linfocitos T CD8+ se preparan durante la infección con una cepa crónica de LCMV pero se eliminan de la estimulación de antígeno persistente temprano (aproximadamente 1 semana después de la infección), estas células pueden diferenciarse en Linfocitos T de memoria CD8+ completamente funcionales⁶⁹. Sin embargo, si estos Linfocitos T CD8+ se exponen a un antígeno persistente durante 2 a 4 semanas, se establece el agotamiento de

los Linfocitos T y estas células no recuperan la diferenciación normal de memoria simplemente mediante la eliminación de la exposición al antígeno. Estas observaciones son consistentes con la noción de que el tratamiento antiviral temprano de la infección por VIH, y posiblemente en la infección por VHC, en humanos, puede preservar las respuestas funcionales de los Linfocitos T^{70,71}.

Además, la estimulación crónica del antígeno también conduce a la expresión sostenida de PD-1 a través de NFAT citoplasmático 1 (NFATc1). Es probable que PD-1 module aún más el nivel de señalización de TCR y proporcione importante retroalimentación para atenuar la estimulación crónica de antígeno^{72,73}. Por lo tanto, el nivel y la duración de la estimulación por antígeno e infección crónica parecen ser factores clave que conducen al agotamiento de los Linfocitos T y se correlacionan con la gravedad de la disfunción durante la infección crónica⁴².

5.4 PD-1

El receptor de muerte celular programada 1 (PD-1) es un miembro de la superfamilia CD28 que entrega señales negativas tras la interacción con alguno de sus dos ligandos, PD-L1 o PD-L2. Este receptor es crítico para la supresión de la activación de los Linfocitos T y los Linfocitos B, además de que posee funciones inmunorreguladoras en la activación y tolerancia de los Linfocitos T en tejidos periféricos⁷³⁻⁷⁷.

Estudios posteriores muestran que la interacción de PD-1 con PD-L1 y PD-L2 regula la inducción y el mantenimiento de la tolerancia periférica y protege los tejidos del ataque autoinmune. PD-1 y sus ligandos también están involucrados en atenuar la inmunidad infecciosa y la inmunidad tumoral, y facilitar la infección crónica y la progresión tumoral⁷⁷.

PD-1 no se expresa en Linfocitos T en reposo, pero se induce su expresión dentro de las 24 horas posteriores a la estimulación. PD-1 comienza a funcionar después de que los Linfocitos T reconocen su antígeno afín y comienzan el proceso de activación. La activación de PD-1 ocurre después de interactuar con sus ligandos,

para dar como resultado la fosforilación del residuo de tirosina en el inmunoreceptor con motivo de cambio basado en tirosina de PD-1 y recluta la tirosina fosfatasa SHP-2, que desfosforila e inactiva las moléculas efectoras proximales como Syk en los Linfocitos B y Zap70 en los Linfocitos T. El resultado inmediato de la estimulación a través de PD-1 es la inhibición del crecimiento celular y la secreción de citocinas^{73,77}.

La expresión de PD-1 se regula rápidamente al alza con la activación de los Linfocitos T, y puede persistir en niveles moderados en humanos sanos, lo que indica que la expresión sola de PD-1 no es una característica única de Linfocitos T agotados. Sin embargo, durante las infecciones crónicas, la expresión de PD-1 puede ser sustancialmente mayor que la observada en los Linfocitos T efectoros funcionales o de memoria. Durante la infección crónica, la regulación positiva sostenida de PD-1 suele depender del reconocimiento continuo del epítipo, aunque existen ejemplos de expresión residual de PD-1 incluso después de la eliminación de la señalización del antígeno persistente⁷⁸⁻⁸⁰.

La cantidad y la fuente de antígeno determinan la fuerza y la cinética de la activación de los Linfocitos T y, por lo tanto, la cantidad y la cinética de la expresión de PD-1. Por lo tanto, la inhibición dependiente de PD-1 es muy sensible al contexto y, por lo tanto, al antígeno⁷³.

La variación anatómica en la expresión de ligandos PD-1 determina críticamente dónde y cuándo funciona PD-1. Existe una alta expresión de PD-L1 en las células no linfoides, incluidas las células parenquimatosas, las células tumorales y las células infectadas por virus, lo que permite que PD-1 inhiba directamente las funciones efectoras contra las células diana⁷³.

Se ha demostrado que PD-1 se expresa altamente en Linfocitos T agotados durante infecciones como el LCMV, SIV, VIH, VHB y VHC, y que la vía PD-1-PD-L desempeña un papel importante en la regulación del agotamiento de los Linfocitos T durante esta infección. El nivel de expresión de PD-1 por célula es importante para regular el agotamiento de los Linfocitos T durante las infecciones virales crónicas, infecciones bacterianas crónicas y cáncer⁸¹.

En estudios posteriores se ha reportado que, en diferentes infecciones crónicas, el porcentaje de Linfocitos T CD8+ específicos que expresan PD-1 se correlaciona con la carga viral, la disminución de los recuentos de Linfocitos T CD4+, la disminución de la proliferación de los Linfocitos T CD8+ y una capacidad deteriorada para producir citocinas, se correlacionan con el nivel de expresión de PD-1⁸²⁻⁸⁴. Por lo tanto, PD-1 puede servir como un marcador útil en los Linfocitos T CD8+ específicos para indicar el grado de agotamiento de los Linfocitos T y la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos de regulación de PD-1 en los Linfocitos T agotados todavía están pobremente definidos⁷⁷.

5.5 TIM-3

El receptor de Inmunoglobulina de Linfocitos T y dominio de mucina 3 (TIM-3), es un miembro de la superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig), se identificó por primera vez como una molécula expresada específicamente en Linfocitos T cooperadores CD4+ (Th1) secretores de IFN- γ y en Linfocitos T citotóxicos CD8+ (Tc1) tanto en ratones como en humanos. TIM-3 actúa como un regulador negativo de la función celular Th1/Tc1 tras la interacción con su ligando: la lectina de tipo S Galectina-9 (Gal-9). Se ha demostrado que la unión de Gal-9 con TIM-3 en Linfocitos T Th1 induce la muerte celular^{85,86}. Nuevos hallazgos con respecto al papel inhibitorio de TIM-3 han surgido en los últimos años, y ahora está bien establecido que TIM-3 se expresa altamente en los Linfocitos T CD8+ “agotados” o deteriorados en varias infecciones crónicas. TIM-3 generalmente se coexpresa con otros receptores de punto de control en situaciones de agotamiento de Linfocitos T tanto en infecciones crónicas causadas por virus y bacterias^{58,87}, así como en hospederos portadores de tumores, tanto en humanos como en ratones^{77,85,88,89}.

TIM-3 parece jugar un papel regulador negativo crítico en el fenotipo de Linfocito T agotado durante las infecciones virales crónicas. Aquí, se ha observado que los Linfocitos T agotados virus específicos presentan la incapacidad de proliferar y ejercer funciones efectoras como la citotoxicidad y la secreción de citocinas en respuesta a la estimulación antigénica. Este fenotipo se ha observado en

infecciones crónicas causadas por virus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH), el de la hepatitis B (VHB) y el de la hepatitis C (VHC)^{90,91}.

Esta función reguladora negativa también se ha reportado en infecciones por bacterias, como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*; en donde se ha visto que la expresión de TIM-3 se correlaciona directamente con la carga bacteriana y que los Linfocitos T que expresan TIM-3 se acumulan durante la infección crónica, coexpresando otros receptores inhibidores, incluido PD-1, producen menos IL-2 y TNF pero más IL-10 y están funcionalmente agotados^{58,85}.

En apoyo de una posible función coestimuladora, la expresión de TIM-3 durante la infección aguda por LCMV se asocia con una mejor respuesta de Linfocitos T efectores a corto plazo⁸⁸; de igual manera experimentos *in vitro* en la infección causada por *Mycobacterium tuberculosis*, han confirmado que la unión de TIM-3-Ig a la superficie celular con Gal-9 expresada por los macrófagos infectados activa un programa antimicrobiano que restringe la replicación intracelular de la bacteria intracelular⁹². Además, la ausencia de TIM-3 conduce a una señalización defectuosa de Akt/mTOR²³⁹³; sin embargo, en el modelo de agotamiento de Linfocitos T en LCMV crónico, la expresión de TIM-3 fue suficiente para impedir el rescate anti-PD-1 de las respuestas de Linfocitos T, lo que sugiere una diafonía de PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T agotados. Informes recientes respaldan este hallazgo: la estimulación aguda en la infección por LCMV conduce a la regulación positiva de TIM-3 en los Linfocitos T de tipo Th1 persistentes, y estas células también muestran funciones efectoras mejoradas tanto *in vitro* como *in vivo*⁹⁴.

Sin embargo, los mecanismos por los cuales el TCR y otros factores regulan la expresión de TIM-3 durante la estimulación aguda versus la crónica no están bien definidos⁸⁸.

TIM-3 también participa en la inducción de tolerancia periférica. Se ha reportado que el tratamiento de ratones con dosis altas de anti-TIM-3 soluble anula la inducción de tolerancia⁹⁵. Del mismo modo, los ratones deficientes en TIM-3 no pueden desarrollar tolerancia. De hecho, tanto los ratones tratados con anti-TIM-3 como los ratones deficientes en TIM-3 exhiben una mayor proliferación de Linfocitos

T y mayor producción de IL-2 después de la administración en dosis altas de anti-TIM-3 en relación con los controles⁹⁶. Cabe destacar que se ha demostrado que TIM-3 puede regular la autoinmunidad y la aloinmunidad al modular la capacidad de los Linfocitos T reguladores para amortiguar las respuestas inflamatorias⁹⁷.

La expresión de TIM-3 en los Linfocitos T tiene tres funciones principales: (i) disminuir la respuesta de los Linfocitos T efectores CD4+ y CD8+ a través de la inducción de muerte o el agotamiento celular, (ii) mejorar la capacidad de los macrófagos para eliminar los patógenos intracelulares mediante la unión a Gal-9, y (iii) promover la tolerancia periférica mediante su expresión en los Linfocitos T CD4+⁸⁵.

Desde su descubrimiento en los Linfocitos T, hoy en día se sabe que TIM-3 tiene otros ligandos, que se expresa constitutivamente en otros tipos celulares, donde puede funcionar de manera diferente y que puede inducirse en algunas células en condiciones patológicas. En el estado virgen o no inmunizado en ratones, TIM-3 se expresa principalmente en células dendríticas a niveles altos y en un pequeño porcentaje de Linfocitos T efectores/memoria CD4+ y CD8+^{98,99}. Durante la polarización Th1 *in vitro*, la expresión de TIM-3 aumenta gradualmente hasta alcanzar un nivel de expresión estable y alto en células Th1 diferenciadas terminalmente⁷⁷.

Hoy en día una cantidad cada vez mayor de investigaciones respalda un papel importante para el receptor TIM-3 en enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunes en humanos. Colectivamente, estos datos resaltan la importancia de esta vía como objetivo terapéutico en enfermedades humanas⁷⁷.

Se ha visto que TIM-3 funciona de manera diferencial, de una manera dependiente del contexto, integrando diferentes señales extracelulares presentes, activando así distintas vías de señalización para regular la función de los Linfocitos T funcionales y agotados, y ahora se especula que tiene funciones tanto positivas como inhibitorias^{77,88}.

5.6 Coexpresión de PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T

Los Linfocitos T en un estado inactivado y en infecciones agudas regulan la expresión de diferentes receptores inhibidores dependiendo del contexto en el que se encuentren. Esta expresión como se ha estado mencionando a lo largo de este texto, es transitoria en infecciones agudas, y una vez que el patógeno es eliminado, su expresión se anula. Por lo tanto la expresión en mayor cantidad y sostenida de receptores inhibidores se consideran el sello distintivo del agotamiento de los Linfocitos T^{35,41}. Aunque la expresión individual de PD-1 o TIM-3 no es indicativo de agotamiento, la expresión conjunta, es decir la coexpresión de múltiples receptores inhibidores es una característica fundamental^{56,57}.

La coexpresión de los receptores PD-1 y TIM-3 se ha visto ampliamente asociada a un fenotipo de agotamiento en Linfocitos T más severo que en la coexpresión con otros receptores inhibidores como lo son LAG-3, CTLA-4, 2B4 y CD160.

Esta coexpresión se ha reportado en infecciones crónicas virales en humanos y en modelos de ratón, donde se observa el fenotipo de agotamiento en los Linfocitos T CD8+ específicas del virus en la infección crónica por LCMV, VHB, VHC y el virus Friend, donde exhiben un nivel de expresión alto y sostenido de TIM-3 en una gran fracción de Linfocitos T⁴⁴. Estas células coexpresan PD-1 y exhiben una producción de citocinas efectoras deterioradas^{59,85,100}. Curiosamente, un estudio reciente en pacientes con VIH ha demostrado que TIM-3 también está regulado al alza en los Linfocitos T CD8+ "agotados" y que TIM-3 y PD-1 marcan poblaciones distintas de Linfocitos T "agotados"⁹¹. Cabe señalar que TIM-3, junto con PD-1, se asocia con Linfocitos T con agotamiento terminal y que, en algunos casos, anti-TIM-3, junto con el anticuerpo anti-PD-L1, conduce a la restauración de la función citotóxica y reducción del título viral. Así mismo, el bloqueo de las vías TIM-3 y PD-1 restablece la proliferación de Linfocitos T y aumenta la producción de citocinas. Por lo tanto, en las infecciones virales crónicas, las vías TIM-3 y PD-1 parecen afectar el agotamiento de los Linfocitos T⁸⁸.

De igual manera en infecciones crónicas causadas por bacterias, como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, se ha reportado que los Linfocitos T CD4+ y

Linfocitos T CD8⁺ que coexpresan TIM-3⁺ PD-1⁺ también expresan otros receptores inhibidores, incluido Lag-3, producen más citocinas supresoras como IL-10, y menos citocinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α e IL-2, además presentan una tasa menor de proliferación y tienen una firma molecular *in vivo* que se asemeja a los Linfocitos T agotados. Lo más importante es que el bloqueo combinado de los receptores inhibidores TIM-3 y PD-1 *in vivo* mejoró sinérgicamente las respuestas de los Linfocitos T CD8⁺ y el control de carga bacteriana en ratones infectados⁵⁸.

CAPÍTULO 2

Justificación

En el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* se ha demostrado que existe un aumento de Linfocitos T en el sitio de la lesión, sin embargo, la infección no se resuelve; por lo cual es importante analizar la expresión de las moléculas inhibitoras PD-1 y TIM-3 en los Linfocitos T presentes en órganos linfoides y el tejido infectado.

CAPÍTULO 3

Hipótesis

La expresión de TIM-3 y PD-1 en Linfocitos T se relaciona con la persistencia de la infección en el Actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

CAPÍTULO 4

Objetivo general

Identificar la expresión de TIM-3 y PD-1 en Linfocitos T en el Actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* en un modelo experimental.

CAPÍTULO 5

Objetivos específicos

1. Cuantificar la carga bacteriana en el tejido infectado durante las fases aguda y crónica de la infección.
2. Analizar la expresión de los marcadores PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T en ganglio regional y bazo durante las fases aguda y crónica de la infección.
3. Analizar la expresión de los marcadores PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T en tejido infectado durante las fases aguda y crónica infección.

CAPÍTULO 6

Materiales y Métodos

6.1 Animales

Para reproducir el modelo experimental previamente publicado,¹² se utilizaron ratones BALB/c hembras de 12 a 14 semanas de edad, libres de patógenos, mantenidos bajo condiciones BSL2 en el Laboratorio de experimentación animal del departamento de Inmunología. Se les proporcionó alimento comercial LabDiet, la cual contiene una composición bromatológica ideal para alimento de roedores de laboratorio y agua estéril *ad libitum*. La iluminación fue 12/12 controlada automáticamente, de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999. Este proyecto fue aprobado por el Comité de ética y el Comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Jose Eleuterio Gonzalez” de la U.A.N.L. bajo el siguiente número de registro: IN20-00003.

6.2 Cepa Bacteriana

Se utilizó la cepa de referencia *Nocardia brasiliensis* ATCC700358. La cual se cultivó en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 30 mL caldo BHI estéril (121°C por 15 minutos a 15 libras de presión) y se incubó por 72 horas a 37°C (Incubadora Microbiológica J.M. Ortiz, México).

6.3 Suspensión Unicelular Bacteriana

La masa bacteriana obtenida a partir del cultivo de 72 horas se recuperó de los matraces, se colocó en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó a 2,500 rpm durante 15 minutos. Una vez centrifugado se decantó el sobrenadante y la masa bacteriana depositada en el sedimento se lavó con solución salina estéril; se repitió el proceso de centrifugación y lavado 2 veces más. Después de realizar los lavados las bacterias se trituraron y homogenizaron con un Potter-Evelham estéril hasta obtener

una suspensión unicelular. Este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

6.4 Infección Experimental

Para inducir la infección en los ratones, estos fueron anestesiados vía intraperitoneal con 200 µl de una combinación de ketamina 100mg/ml y xilazina 20mg/ml (2 y 0.4 mg respectivamente). El cojinete plantar de los ratones se desinfectó previo a la infección con una torunda empapada en alcohol y se les inoculó intradérmicamente 10^6 UFC de *N. brasiliensis* con ayuda de una jeringa de 1 mL, este procedimiento se realizó en la pata izquierda trasera de cada ratón.

En los días 0, 7, 15, 70, 90 y 120 de la infección se sacrificó a cada grupo de ratones, para posteriormente extraer quirúrgicamente el cojinete plantar, el bazo y el ganglio poplíteo de cada ratón. Se sacrificaron 3 ratones por día de infección mencionados (n=3). Los ratones pertenecientes a el día 0 es el grupo no infectado, ya que a este grupo de animales sólo se les inoculó solución salina estéril (100 µL por cojinete plantar).

Este proyecto fue aprobado por el Comité de ética y el Comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Jose Eleuterio Gonzalez” de la U.A.N.L. bajo el siguiente número de registro: IN20-00003.

6.4.1 Eutanasia

Los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal, con la metodología antes señalada, una vez sedados, fueron sacrificados vía dislocación cervical en los tiempos designados en este protocolo o en caso de que los ratones perdieran más del 20% de su peso. Esto de acuerdo con las lineaciones de la NOM-062-ZOO-199 y con la aprobación por el Comité de ética y el Comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina y Hospital

Universitario “Jose Eleuterio Gonzalez” de la U.A.N.L. bajo el siguiente número de registro: IN20-00003.

6.4.2 Evaluación Clínica

Diariamente los animales se observaron, se pesaron y se midió la lesión presente en el cojinete plantar con ayuda de un vernier. Con las medidas obtenidas de la lesión (ancho x alto x largo) se utilizó la ecuación de la elipse para obtener el volumen de los cojinetes plantares. Igualmente, cada día se evaluó el progreso de la infección de acuerdo con la escala presentada a continuación

Tabla 2. Evaluación clínica de la infección. Esta escala fue utilizada para evaluar diariamente el progreso de la infección en el cojinete plantar.

Edema leve	+
Edema de 7 mm, absceso y ulceración	++
Edema, absceso y secreción de gránulos	+++
Micetoma completo	++++

6.4.3 Obtención de células de bazo y ganglio poplíteo

En los días de infección programados para los sacrificios, el bazo y el ganglio poplíteo izquierdo extraídos se colocaron por separado en una caja Petri que contenía medio RPMI completo con glutamina, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM, 1% aminoácidos no esenciales, 100 U de penicilina/mL, 100 gramos de estreptomycin/mL, posteriormente con ayuda de pinzas de disección estériles sin dientes y con estrías en las caras internas, se maceraron los órganos por separado para obtener una suspensión celular. Este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

Las células obtenidas se recuperaron en tubos cónicos estériles de 15 mL. Cada tubo se centrifugó durante 10 minutos a 1800 rpm, se descartó el sobrenadante y el botón de células se concentró a 1 mL, después se añadió solución de lisis 1X

(NH₄Cl) para eliminar los eritrocitos y se agitó gentilmente el tubo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar cada tubo durante 10 minutos a 1800 rpm, se descartó el sobrenadante y el botón celular restante se lavó en 2 ocasiones más con 10 mL de PBS. Las células se suspendieron en un volumen total de 2 mL. Posteriormente, a partir de cada solución celular se determinó el número total de células por cada bazo y cada ganglio poplíteo extraído con la ayuda de una Cámara de Neubauer.

6.4.4 Obtención de células del cojinete plantar

En los días de infección programados para los sacrificios, cada cojinete plantar extraído se colocó en una caja Petri que contenía medio RPMI completo con glutamina, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM, 1% aminoácidos no esenciales y 100 U de penicilina/mL, 100 gramos de estreptomicina/mL; adicionalmente a cada cojinete se agregó 1 mL de RPMI, al cual previamente se le agregó 0.7 mg de colagenasa XI. Posteriormente se realizó la incubación de estos durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, con ayuda de unas pinzas de disección estériles sin dientes y con estrías en las caras internas, el tejido digerido se maceró para obtener una suspensión celular. Este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

Las células obtenidas se recuperaron en tubos cónicos estériles de 15 mL. Cada tubo se centrifugó durante 10 minutos a 1800 rpm, se descartó el sobrenadante y el botón de células se concentró a 1 mL, después se añadió solución de lisis 1X (NH₄Cl) para eliminar los eritrocitos y se agitó gentilmente el tubo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar cada tubo durante 10 minutos a 1800 rpm, se descartó el sobrenadante y el botón celular restante se lavó en 2 ocasiones más con 10 mL de PBS. Las células se suspendieron en un volumen total de 2 mL. Posteriormente, a partir de cada solución celular se determinó el número total de células por cada cojinete plantar extraído con la ayuda de una Cámara de Neubauer.

6.4.5 Conteo Celular de Linfocitos

Se tomaron 10 μL de cada suspensión celular obtenida y se añadieron a 90 μL de ácido acético (dilución 1:10), una vez homogenizada la suspensión se tomaban 10 μL de esta para posteriormente colocarlos en la Cámara de Neubauer y realizar el conteo celular. Este procedimiento se utilizó con el fin de determinar el número total de células por cada bazo y cada ganglio poplíteo.

6.4.6 Determinación de Carga Bacteriana (Unidades Formadoras De Colonias)

Para cuantificar la carga bacteriana presente en el cojinete plantar a los diferentes días de infección analizados, se tomó una alícuota de 1 mL de las suspensiones celulares obtenidas una vez digerido y macerado el tejido. A partir de esta alícuota se realizaron diluciones seriadas con solución salina estéril (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32); de cada dilución se tomaron 20 μL y se sembraron en una placa de agar BHI utilizando el Método de Miles & Misra. Este método consiste en dividir la placa en 9 áreas iguales, y por cada área, a una altura de 2.5 cm depositar 20 μL de cada dilución a determinar; este procedimiento se realiza por triplicado. Posteriormente se incubaron las placas durante 72 horas a 37°C (Incubadora Microbiológica J.M. Ortiz, México), monitoreando el crecimiento cada 24 horas. Los sectores en donde había más de 20 colonias no mostraron confluencia y fueron utilizados para realizar los conteos de viabilidad. El número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por 0.02 mL de una dilución se obtuvo calculando la media de los contajes para cada dilución en las placas (Cuenta Colonias Quebec Darkfield, Reicjert-Jung).

6.5.1 Citometría De Flujo

Las suspensiones celulares obtenidas a partir del bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar se ajustaron a 10^5 células/mL, posteriormente a cada tubo de citometría se le añadió 1 mL de Buffer bloqueador y se incubó durante 30 minutos a 4°C en completa oscuridad. Después, los tubos se lavaron con 1 mL de PBS para proceder

a incubar las suspensiones celulares con los anticuerpos monoclonales conjugados para determinar la expresión de CD3 (APC-Cy7), CD4 (Pacific Blue), CD8 (FITC), PD-1 (PE) y TIM-3 (APC). Esta última incubación se realizó durante 30 minutos a 4°C en completa oscuridad. Por último, una vez finalizada de la incubación, se lavaron las células con 1 mL de PBS y, posterior a esto, se agregaron 200 µL de PBS y 20 µL de paraformaldehído al 2% para fijar las células.

La adquisición de los datos se realizó en un FACS Canto II y en un LSR Fortesa. Por cada tubo de citometría se adquirieron 10,000 eventos; cada adquisición se realizó por duplicado. Los resultados de la Citometría de flujo fueron analizados utilizando el programa FlowJo.

6.5.2 Anticuerpos Monoclonales Utilizados

Los siguientes anticuerpos monoclonales de superficie de rata anti-ratón conjugados con fluorocromos fueron utilizados en este trabajo:

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo. Se especifican las características de los anticuerpos utilizados para el análisis por citometría de flujo.

<u>Anticuerpos de Superficie</u>				
<u>Anticuerpo</u>	<u>Dilución</u>	<u>Clona</u>	<u>Fluorocromo</u>	<u>Compañía</u>
<u>Anti-CD3</u>	<u>1:50</u>	<u>17A2</u>	<u>APC-Cy7</u>	<u>BD Biosciencias</u>
<u>Anti-CD4</u>	<u>1:1,000</u>	<u>RM4-5</u>	<u>Pacific Blue</u>	<u>BD Biosciencias</u>
<u>Anti-CD8</u>	<u>1:500</u>	<u>53-6.7</u>	<u>FITC</u>	<u>BD Biosciencias</u>
<u>Anti-PD1</u>	<u>1:100</u>	<u>RMP1-30</u>	<u>PE</u>	<u>BD Biosciencias</u>
<u>Anti-TIM3</u>	<u>1:300</u>	<u>8B-2C12</u>	<u>APC</u>	<u>BD Biosciencias</u>

6.5.3 Estrategia de Análisis

Los datos obtenidos a partir de la citometría de flujo fueron analizados con el Software FlowJo 10.4. Para la estrategia de análisis, en cada muestra analizada, al comenzar se eliminaron los dobletes y tripletes celulares creando el gate FSC-A

FSC-H, seleccionando sólo los eventos únicos para un mejor análisis; posteriormente, en base a las características morfológicas de las células, es decir, tamaño y granularidad se creó el gate FSC-A vs SSC-A, seleccionando el cluster de células asociado a los Linfocitos; por último, para establecer el punto de corte de la población negativa, se crearon los gates de las poblaciones de interés a partir de células sin teñir como se describe a continuación: CD3+(APC-Cy7) vs CD4+(Pacific blue) para diferenciar a los Linfocitos T cooperadores y CD3+(APC-Cy7) vs CD8+(FITC) para diferenciar a los Linfocitos T citotóxicos; una vez delimitadas estas dos poblaciones, para cada una se creó el gate PD-1(PE) y TIM-3(APC).

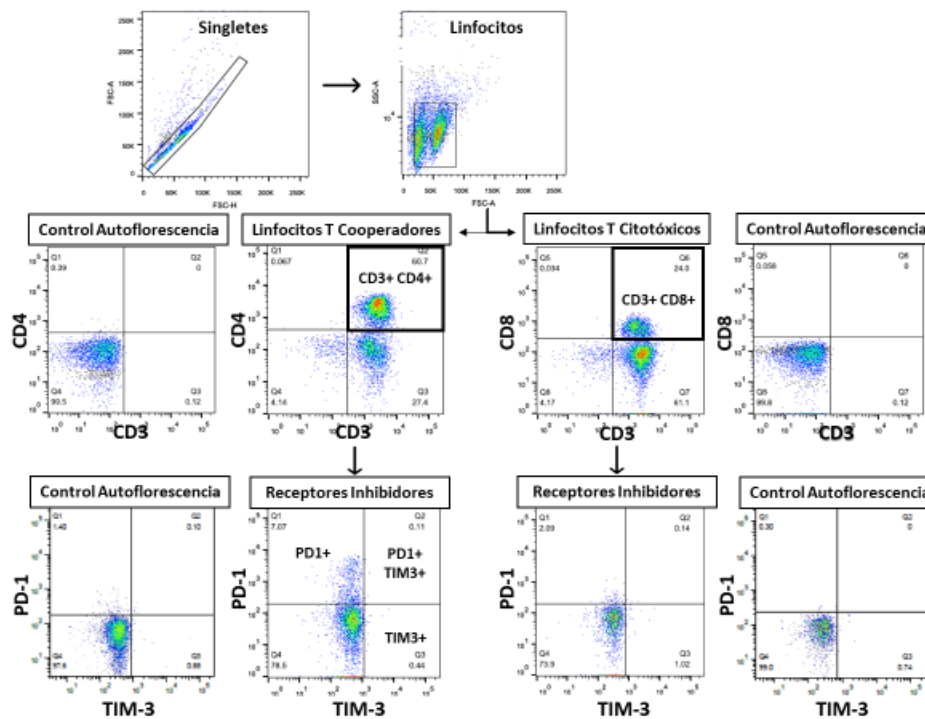


Figura 6. Estrategia de análisis para la citometría de flujo. Se muestran los gates que se utilizaron para determinar cada población linfocitaria y la expresión de los receptores inhibidores PD-1 y TIM-3.

6.6 Análisis Estadístico

Los datos de la carga bacteriana, del volumen del cojinete plantar, la cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ y el análisis de expresión de los receptores inhibidores PD-1 y TIM-3 en cada población linfocitaria del bazo, ganglio

poplíteo y cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección fueron analizados estadísticamente con ayuda del Software GraphPad Prism7.

Se utilizaron las siguientes pruebas estadísticas: prueba de Kruskal-Wallis, ANOVA de una vía, ANOVA de dos vías y Comparación múltiple de Dunnett.

Se consideró un valor de $p < 0.05$ para establecer los resultados como estadísticamente significativos.

CAPÍTULO 7

Resultados

7.1 Cuantificación de la carga bacteriana en el tejido infectado durante las fases aguda y crónica de la infección.

A partir de las suspensiones obtenidas del cojinete plantar se realizó la cuantificación de la carga bacteriana mediante el método de Miles & Misra ¹⁰¹, en los días 7, 15, 70, 90 y 120 de infección.

La infección está determinada por una fase aguda, que abarca el día 7 y el día 15 de ésta; y una fase crónica, que abarca los días 70, 90 y 120 de la misma.

En la fase aguda de la infección, se encontró que la carga bacteriana disminuía conforme progresaba la infección; esto en comparación con el primer día de la infección, donde se inocularon 1×10^6 UFC en el cojinete plantar. En el día 7 se encontró una carga bacteriana de 100×10^2 UFC, mientras que en el día 15 se encontró una carga bacteriana aún menor de 6×10^2 UFC (Figura 7).

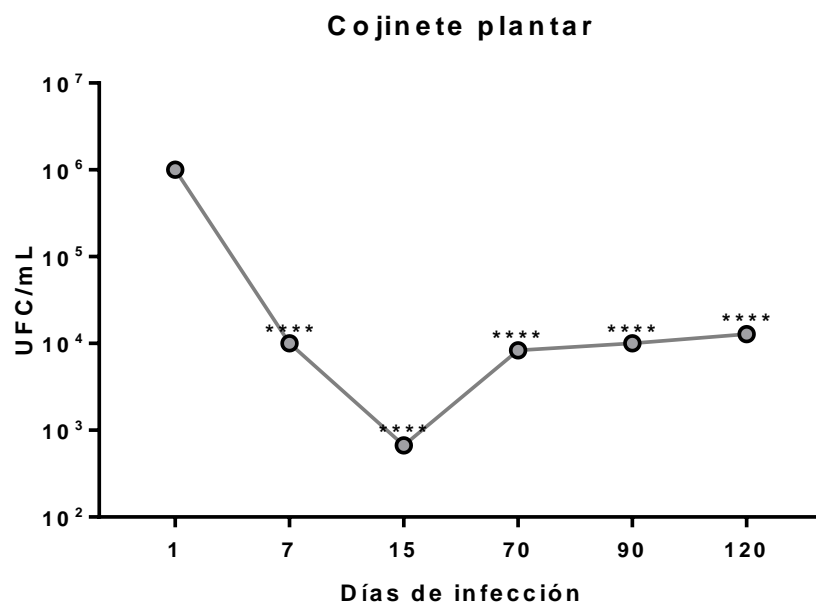


Figura 7. Cuantificación de la carga bacteriana en el cojinete plantar. En los días de infección señalados se cuantificaron las UFC en la fase aguda (días 7 y 15) y fase crónica (días 70, 90 y 120) de la infección utilizando el método de Miles & Misra. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (**** $p=0.0001$)

7.2 Determinación del volumen del tejido inflamado durante las fases aguda y crónica de la infección.

Con la finalidad de determinar el grado de inflamación presente en el tejido infectado, durante el progreso de la infección en las fases aguda y crónica de esta, se utilizó un vernier para medir el cojinete plantar infectado durante los días 7, 15, 70, 90 y 120 de infección, y así, calcular por medio de la ecuación de la elipse el volumen del tejido infectado; de igual manera se midió el cojinete plantar de los ratones no infectados para comparar el aumento de volumen de este tejido.

En la fase aguda de la infección, en el día 7 se puede observar un aumento muy pronunciado de volumen en el tejido infectado, mientras que en el día 15, éste se ve disminuido casi en su totalidad, observando un volumen muy similar al presente en el grupo de ratones no infectados.

Mientras que, en la fase crónica, se puede observar que conforme progresa la infección ya establecida, el volumen del tejido infectado aumenta diariamente. En el día 70 se puede apreciar un aumento de volumen aún mayor que en el día 15, así mismo, este comportamiento se repite en los días 90 y 120. En este tiempo, el volumen del cojinete plantar aumenta dos y hasta tres veces más que el observado en el día 70 (Figura 8).

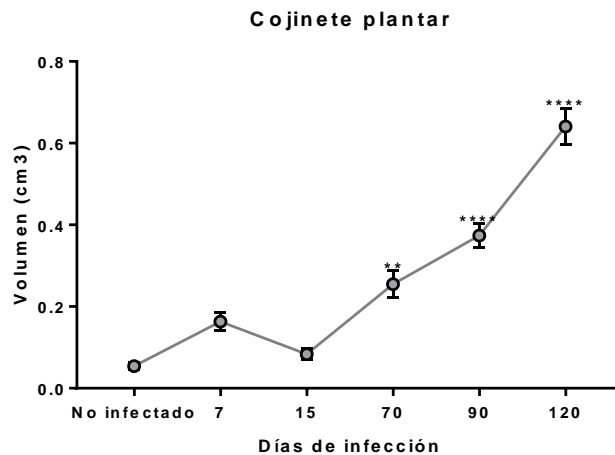


Figura 8. Evolución clínica del tejido infectado. Mediante la ecuación de la elipse se obtuvieron los volúmenes correspondientes a los días de infección señalados durante la fase aguda (día 7 y 15) y fase crónica (día 70, 90 y 120) de la infección. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (** $p=0.001$, *** $p=0.0001$).

7.3 Cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en el bazo durante las fases aguda y crónica de la infección.

Utilizando las suspensiones celulares de los bazos extraídos durante las fases aguda y crónica de la infección, se realizó la tinción de las células con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 para después ser analizadas por citometría de flujo; esto con el fin de cuantificar las poblaciones de Linfocitos T presentes en el órgano mencionado anteriormente.

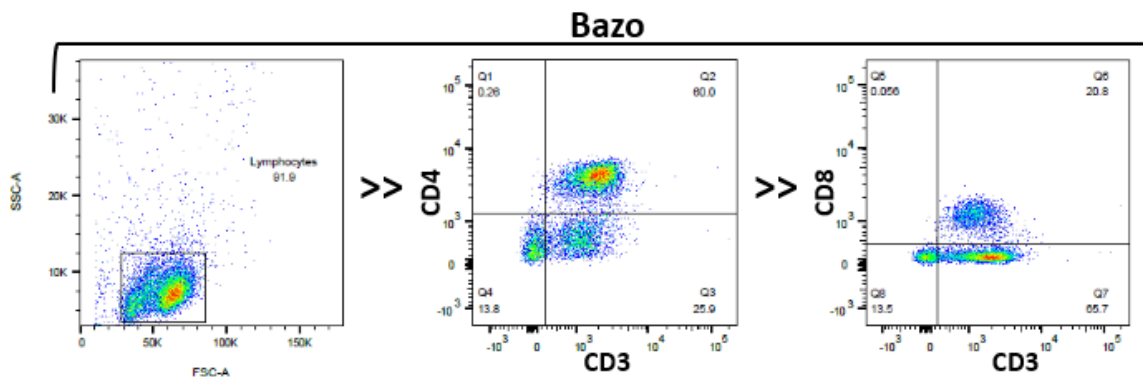


Figura 9. Dot plots representativos de la citometría de flujo en bazo. A partir de los datos adquiridos de las suspensiones celulares de los bazos se realizó la cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T Cooperadores CD4+ y Linfocitos T Citotóxicos CD8+ presentes en este órgano linfoide.

Durante la fase aguda de la infección, el porcentaje de la población de Linfocitos T CD4+ en bazo fue mayor en los ratones no infectados, en comparación con los días 7 y 15; en el día 7 se observó un decremento de alrededor 10% en esta población linfocitaria comparada con ratones no infectados. Cuando este mismo día se comparó con el día 15, se encontró que estas dos poblaciones linfocitarias eran muy similares entre sí; sin embargo, en el día 15 el porcentaje aumentó 5%, aunque no superó el encontrado en ratones no infectados. Al realizar las mismas comparaciones en números absolutos de células conformando la población de Linfocitos T CD4+, se encuentra un comportamiento exactamente igual al observado con los porcentajes (Figura 10).

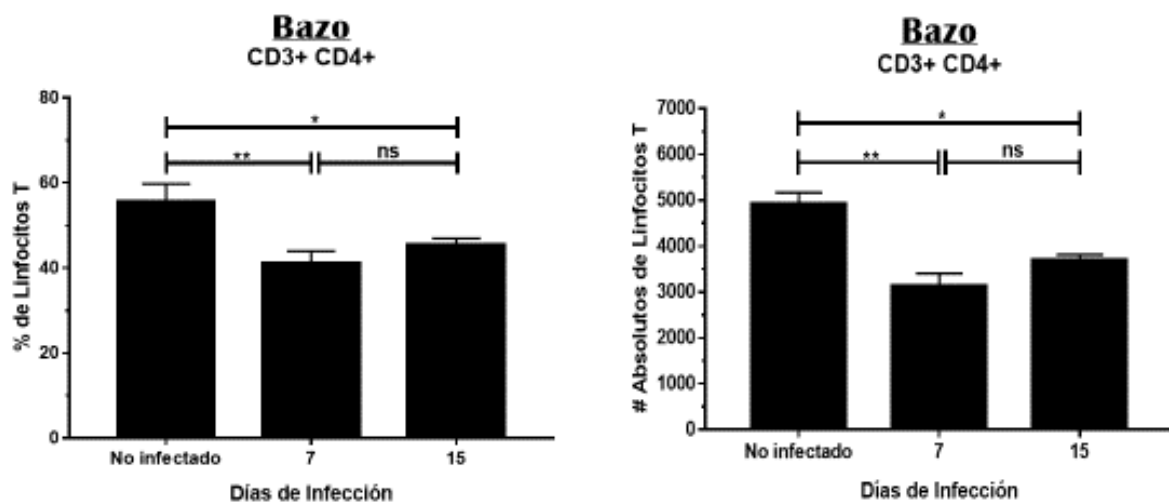


Figura 10. Linfocitos T CD4+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD4+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (* p=0.03, ** p=0.003).

En cuanto a los porcentajes de la población de Linfocitos T CD8+ durante la fase aguda presentes en bazo, estos tuvieron un comportamiento diferente al observado en los Linfocitos T CD4+. En la población de Linfocitos T CD8+, no se encontró diferencia alguna cuando se comparó el porcentaje correspondiente al grupo no infectado, con los porcentajes de los días 7 y 15; sin embargo, se encuentra una diferencia significativa comparando el día 7 y el día 15, dónde se puede observar que en el día 15 existió un incremento del 3% en el porcentaje de Linfocitos T CD8+ en comparación con el día 7. Mientras que comparando los números absolutos se puede observar en las gráficas que, solamente existe diferencia significativa comparando el grupo no infectado con el día 7 de infección, dónde se puede observar en este último día un decremento en el número de células que conforman la población de Linfocitos T CD8+; en lo que respecta al día 15, no existe diferencia alguna cuando se compara con el grupo no infectado o con el día 7 (Figura 11).

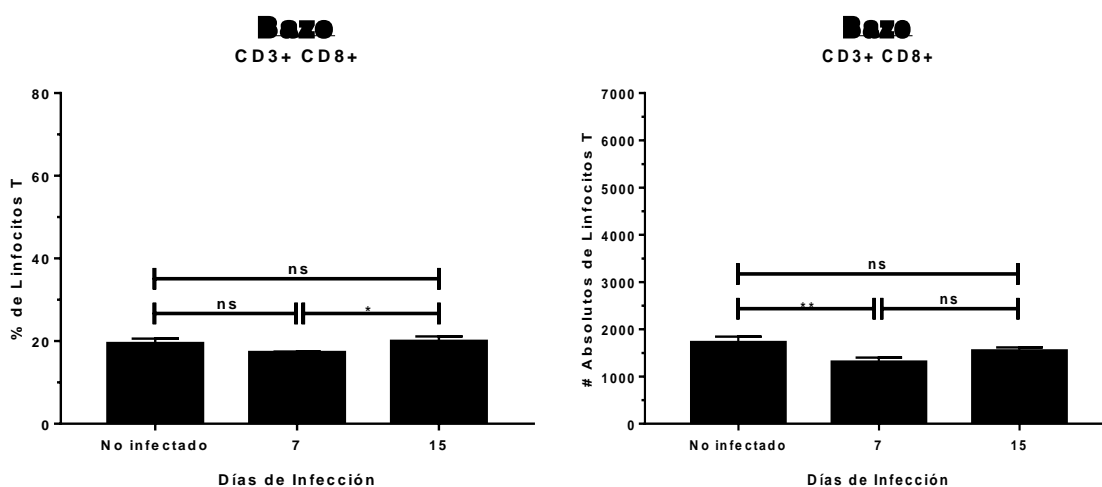


Figura 11. Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD8+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (* p=0.03, ** p=0.003).

En los días que abarcan la fase crónica de la infección, refiriéndose a el comportamiento de los porcentajes de Linfocitos T CD4+ presentes en el bazo, se observó que en los días 70 y 90 los porcentajes de esta población fueron muy similares entre sí, sin embargo, existió un aumento muy pronunciado del 15% de los Linfocitos T CD4+ en el día 120 de infección, en comparación con los días 70 y 90. Observando el comportamiento de esta población linfocitaria en números absolutos, se observó que, no existieron diferencias significativas comparando el día 70 con los días 90 y 120, esto es que no existió gran diferencia entre los números de células que componen a la población de Linfocitos T CD4+. Sin embargo, se observó un aumento de estos números en el día 120 al comparar con el día 70 y el día 90; a pesar de esto, solo se encontró diferencia significativa entre la comparación de los números absolutos del día 90 y el día 120 (Figura 12).

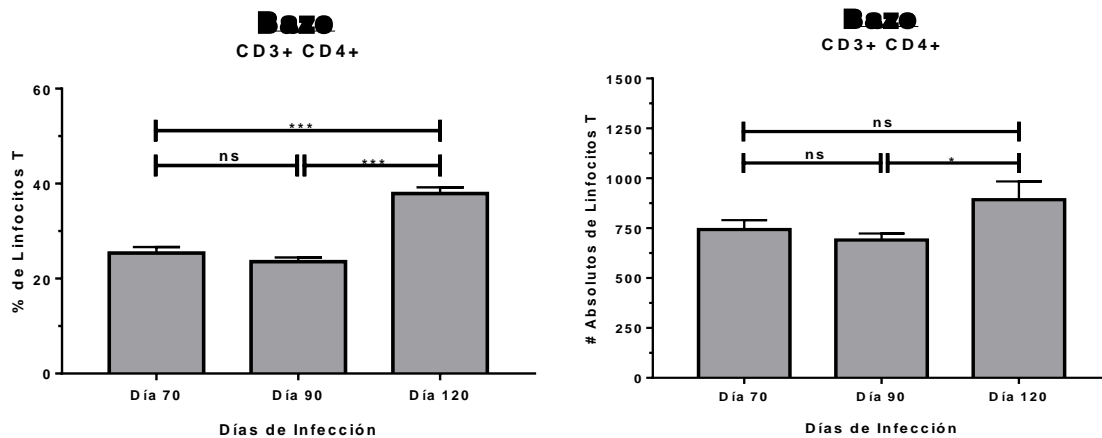


Figura 12. Linfocitos T CD4+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD4+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (* p=0.03, *** p=0.0002).

En la población de los Linfocitos T CD8+ presente en el bazo durante la fase crónica de la infección, se observó gran diferencia entre los porcentajes de esta población durante los tres días estudiados. En el día 70 fue dónde se observó el menor porcentaje de esta población linfocitaria, en comparación con los días 90 y 120. En el día 90, el porcentaje fue mayor que el observado en el día 70 pero menor que el que se encontró en el día 120. En este último día, fue dónde estuvo presente el mayor porcentaje de Linfocitos T CD8+, en comparación con los días 70 y 90. En cuanto a números absolutos, se observó que, en comparación con los porcentajes, dónde se encontraron diferencias visibles y muy marcadas, en las comparaciones entre números absolutos de células presentes en los diferentes días de infección no se encontraron diferencias. Se observó que los números de células que conformaban la población eran muy similares cuando se comparaban entre los tres días de infección (70, 90 y 120), y, por tanto, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en estas últimas comparaciones (Figura 13).

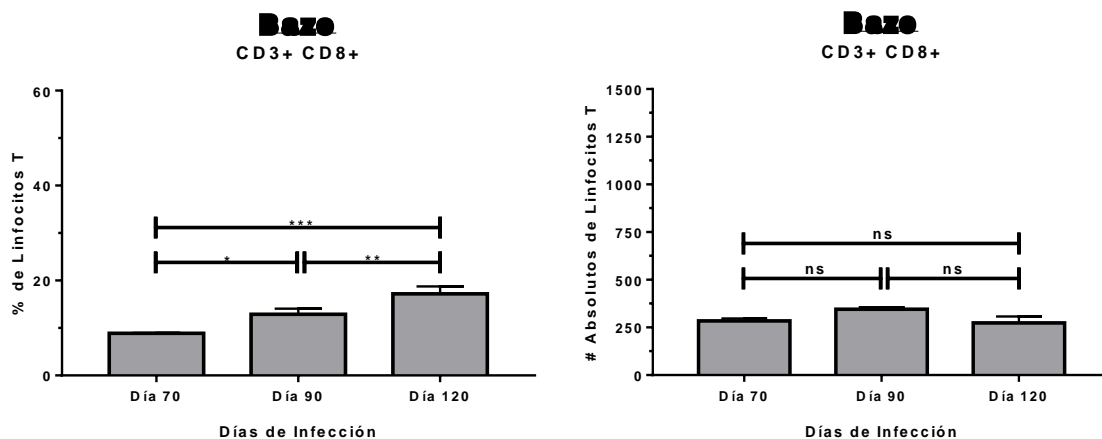


Figura 13. Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD8+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (* $p=0.03$, *** $p=0.0002$).

En todos los días de infección pertenecientes tanto a la fase aguda como a la crónica, así como en los ratones no infectados, se observó que, en el bazo, la población de Linfocitos T CD4+ era mayor que la población de los Linfocitos T CD8+. En cuanto a el análisis individual de estas dos poblaciones a lo largo de los diferentes días de infección, se identificó un comportamiento similar; donde el porcentaje de la población de Linfocitos T CD4+ durante la fase aguda (días 7 y 15) era hasta dos veces mayor que el porcentaje de la población observada en la fase crónica de infección (días 70, 90 y 120). En los ratones no infectados fue donde se encontró el mayor porcentaje de esta población en comparación con la fase aguda y crónica de la infección. Una vez que se hicieron las mismas comparaciones, pero con los números absolutos de las poblaciones presentes en el bazo, se encontró el mismo comportamiento que el observado en los porcentajes. Esto es que, en la fase aguda hay más células presentes conformando la población de Linfocitos T CD4+, en comparación con la fase crónica de la infección, dónde se observó que esta misma población celular estaba conformada por un menor número de células (Figura 14).

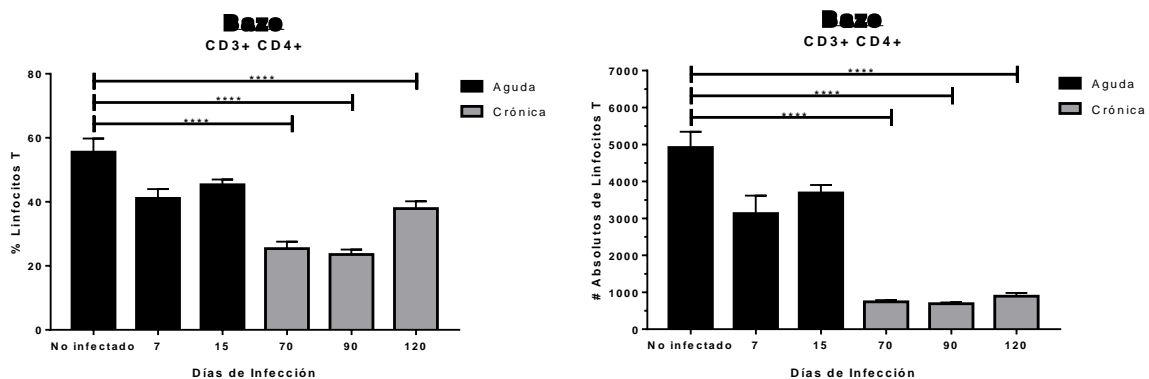


Figura 14. Linfocitos T CD4+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD4+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (**** $p=0.0001$).

De igual manera, en el análisis de la población de Linfocitos T CD8+ a lo largo de los diferentes días de infección, se identificó un comportamiento similar; donde el porcentaje de la población de Linfocitos T CD8+ durante la fase aguda (días 7 y 15) era mayor que el porcentaje observado en la fase crónica de infección en los días 70 y 90, pero cuando se comparó con el día 120, se observó que el porcentaje de esta población era muy similar a la observada en los ratones no infectados; cabe destacar que, en este último grupo de ratones, fue dónde se encontró el mayor porcentaje de Linfocitos T CD8+ en comparación con la fase aguda y crónica de la infección. Una vez que se hicieron las mismas comparaciones, pero utilizando números absolutos de las poblaciones presentes en el bazo, se encontró un comportamiento similar que el observado en los porcentajes, con la excepción de que, utilizando números absolutos, incluso en el día 120 disminuía el número de células que conformaba la población linfocitaria (Figura 15).

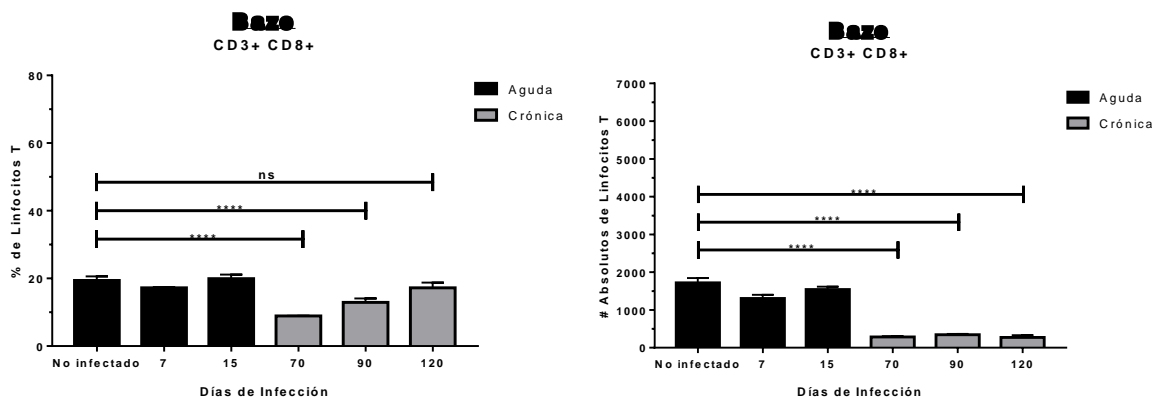


Figura 15. Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD8+ presente en este órgano linfóide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (**** p=0.0001).

7.4 Cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el ganglio poplíteo durante las fases aguda y crónica de la infección.

Utilizando las suspensiones celulares obtenidas a partir de los ganglios poplíteos extraídos durante las fases aguda y crónica de la infección, se realizó la tinción de las células con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 para después ser analizadas por citometría de flujo; esto con el fin de cuantificar las poblaciones de Linfocitos T presentes en el órgano mencionado anteriormente.

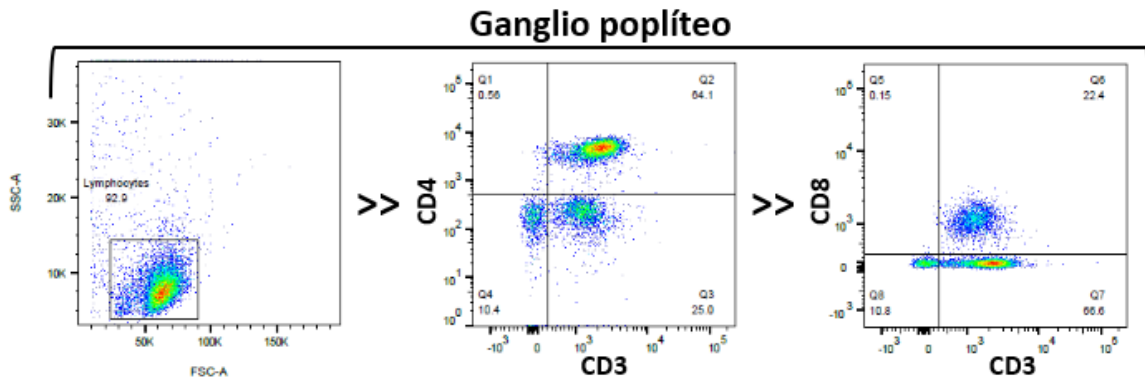


Figura 16. Dot plots representativos de la citometría de flujo en ganglio poplíteo. A partir de los datos adquiridos de las suspensiones celulares de los ganglios poplíteos se realizó la cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T Cooperadores CD4+ y Linfocitos T Citotóxicos CD8+ presentes en este órgano linfoide.

En el ganglio poplíteo durante la fase aguda de la infección, el porcentaje de la población de Linfocitos T CD4+ fue mayor en el grupo no infectado, en comparación con los días 7 y 15; el menor porcentaje de esta población linfocitaria fue observado en el día 7, en comparación con el grupo no infectado y el día 15; sin embargo, se encontró una gran similitud entre los porcentajes de células observados en los días 7 y 15 de infección. En contraste con las comparaciones de los porcentajes en los diferentes días de infección, cuando se compararon los números absolutos de células que conformaban las poblaciones de Linfocitos T CD4+ no se encontró ninguna diferencia entre ellas. Como se puede observar en la figura 17, los números de células que conformaban a esta población celular eran muy similares entre el grupo no infectado, el día 7 y el día 15, por tanto, no se observó ninguna diferencia estadística significativa (Figura 17).

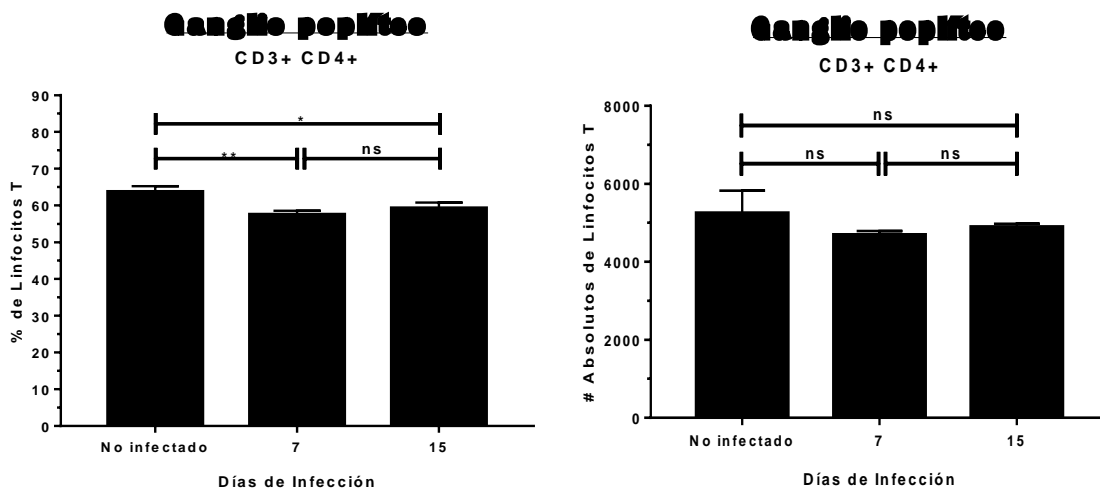


Figura 17. Linfocitos T CD4+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD4+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (% * $p=0.01$, ** $p=0.003$).

Cuando se analizó la población de Linfocitos T CD8+ presente en ganglio poplíteo durante la fase aguda, se observó que el porcentaje más bajo de esta población provenía del grupo no infectado, en comparación con los días 7 y 15; mientras que el porcentaje más alto se encontró en el día 7, comparando con el grupo no infectado y el día 15. En este último día se encontró que el porcentaje de estos linfocitos era un poco más elevado (alrededor de 5%) que en comparación con el grupo no infectado pero menor que el observado el día 7. Utilizando números absolutos para comparar las poblaciones de Linfocitos T CD8+, se encontró el mismo patrón de comportamiento observado con los porcentajes; esto es, el día en donde se observó el mayor número de células que conformaban la población de Linfocitos T CD8+ fue el día 7, en comparación con el grupo no infectado y el día 15; por el contrario, el día donde se encontró menor cantidad de células pertenecientes a la población en cuestión fue el del grupo no infectado, comparando con los días 7 y 15. Por último, la población observada el día 15 en comparación con el grupo no infectado estaba conformada por más células, pero en comparación con el día 7, se encontró menor cantidad en el número de Linfocitos conformando esta población (Figura 18).

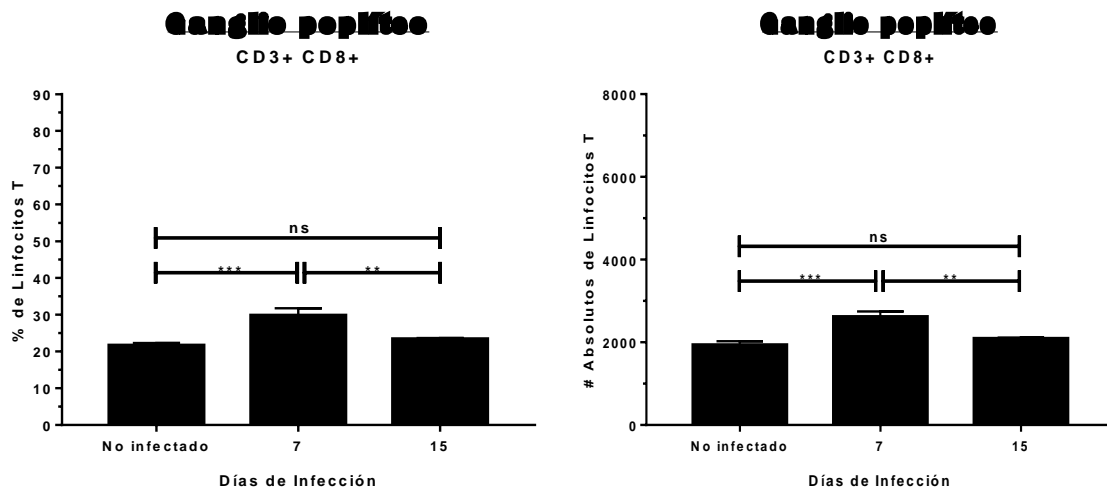


Figura 18. Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD8+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (% ** p=0.001 *** p=0.0004) (# ** p=0.001 *** p=0.0002).

En la fase crónica de la infección, la población de Linfocitos T CD4+ presente en el ganglio poplíteo, sufrió varios cambios durante los diferentes días de infección estudiados. El porcentaje de esta población en el día 70 fue el menor, comparado con los porcentajes de los días 90 y 120; mientras que el mayor porcentaje se encontró en el día 120 de la infección, cuando se comparaba con los días 70 y 90. En este último día mencionado, se observó que el porcentaje perteneciente a este es tres veces mayor que el observado en el día 70, pero ocurre lo contrario cuando se compara con el día 120, donde se encontró que estos dos porcentajes eran muy similares. Con los números absolutos, existe un comportamiento diferente al observado en los porcentajes. Donde se percibió que las poblaciones de Linfocitos T CD8+ de los días 70 y 90 estaban conformados por un número de células muy similar entre sí. Mientras tanto, en el día 120 de la infección, se encontró un mayor número de células que conformaban a esta población linfocitaria, donde se observó un aumento de células de hasta 5 veces, esto en comparación con los días 70 y 90 (Figura 19).

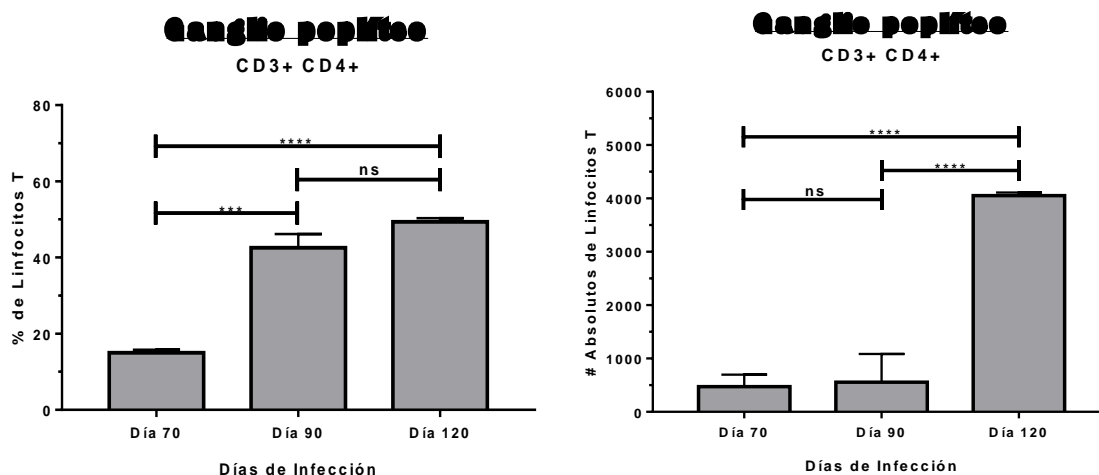


Figura 19. Linfocitos T CD4+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD4+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (% *** $p=0.0003$ **** $p<0.0001$) (# *** $p<0.0001$).

Durante la fase crónica de la infección en el ganglio poplíteo, la diferencia entre los porcentajes de la población de Linfocitos T CD8+ en los diferentes días de infección estudiados fue mayor que la observada en la fase aguda. El porcentaje más pequeño de esta población se observó en el día 70 de la infección, en comparación con los días 90 y 120; mientras que, por el contrario, el mayor porcentaje de Linfocitos T CD8+ se encontró en el día 120, cuando se comparó con el día 70 y el día 90. En este último día el porcentaje de la población linfocitaria fue 15 veces mayor que el observado en el día 70 pero 5 veces menor que en comparación con el día 120. En números absolutos de células pertenecientes a la población de Linfocitos T CD8+, se observó un comportamiento un poco diferente al observado en los porcentajes de esta misma población. En el día 70 y en el día 90, se encontró que los números de células que conformaban la población linfocitaria era muy similar entre sí, no encontrando diferencia estadística significativa entre estos dos días. Por el contrario, en el día 120, existió un incremento muy notable en el número de células que conformaban la población de hasta 5 veces mayor, esto en comparación con los días 70 y 90 (Figura 20).

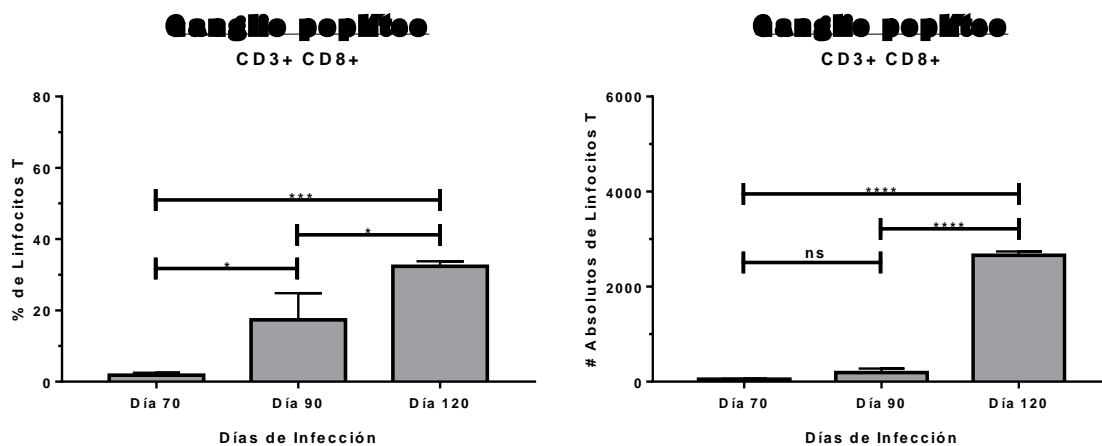


Figura 20. Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD8+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (% * p=0.01 *** p=0.0004) (# **** p<0.0001).

Una vez que se compararon juntas la fase aguda y la fase crónica de la infección, las poblaciones de Linfocitos T CD4+ presentes en el ganglio poplíteo a lo largo de los diferentes días de infección, se observó que en general, los porcentajes de esta población linfocitaria eran mayor en los días de fase aguda (días 7 y 15), en comparación con los días de la fase crónica (días 70, 90 y 120). Entre los días estudiados de las dos fases de la infección, el día que presentó un menor porcentaje de esta población fue el día 70, en este día se observó que el porcentaje de Linfocitos T CD4+ era hasta tres veces menor que en el grupo no infectado, cabe destacar que, en este último, fue donde se encontró el mayor porcentaje de esta población. Una vez analizados estos mismos días, pero con número absolutos de células conformando las poblaciones de Linfocitos T CD4+, se encontró el mismo comportamiento, en cuanto a que, en la fase aguda se observó mayor número de células en comparación con la fase crónica. A pesar de este patrón de comportamiento, se presentó un menor número de células, muy similar entre sí, en los días 70 y 90; mientras que en el día 120 la diferencia entre el número de células conformando la población se hizo menos evidente en comparación con el grupo no infectado y la fase aguda de la infección (Figura 21).

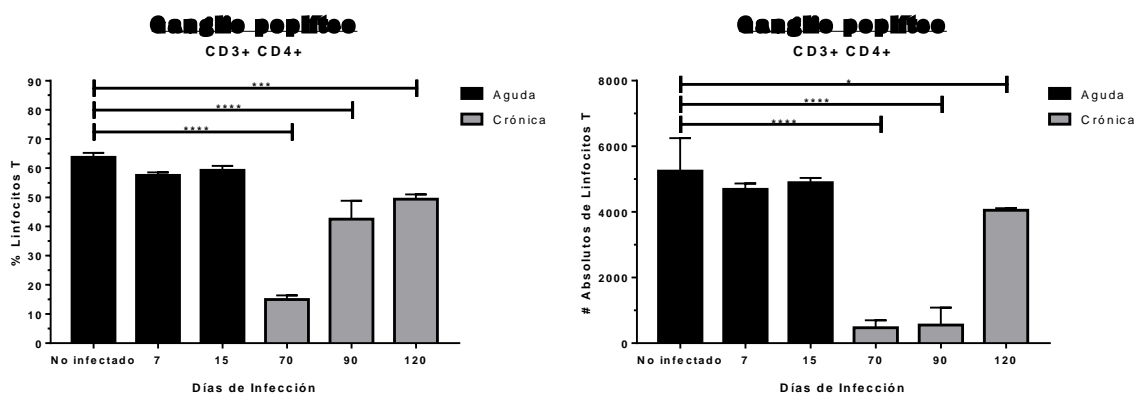


Figura 21. Linfocitos T CD4+ presentes en el ganglio poplíteo en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD4+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (% *** p=0.003, **** p=0.0001) (# * p=0.03, **** p<0.0001).

En cuanto a la población de Linfocitos T CD8+ durante las fases aguda y crónica de la infección, se apreció que en general, los valores eran menores en comparación con la población de Linfocitos T CD4+. En los días estudiados se encontró un porcentaje relativamente constante durante los días de fase aguda. En los días de fase crónica, hubo un descenso del 20% en el día 70, en comparación con los días 7 y 15; mientras que en el día 90, el porcentaje se elevó en un 15% en comparación con el día 70, hasta alcanzar un valor similar al observado en el grupo no infectado; y en el día 120 se observó un incremento que en los días 7, 15, 70, 90, y en el grupo no infectado. Se observó que en el día 70 fue donde había menor porcentaje de Linfocitos T CD8+. Por el contrario, dentro de las dos fases de infección, el mayor porcentaje de esta población linfocitaria se encontró en el día 120. Al analizar los números absolutos de células pertenecientes a la población de Linfocitos T CD8+, se encontró un comportamiento similar al observado en los porcentajes durante las fases aguda y crónica. En los días 7 y 15, así como en el grupo no infectado, se presenció un número de células relativamente constante; mientras que en los días 70 y 90 el número de células conformando estas poblaciones era muy similar entre sí. Por último, en el día 120 se encontró que la población de Linfocitos T CD8+ estaba conformada por un mayor número de células en comparación con todos los días de infección restantes (7, 15, 90 y 120) y el grupo no infectado (Figura 22).

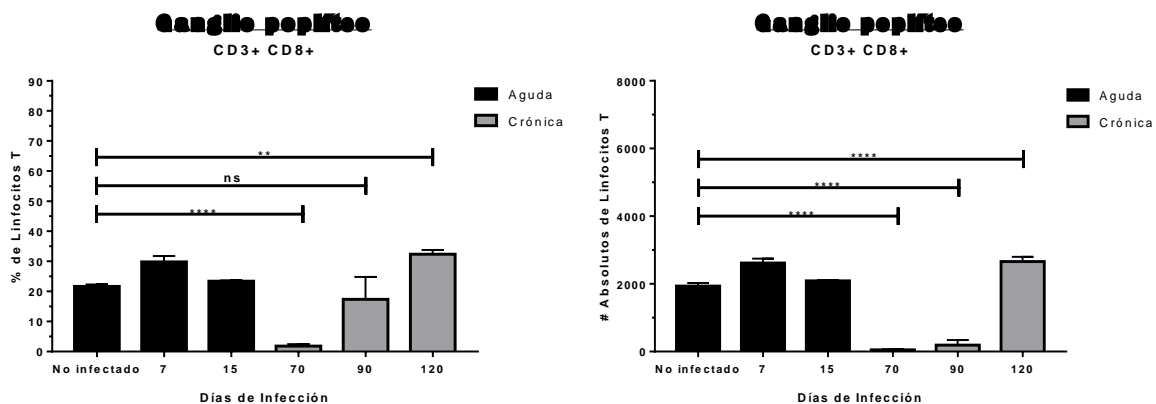


Figura 22. Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD8+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (% ** $p=0.006$, **** $p=0.0001$) (# **** $p<0.0001$).

7.5 Cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el cojinete plantar durante las fases aguda y crónica de la infección.

Utilizando las suspensiones celulares obtenidas a partir de los cojinetes plantares extraídos durante las fases aguda y crónica de la infección, se realizó la tinción de las células con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 para después ser analizadas por citometría de flujo; esto con el fin de cuantificar las poblaciones de Linfocitos T presentes en el órgano mencionado anteriormente.

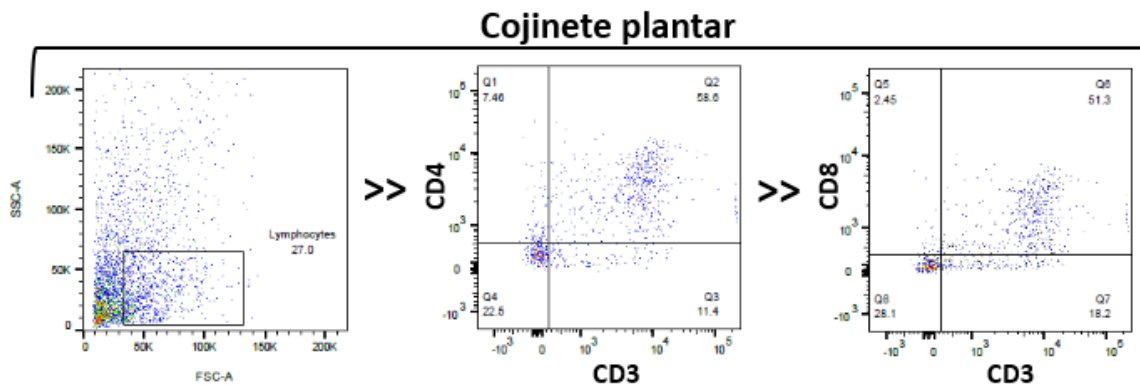


Figura 23. Dot plots representativos de la citometría de flujo en cojinete plantar. A partir de los datos adquiridos de las suspensiones celulares de los cojinetes plantares se realizó la cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T Cooperadores CD4+ y Linfocitos T Citotóxicos CD8+ presentes en este órgano linfoide.

Durante la fase aguda de la infección en el cojinete plantar, se observó un comportamiento totalmente diferente al encontrado en el bazo y en el ganglio poplíteo. Con respecto a los porcentajes de la población de Linfocitos T CD4+ en los diferentes días de infección, se observó que en los días 7 y 15 había un incremento del 20% con respecto al grupo no infectado; en este último grupo esta población linfocitaria estaba casi completamente ausente. Cabe destacar, que los porcentajes observados en los días 7 y 15 eran muy similares entre sí. Una vez realizadas las mismas comparaciones, pero utilizando números absolutos de células que conformaban a las poblaciones de Linfocitos T CD4+, se observó que al igual que en lo encontrado en los porcentajes, esta población celular estaba casi ausente en el grupo no infectado. Por otro lado, en comparación con este último grupo, en el día 7 de infección se encontró un incremento en las células que conformaban la población linfocitaria, sin embargo, era menor el número de Linfocitos T que en el día 15. En este día, al igual que en los porcentajes, fue donde se encontró un mayor número de células conformando la población celular (Figura 24).

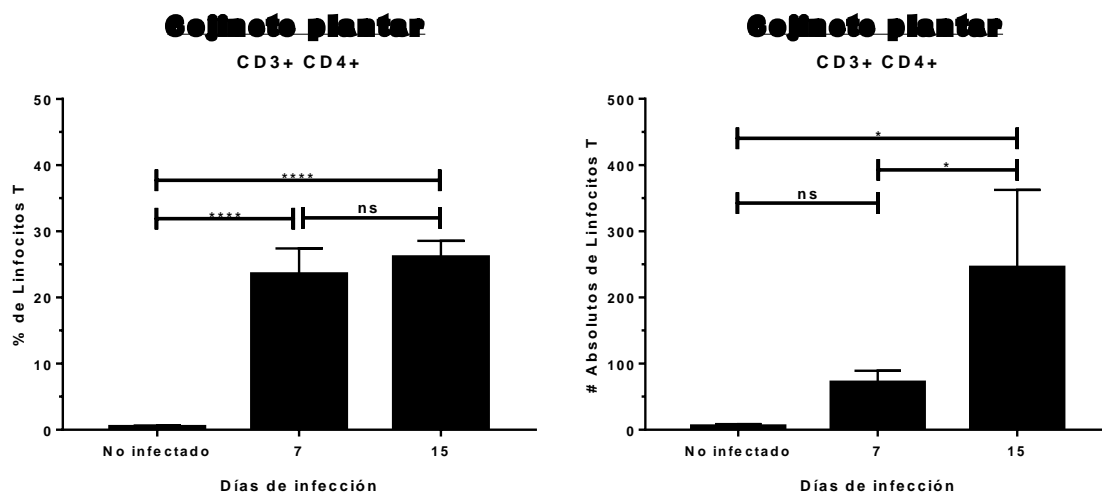


Figura 24. Linfocitos T CD4+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD4+ presente en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (% **** p<0.0001) (# * p=0.01, * p=0.04).

Con respecto a la población de Linfocitos T CD8+ durante la fase aguda de la infección, se apreció un comportamiento muy similar al observado en la población de Linfocitos T CD4+. En el grupo no infectado la presencia de Linfocitos T CD8+ era prácticamente ausente, en comparación con los días 7 y 15 de infección. Específicamente en el día 7 había un aumento del 5% comparando con el grupo no infectado, pero este era menor que el observado en el día 15. En este último día fue donde se encontró el mayor porcentaje de población linfocitaria. Hablando de estas mismas comparaciones, pero utilizando los números absolutos de células conformando las poblaciones de Linfocitos T CD8+, se observó el mismo patrón de comportamiento observado con los porcentajes de estas células. En el grupo no infectado, los números de células eran muy bajos en comparación con los días 7 y 15. En el día 7 aunque se observó un incremento en los números absolutos, no fue suficiente para ser estadísticamente significativo; por el contrario, en el día 15 de infección había un gran aumento en el número de células en comparación con el día 7 y el grupo no infectado (Figura 25).

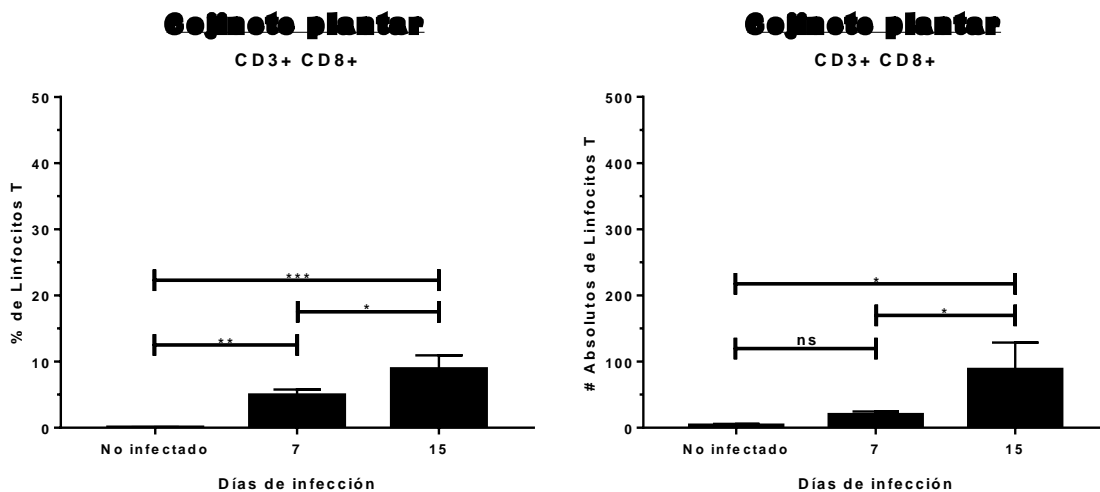


Figura 25. Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD8+ presente en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (% * p=0.02, ** p=0.008, *** p=0.0004) (# * p=0.01, * p=0.02).

Al realizar el estudio de la fase crónica de la infección, en lo que respecta a la población de Linfocitos T CD4+, se observó que en el porcentaje del día 90 fue mayor en comparación con los días 70 y 120; por el contrario, en el día 120 se observó el menor porcentaje de esta población comparando con los días restantes. El día 70 presentó menor porcentaje de Linfocitos T CD8+ que el día 90, pero era mayor que el observado en el día 120. A pesar de todas estas diferencias antes mencionadas, no se encontró diferencia estadística significativa en ninguno de los días pertenecientes a esta fase de infección. Al realizar estas mismas comparaciones utilizando números absolutos de células pertenecientes a la población de Linfocitos T CD8+, se observó que en los días 70 y 90 estaba presentes un número muy similar de células conformando a esta población linfocitaria. Por otro lado, en el día 90, al contrario que lo encontrado en los porcentajes, se observó que en este día era donde los números de células eran mucho menores que en comparación con los días 70 y 120. Cabe destacar que al igual que en los porcentajes, tampoco se encontró diferencia estadística significativa alguna (Figura 26).

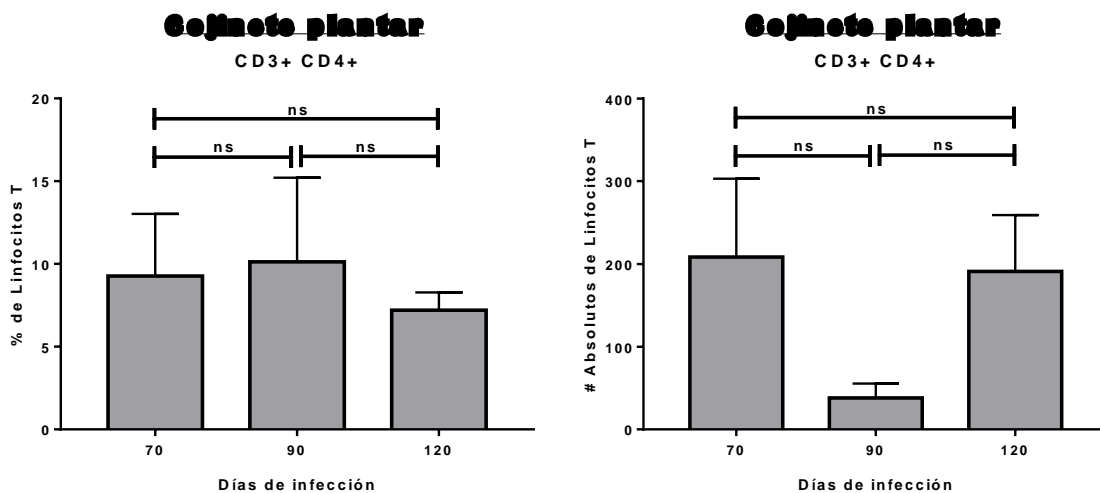


Figura 26. Linfocitos T CD4+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD4+ presente en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

En la población de Linfocitos T CD8+ durante la fase crónica, se observó un patrón de comportamiento muy similar al observado en los Linfocitos T CD4+. En los días 70 y 90 se observaron porcentajes muy similares entre sí, a estos tiempos se presentó un porcentaje mayor en comparación con el día 120. En el día 90 se observó el mayor porcentaje comparado con los días 70 y 120. En el día 70 el porcentaje fue mayor que en el día 120 pero menor que el observado en el día 90. A pesar de encontrar diferencias marcadas entre los porcentajes de los diferentes días de infección, estas diferencias no arrojaron resultados estadísticos significativos. Una vez que se realizaron estas mismas comparaciones, utilizando números absolutos de células conformando la población de Linfocitos T CD8+, se observaron diferencias en el patrón de comportamiento. El día 90 fue el día en donde se obtuvo el menor número de células conformando la población, en comparación con los días 70 y 120. Por el contrario, en el día 70 fue en el que se encontró el mayor número de células en la población linfocitaria. En el día 120 se observaron números absolutos más elevados que en el día 90 pero menores que los del día 70. Al igual que en lo observado con los porcentajes de Linfocitos T CD8+, no se encontraron diferencias estadísticas significativas (Figura 27).

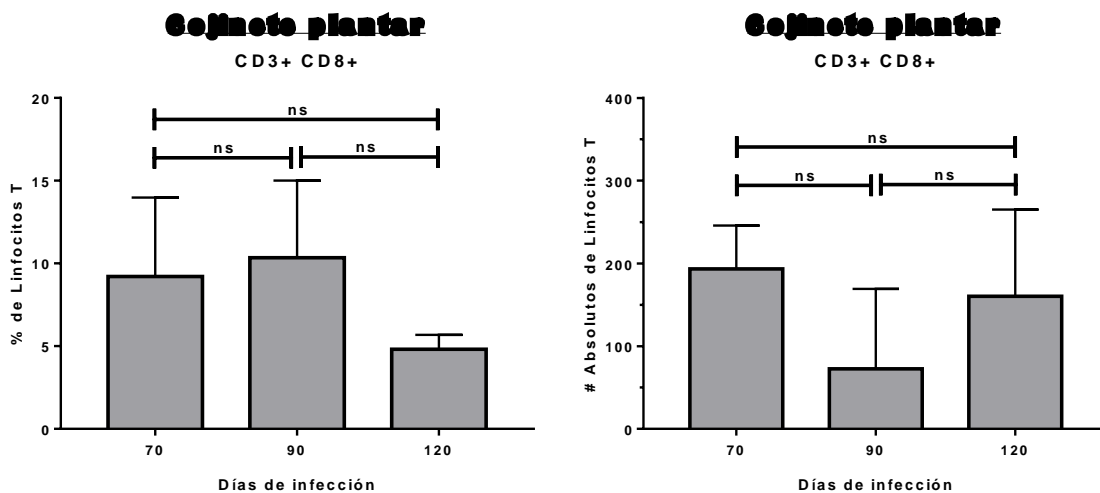


Figura 27. Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD8+ presente en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

Comparando las fases aguda y crónica de la infección, en general se encontró que los porcentajes de la población de Linfocitos T CD4+ eran mayores que los de la población de Linfocitos T CD8+; patrón de comportamiento observado anteriormente en el bazo y en el ganglio poplíteo. En lo que respecta a la población de Linfocitos T CD4+, se observó que, en la fase aguda de la infección los porcentajes eran mayores en comparación con los días de fase crónica. El porcentaje menor de esta población celular se encontró en el grupo no infectado, en comparación con los días de fase aguda (día 7 y 15) y los de fase crónica (70, 90 y 120). Observando el comportamiento de la población de Linfocitos T CD4+ en números absolutos, se encontró un patrón de comportamiento diferente; donde los días 15, 70 y 120 compartían números absolutos de células muy similares entre sí. Al igual que en los porcentajes, el grupo no infectado fue el que presentó menor número de Linfocitos T CD4+ en comparación con los días 7, 15, 70, 90 y 120. De igual manera, entre las dos fases, en donde se encontró mayor cantidad de células fue el día 15 perteneciente a la fase aguda (Figura 28).

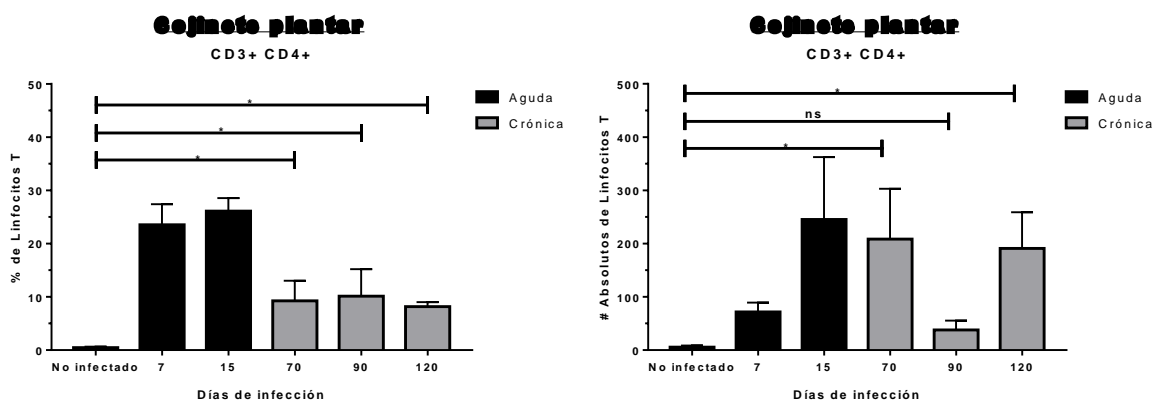


Figura 28. Linfocitos T CD4+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD4+ presente en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (% * p=0.02, * p=0.01, * p=0.04) (# * p=0.01, * p=0.02).

Durante las fases aguda y crónica de la infección, refiriéndonos a la población de Linfocitos T CD8+ se encontró que, conforme progresaba la infección, estos porcentajes iban aumentando gradualmente, con excepción del día 120, donde se observó que el porcentaje era incluso menor que el del día 7. El grupo no infectado, al igual que lo encontrado en los Linfocitos T CD4+, fue el que presentó el menor porcentaje en comparación con los días de fase aguda y fase crónica. Dentro de estas fases, se observó que, en los días 70 y 90 fueron los que presentaron mayores porcentajes. Por el contrario, en los días que se obtuvo el menor porcentaje fueron los días 7 y 120. Analizando esta misma población celular, pero utilizando números de células presentes en esta, se observó claramente que la fase aguda presentaba menores números de células conformando a la población linfocitaria en comparación con la fase crónica. Cabe destacar que, el grupo no infectado fue en donde se observó que los Linfocitos T estaban casi ausentes. Dentro de la fase crónica, los días 70 y 120 fueron los que obtuvieron mayores números de Linfocitos T CD8+ en comparación con los días 7, 15, 90 y el grupo no infectado. Cabe destacar que, tanto en porcentajes como en números absolutos, esta población linfocitaria siempre fue mayor en la fase crónica (Figura 29).

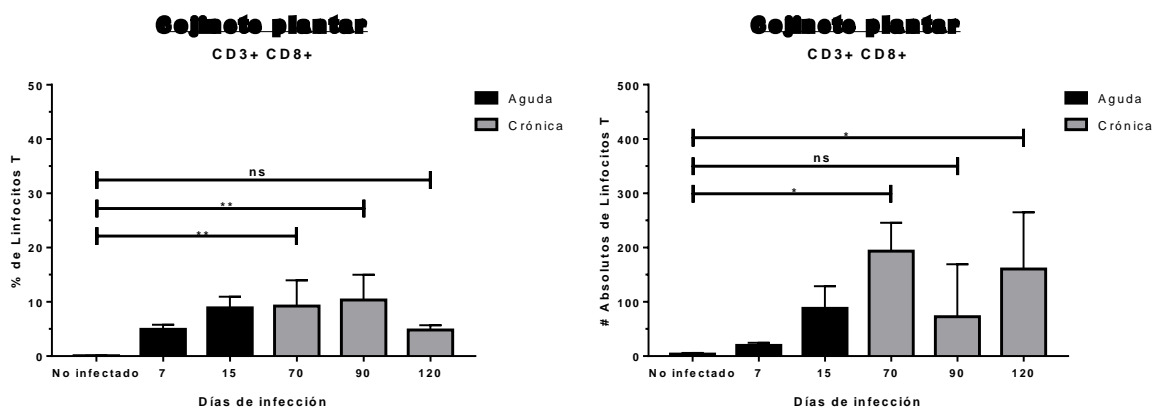


Figura 29. Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la población de Linfocitos T CD8+ presente en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (% ** p=0.008, ** p=0.003) (# * p=0.01, * p=0.04).

7.6 Cuantificación de la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el bazo durante las fases aguda y crónica de la Infección.

Utilizando las suspensiones celulares obtenidas a partir de los bazos extraídos durante las fases aguda y crónica de la infección, se realizó la tinción de las células con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-PD1 y anti-TIM3 para después ser analizadas por citometría de flujo; esto con el fin de cuantificar las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el órgano mencionado anteriormente y posteriormente, analizar la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en estas poblaciones celulares.

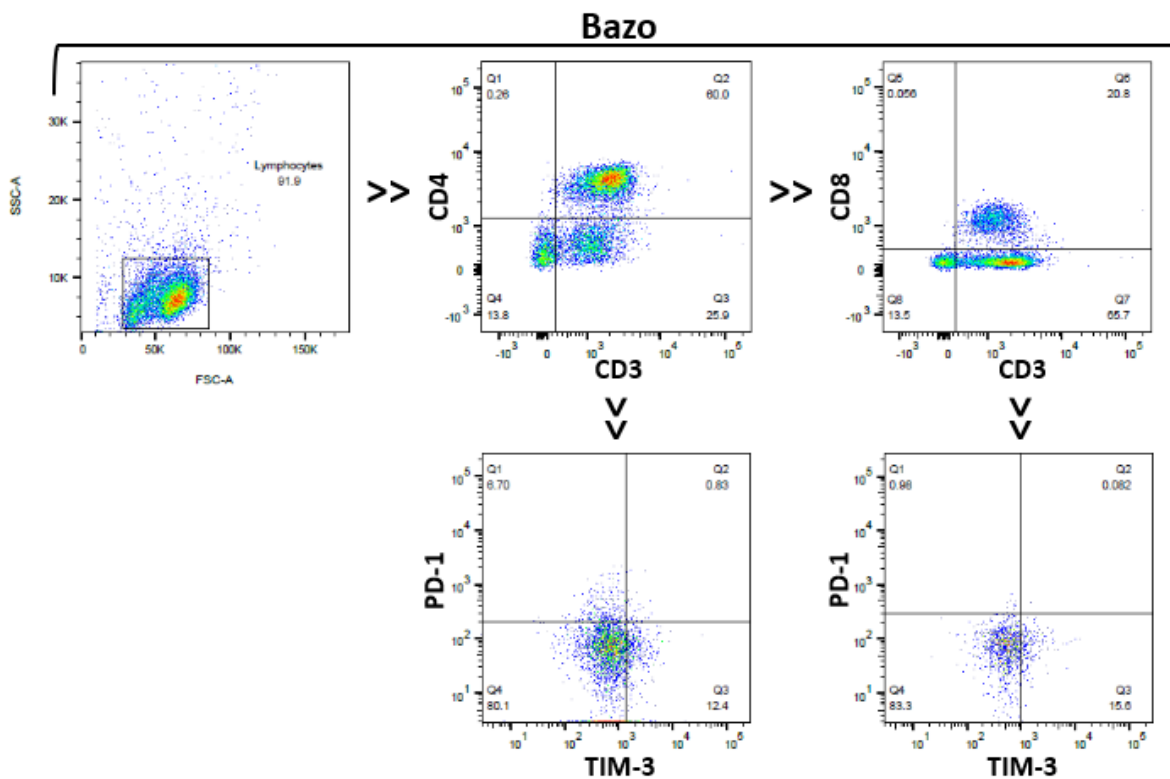


Figura 30. Dot plots representativos de la citometría de flujo en bazo para el análisis de PD-1 y TIM-3. A partir de los datos adquiridos de las suspensiones celulares de los bazos se realizó la cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T Cooperadores CD4+ y Linfocitos T Citotóxicos CD8+ presentes en este órgano linfoide, posteriormente se analizó la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 dentro de estas poblaciones linfocitarias.

Durante la fase aguda de la infección, tanto el comportamiento de los porcentajes de los Linfocitos T CD4+ como el de los Linfocitos T CD8+ que expresaban solamente PD-1 fue progresivo; es decir, conforme la infección avanzaba, estos porcentajes iban aumentando progresivamente. En el grupo no infectado se encontró el menor porcentaje de estas poblaciones en comparación con los días 7 y 15. Mientras que, en el día 7 de infección se observó un porcentaje mayor al encontrado en el grupo no infectado, pero, menor en comparación con el día 15. Este último día, por consiguiente, fue donde se presenció el porcentaje más alto. Dentro de estas dos poblaciones linfocitarias, es de resaltar que, los porcentajes en esta fase de la infección de la población de Linfocitos T CD4+ es mayor en comparación con los de la población de Linfocitos T CD8+. Cabe mencionar que, a pesar de que se observaron diferentes porcentajes en los días de infección estudiados, no se encontraron resultados estadísticos significativos (Figura 31).

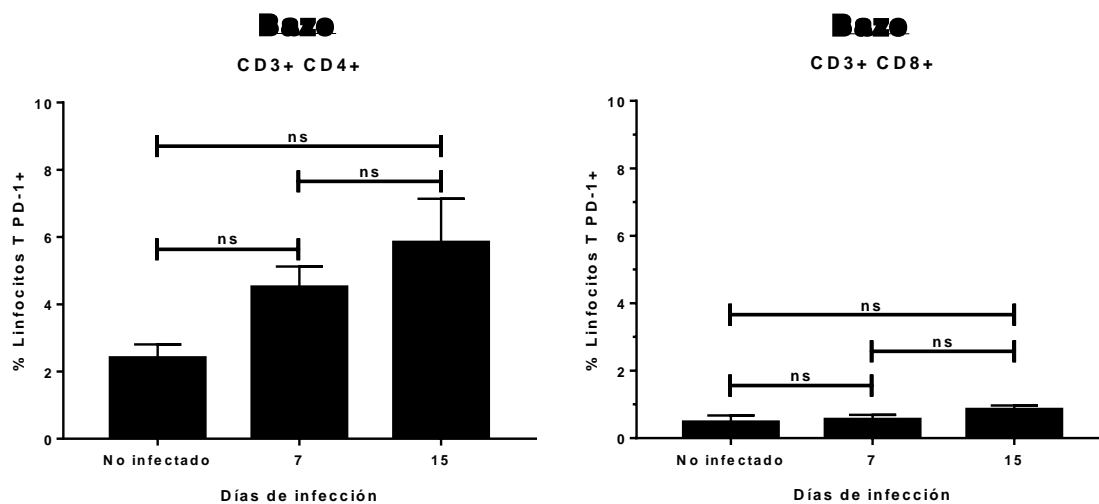


Figura 31. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

En lo que respecta a la fase crónica de la infección, el patrón de comportamiento de la expresión de PD-1 por los Linfocitos T fue diferente al observado en la fase aguda. En los porcentajes de los Linfocitos T CD4+ PD-1+ observados en los días 70 y 90 existió una similitud en estos, en comparación con el día 120. En este último día, se encontró el menor porcentaje en comparación con los otros días estudiados. Por tanto, los días 70 y 90 fue donde se observó el mayor porcentaje de Linfocitos T CD4+ expresando PD-1. En cuanto a la población de Linfocitos T CD8+ PD-1+ en los tres días de infección se encontraron porcentajes muy similares entre sí. Aunque se observó que los conforme progresaba la infección, los porcentajes aumentaban alrededor del 2%; sin embargo, el aumento progresivo de estos porcentajes fue casi imperceptible. Por tanto, como había mucha similitud entre los porcentajes de los diferentes días de infección, no se encontraron diferencias estadísticas significativas (Figura 32).

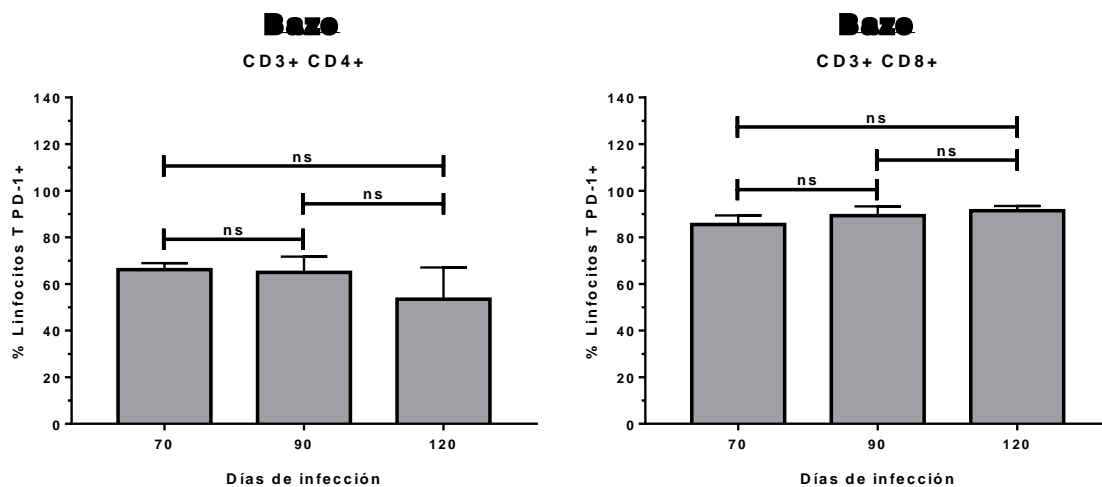


Figura 32. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

Una vez que se comparó la expresión de PD-1 entre la fase aguda y la crónica, se observó que, tanto en la población de Linfocitos T CD4+ como en la de Linfocitos T CD8+, los porcentajes de expresión eran mucho más grandes en los días pertenecientes a la fase crónica (días 70, 90 y 120) en comparación con los días de la fase aguda (días 7 y 15). Este aumento en la expresión de PD-1 superaba hasta 20 veces la encontrada en los días de infección aguda, así como en el grupo no infectado. En este grupo, hay que destacar que fue donde se encontró el menor porcentaje de PD-1 expresado por Linfocitos T para ambas poblaciones celulares. Un dato más observado fue que, en la población de Linfocitos T CD8+ la expresión de este receptor fue más grande en cuanto a porcentajes, cuando era comparada con la expresión encontrada en la población de Linfocitos T CD4+ (Figura 33).

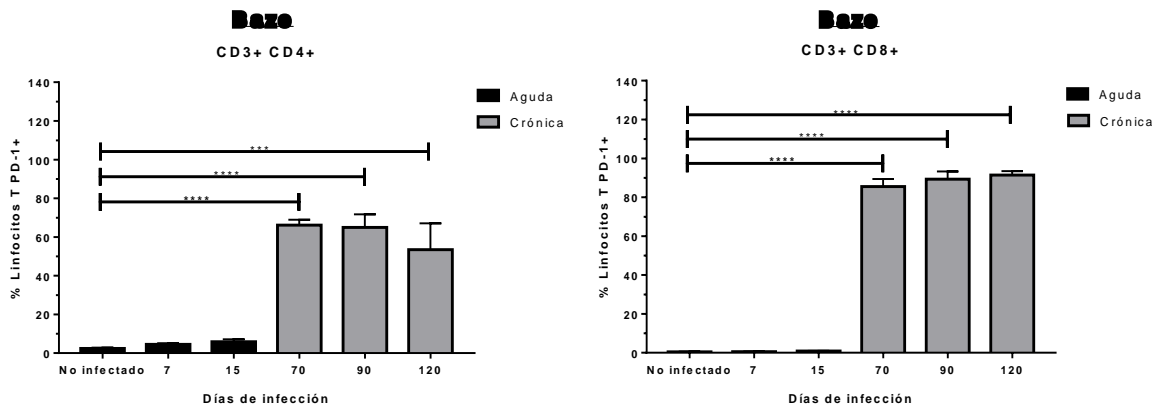


Figura 33. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (CD3+CD4+ *** p=0.0004, **** p=0.0001) (CD3+CD8+ **** p=0.0001).

Analizando las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ se observó que, el patrón de comportamiento era muy similar entre sí, cuando se trataba de la expresión del receptor TIM-3 durante la fase aguda de la infección. En ambas poblaciones linfocitarias se encontró que el menor porcentaje de expresión correspondía al día 7; por el contrario, el porcentaje más alto para este receptor fue en el día 15 de infección. En el grupo no infectado la expresión de TIM-3 en ambas poblaciones celulares fue de 5 a 10% más grande que el observado en el día 7, pero más pequeño que el que se encontró en el día 15. Es de resaltar que en la población de Linfocitos T CD8+ se observaron mayores porcentajes de este receptor que en comparación con los Linfocitos T CD4+. Cabe mencionar que, aunque los porcentajes entre los días de infección estudiados fueron muy variables entre sí, sólo se encontró diferencia estadística significativa en el día 15 cuando era comparado con el día 7 y con el grupo no infectado; todo esto en la población de Linfocitos T CD4+. Por otro lado, para la población de Linfocitos T CD8+, la única diferencia estadística significativa resultó ser la comparación entre el día 7 y el día 15 de infección (Figura 34).

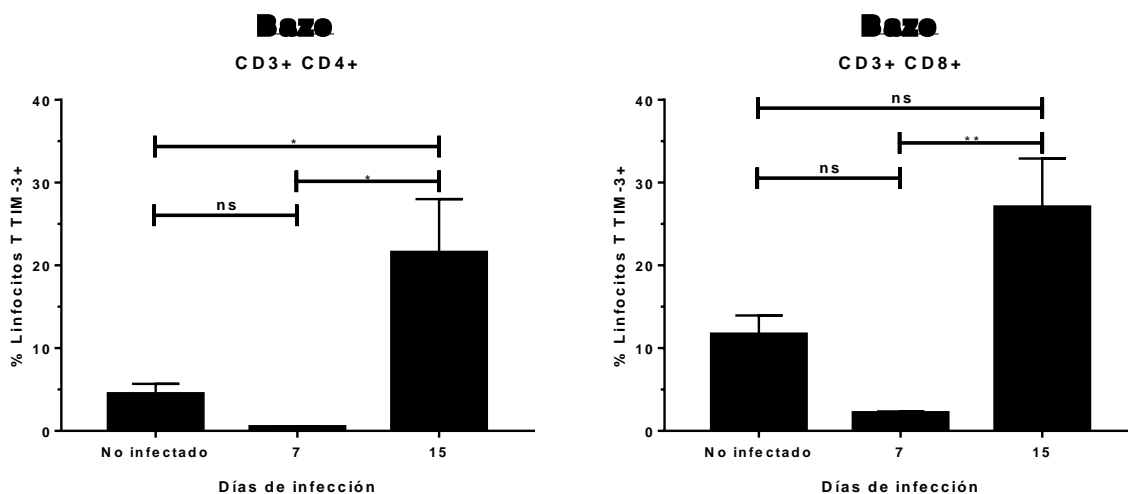


Figura 34. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD4+ * p=0.04, * p=0.01) (CD3+CD8+ ** p=0.006).

En cuanto a la expresión del receptor TIM-3 en la fase crónica de la infección, se observó un comportamiento en la población de Linfocitos T CD4+ diferente al encontrado en la población de Linfocitos T CD8+. Con respecto a los Linfocitos T CD4+, se observó que los días 70 y 90 presentaban un porcentaje de expresión muy similar entre sí, estos eran menores que el observado en el día 120. Es de mencionar que, en este último día fue donde se encontró el mayor porcentaje de TIM-3. Sin embargo, a pesar de las diferencias observadas en los porcentajes a lo largo de los días estudiados, no se encontró diferencia estadística significativa alguna. Por otro lado, en la población de Linfocitos T CD8+, no se observó la expresión del receptor TIM-3 en los días 70 y 90, mientras que en el día 120 se hizo evidente esta expresión, pero en muy poco porcentaje. Al igual que en los Linfocitos T CD4+, no se encontraron diferencias estadísticas significativas (Figura 35).

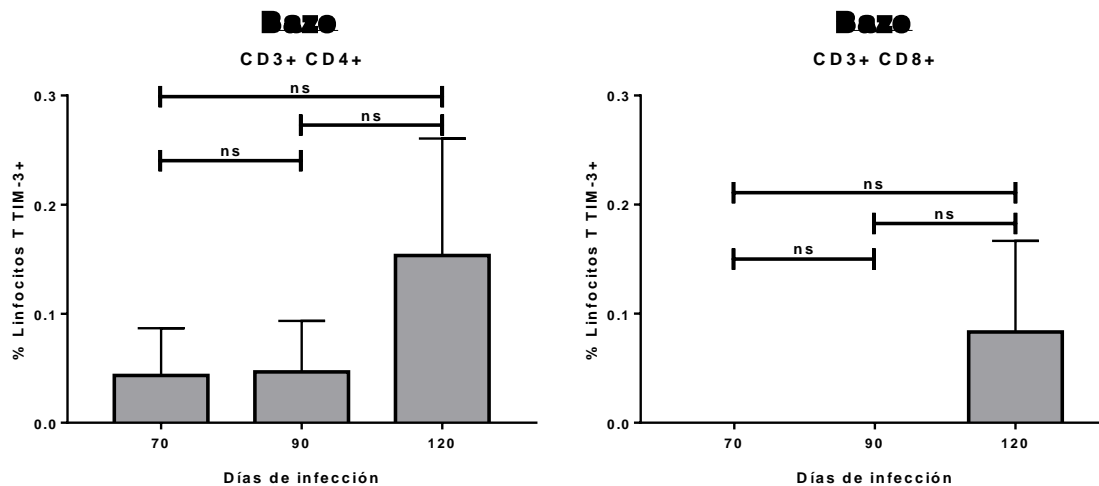


Figura 35. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

En los porcentajes de expresión de TIM-3 durante la fase aguda y la fase crónica de la infección para las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ se observó que, en la fase aguda de ambas poblaciones celulares se encontraba la mayor expresión de este receptor en comparación con los días pertenecientes a la fase crónica. Comparando estas dos fases, se encontró que el mayor porcentaje fue en el día 15 para ambas poblaciones linfocitarias; la expresión de TIM-3 en el grupo no infectado y en los días de fase aguda era hasta 20 veces mayor en comparación con la fase crónica; ya que en los días 90, 70 y 120 la expresión de este receptor era casi imperceptible. A pesar de las diferencias tan grandes que existían entre los porcentajes, solamente en la población de Linfocitos T CD4+ no se encontró ninguna diferencia estadística significativa (Figura 36).

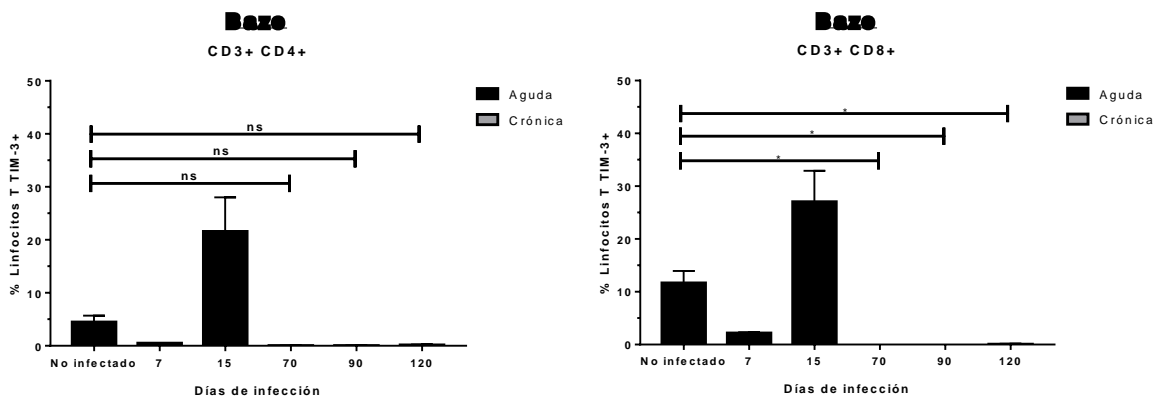


Figura 36. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (CD3+CD8+ * $p=0.02$).

En la coexpresión de los receptores PD-1 y TIM-3 durante la fase aguda de la infección se observó que, en general, en la población de Linfocitos T CD4+ los porcentajes de esta expresión dual eran mayor al ser comparada con la población de Linfocitos T CD8+. En ambas poblaciones linfocitarias se encontró que en el día 7 fue donde había un menor porcentaje de estos dos receptores en comparación con el grupo no infectado y el día 15. En el grupo no infectado se observó un porcentaje mayor al del día 7, sin embargo, era menor que el observado en el día 15. En este último día fue donde se encontró el porcentaje más alto de la coexpresión. Es de mencionar que, aunque se observaron diferencias entre los porcentajes de los diferentes días de infección, en la población de Linfocitos T CD8+ no se encontraron resultados estadísticos significativos. Mientras que en la población de Linfocitos T CD4+ estas diferencias significativas se encontraron solo al comparar el día 15 con el día 7 y el grupo no infectado (Figura 37).

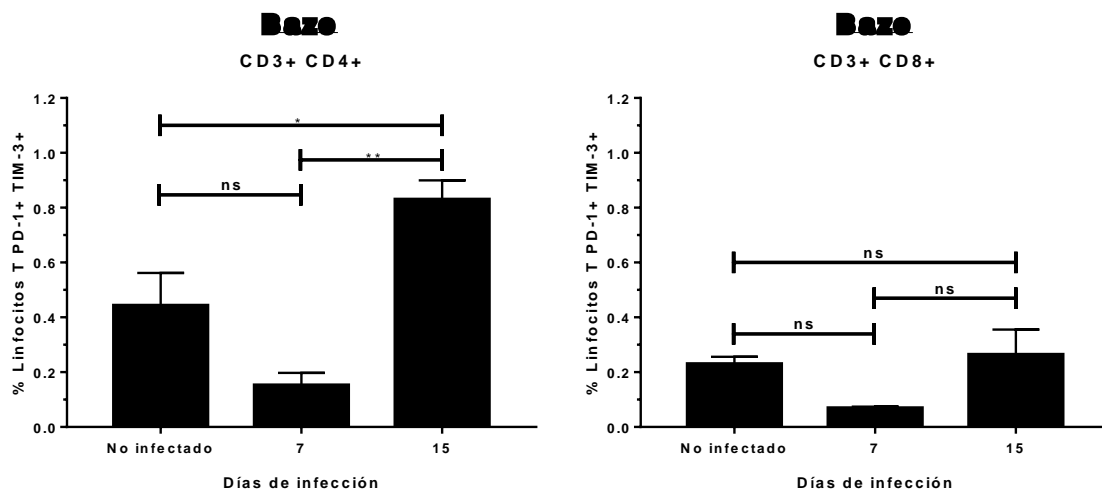


Figura 37. Coexpresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la coexpresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD4+ * p=0.03, ** p=0.002).

En el comportamiento de la coexpresión de PD-1 y TIM-3 durante la fase crónica de la infección se observó que en la población de Linfocitos T CD8+ los porcentajes de esta coexpresión eran mayores que los observados para los Linfocitos T CD4+. En esta población se encontró que el día 90 era el que presentaba mayor coexpresión de estos receptores en comparación con los días 70 y 120. Por el contrario, el día 70 era el que mostraba el menor porcentaje de los tres días estudiados; mientras que el día 120 tenía un porcentaje mayor al día 70, pero menor que el encontrado en el día 90. Es de destacar que, a pesar de estas diferencias antes mencionadas entre los porcentajes no se encontró diferencia significativa alguna. En cuanto a la población de Linfocitos T CD8+ se observó que los días 90 y 120 presentaban porcentajes muy similares entre sí, sin embargo, el día 120 era el que tenía un valor más alto en comparación con los días 70 y 120. El porcentaje menor se observó en el día 70. Al igual que en la población de Linfocitos T CD4+, en la población de Linfocitos T CD8+ no se encontraron diferencias estadísticas significativas (Figura 38).

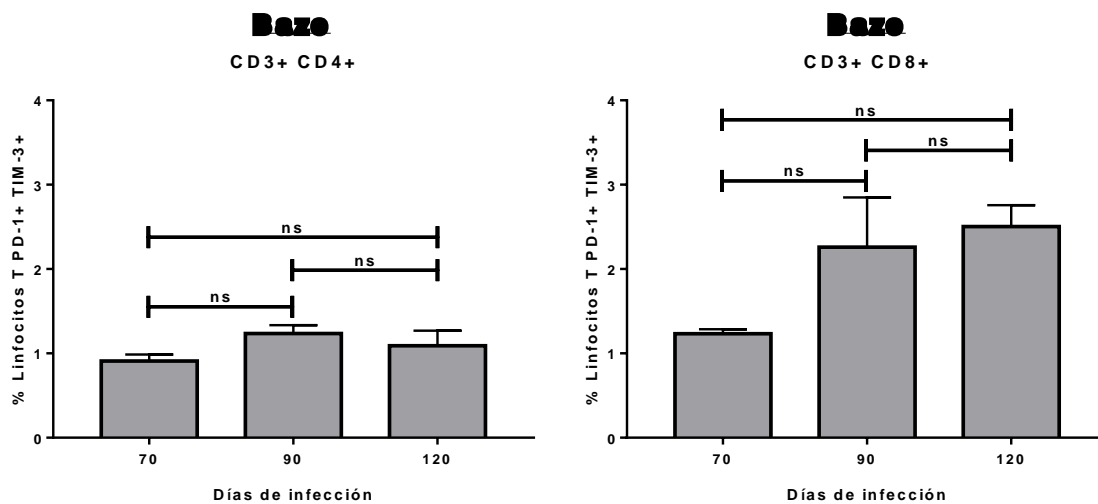


Figura 38. Coexpresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la coexpresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

Una vez que se compararon las fases aguda y crónica para observar la coexpresión de los receptores PD-1 y TIM-3 se observó que, de una manera muy general, esta expresión era más alta en los días de la fase crónica (70, 90 y 120) en comparación con los días de la fase aguda (7 y 15) y el grupo no infectado. En la población de Linfocitos T CD4+ se encontró que los días de fase crónica junto con el día 15 perteneciente a la fase aguda compartían porcentajes muy similares entre sí, pero entre estos, los días 70, 90 y 120 presentaban porcentajes mayores que el día 15, y, por consiguiente, mayores que el día 7 y el grupo no infectado. Es de mención, que, dentro de las dos fases, el día 7 fue el que presentó el menor porcentaje de PD-1 y TIM-3. En lo que respecta a la población de Linfocitos T CD8+, se encontró que esta coexpresión era mucho mayor en la fase crónica que en la fase aguda; los días con mayor porcentaje fueron los días 90 y 120; por el contrario, el menor valor se observó en el día 7. Es de destacar que, en las dos poblaciones linfocitarias, los porcentajes fueron aumentando progresivamente; y que en la población de Linfocitos T CD8+ fue donde se observó una mayor diferencia en la coexpresión de los receptores cuando se comparó la fase aguda con la fase crónica (Figura 39).

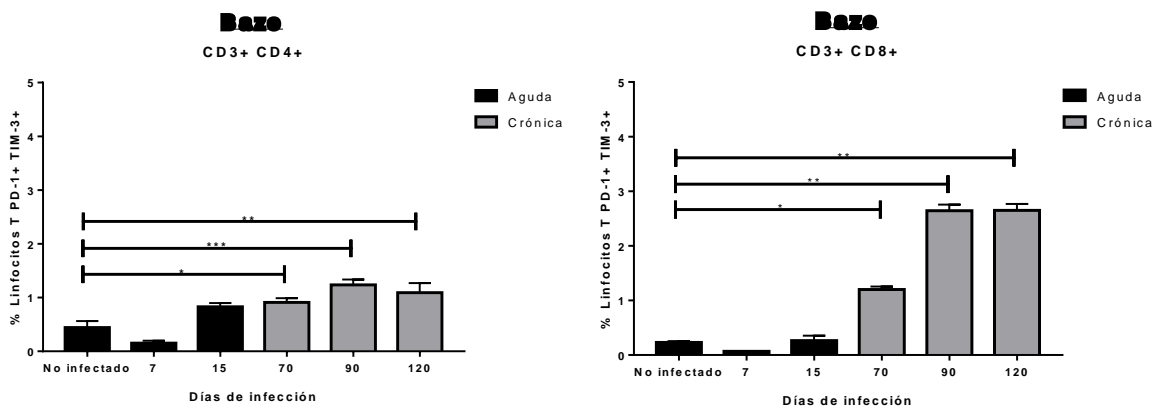


Figura 39. Coexpresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el bazo en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del bazo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la coexpresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (CD3+CD4+ * p=0.03, ** p=0.004, *** p=0.0009) (CD3+CD8+ * p=0.01, ** p=0.004, *** p=0.007).

7.7 Cuantificación de la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el ganglio poplíteo durante las fases aguda y crónica de la Infección.

Utilizando las suspensiones celulares obtenidas a partir de los ganglios poplíteos extraídos durante las fases aguda y crónica de la infección, se realizó la tinción de las células con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-PD1 y anti-TIM3 para después ser analizadas por citometría de flujo; esto con el fin de cuantificar las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el órgano mencionado anteriormente y posteriormente, analizar la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en estas poblaciones celulares.

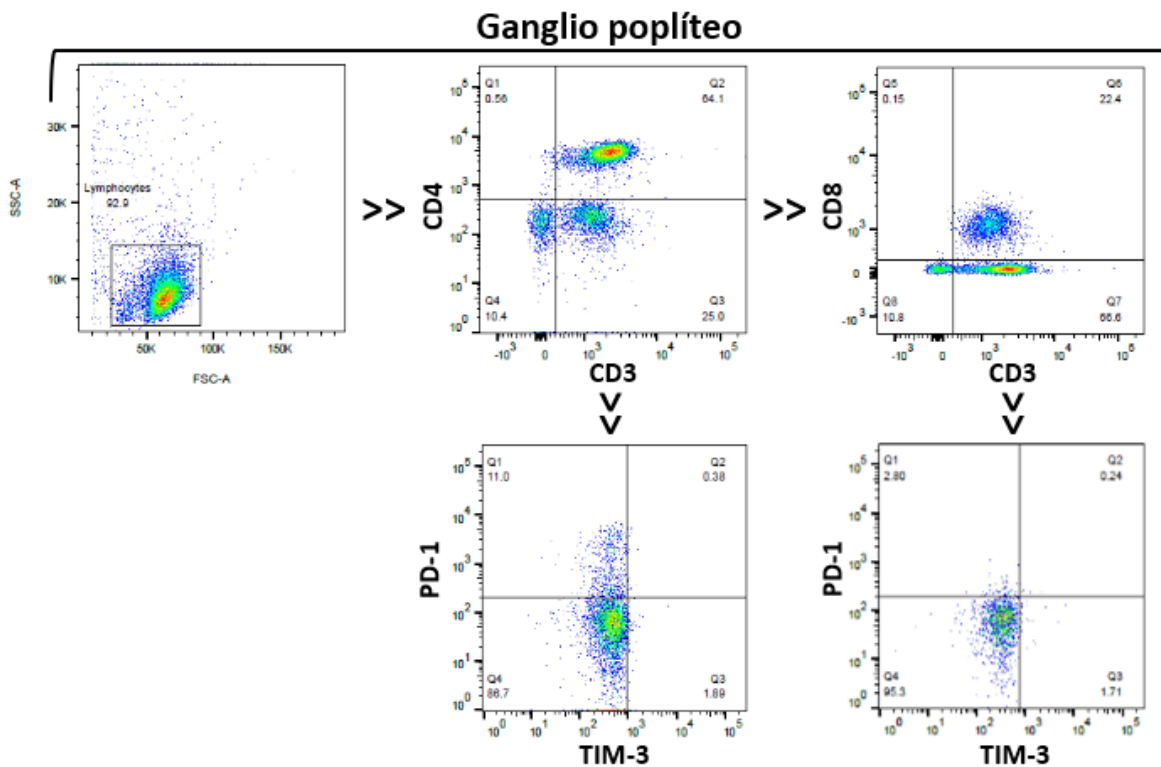


Figura 40. Dot plots representativos de la citometría de flujo en ganglio poplíteo para el análisis de PD-1 y TIM-3. A partir de los datos adquiridos de las suspensiones celulares de los ganglios poplíteos se realizó la cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T Cooperadores CD4+ y Linfocitos T Citotóxicos CD8+ presentes en este órgano linfoide, posteriormente se analizó la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 dentro de estas poblaciones linfocitarias.

En la fase aguda de la infección observando los porcentajes de expresión del receptor PD-1, se encontró que la población de Linfocitos T CD4+ como la población de Linfocitos T CD8+ compartían el mismo patrón de comportamiento. Es decir, que en ambas poblaciones linfocitarias conforme progresaba la infección, los porcentajes iban en aumento. Por tanto, el grupo no infectado presentó un porcentaje menor que el observado en el día 7 y el día 15, mientras que el día 7 tenía un nivel de expresión de PD-1 menor que el que se encontró en el día 15 pero mayor que el grupo no infectado y, por tanto, en el día 15 se observó un porcentaje mayor que los dos días anteriores estudiados. Este aumento progresivo en la expresión de PD-1 fue evidente para Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+; sin embargo, se observaron diferencias más pronunciadas entre los porcentajes de los diferentes días en la población de CD4+ (Figura 41).

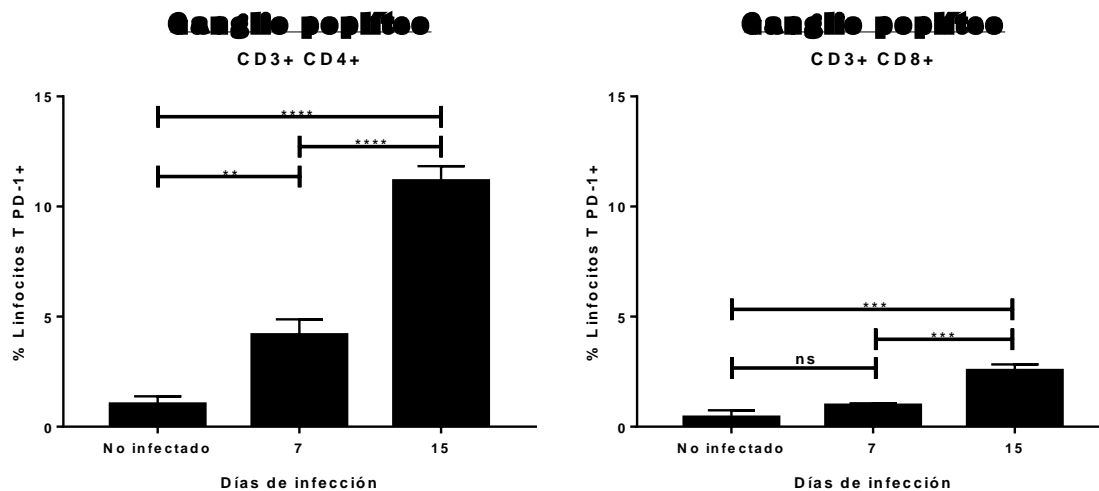


Figura 41. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD4+ ** p=0.001, **** p<0.0001) (CD3+CD8+ *** p=0.001, *** p=0.0006).

Una vez analizada la fase crónica de la infección, se encontró que el patrón de comportamiento de la expresión de PD-1 por los Linfocitos T fue diferente al observado en la fase aguda. En los porcentajes de los Linfocitos T CD4+ PD-1+ observados en los días 70, 90 y 120 existió una similitud muy grande entre estos. A pesar de esto se pudo distinguir que los días 70 y 90 eran los que presentaban un mayor porcentaje de Linfocitos T CD4+ expresando PD-1 en comparación con el día 120. Entre los porcentajes de los días 70 y 90 no se apreció diferencia alguna, por lo que se podría decir que el porcentaje de expresión se mantuvo constante. En cuanto a la población de Linfocitos T CD8+ PD-1+, en los tres días de infección se encontraron porcentajes muy similares entre sí, al igual que en los Linfocitos T CD4+. Así mismo, se observó que los días 70 y 90 compartían porcentajes muy similares entre sí; mientras que en el día 120 se encontró el mayor porcentaje de la expresión de este receptor, aun así, las diferencias de este día con los días 70 y 90 fueron casi imperceptibles (Figura 42).

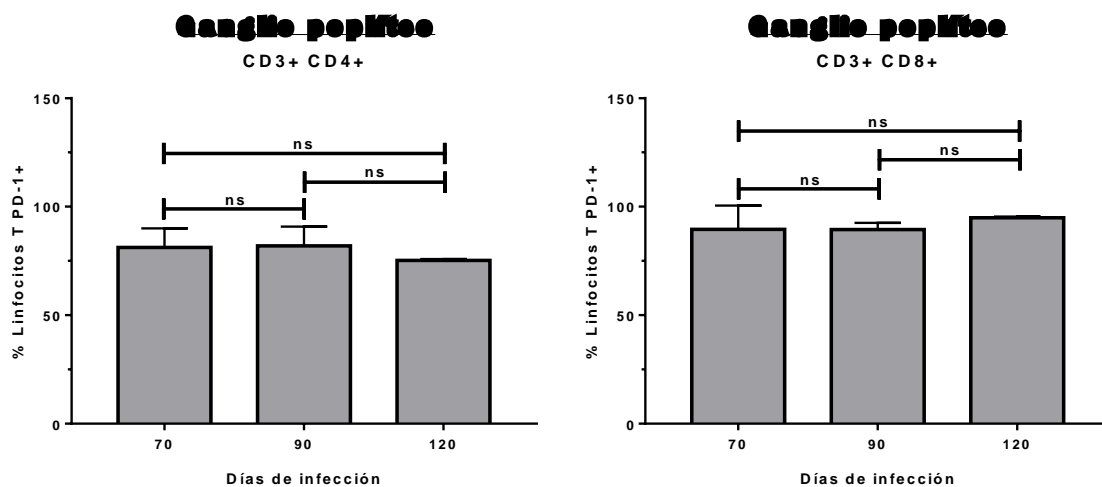


Figura 42. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

Observando las fases aguda y crónica juntas en cuanto a la expresión de PD-1, se encontró que tenían el mismo patrón de comportamiento observado en el bazo; donde los días de la fase crónica (70, 90 y 120) de las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ superaban drásticamente en los porcentajes de expresión de PD-1 a los encontrados en la fase aguda (días 7 y 15) de la infección y en el grupo no infectado. También se observó que, en todos los días, tanto de la fase aguda como de la fase crónica, presentaban pequeñas desviaciones estándar y que solo los porcentajes de la fase crónica permanecían constantes al pasar de los días. Cabe mencionar que los porcentajes de los días 70, 90 y 120 fueron muy similares entre las dos poblaciones linfocitarias (Figura 43).

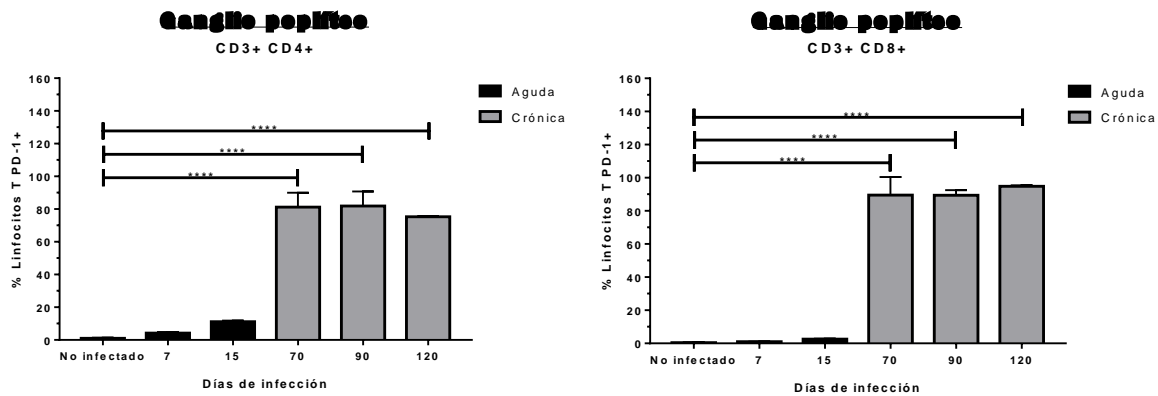


Figura 43. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (CD3+CD4+ **** p=0.0001) (CD3+CD8+ **** p=0.0001).

En la expresión de TIM-3 por los Linfocitos T durante la fase aguda de la infección se observó que en la población de Linfocitos T CD4+ el mayor porcentaje lo presentó el día 7 en comparación con el día 15 y el grupo no infectado; por el contrario, en este grupo fue donde se encontró el menor porcentaje de TIM-3 en comparación con los días 7 y 15. En este último día se encontró un porcentaje mayor al observado en el grupo no infectado pero menor al que presentó el día 7. En cuanto a la población de Linfocitos T CD8+ se observó que el día 7 era el que presentaba el mayor porcentaje de expresión, al igual que en los Linfocitos T CD4+ con la diferencia de que el porcentaje era menor que el del día 7 de la población linfocitaria CD4+. Sin embargo, difirió el comportamiento de los porcentajes, ya que el grupo con el menor porcentaje lo obtuvo el día 15; mientras que el grupo no infectado presentó una mayor expresión de TIM-3 que el día 15 pero menor que el día 7. Cabe mencionar que, a pesar de las diferencias mencionadas, en los Linfocitos T CD8+ no se encontraron diferencias estadísticas significativas (Figura 44).

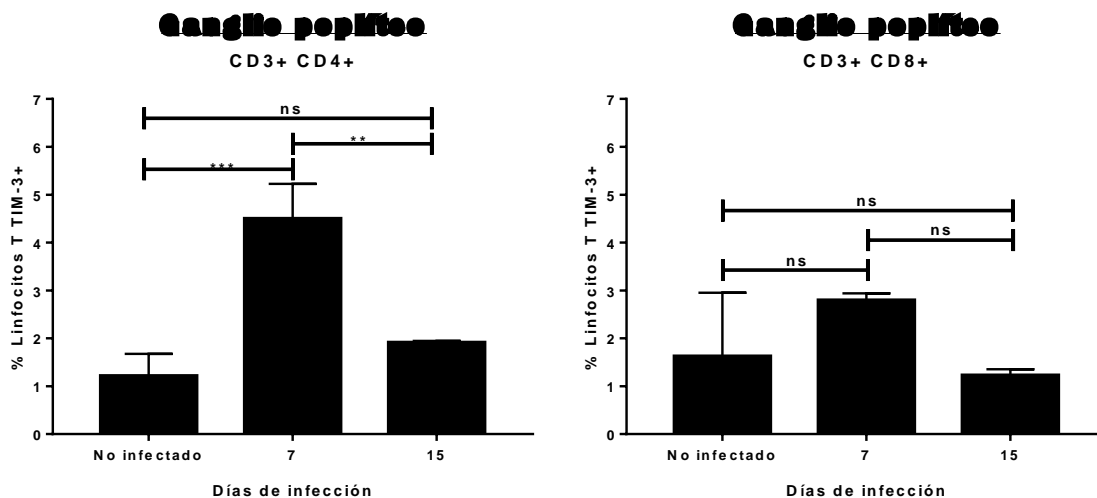


Figura 44. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD4+ ** p=0.001, *** p=0.0005).

Un patrón de comportamiento muy diferente al de la fase aguda se observó durante la fase crónica en cuanto a la expresión del receptor TIM-3. En la población de los Linfocitos T CD4+ se encontró que conforme progresaba la infección, los porcentajes iban en descenso. Es decir, el mayor porcentaje de expresión lo tenía el día 70, en comparación con los días 90 y 120. El día 90 era el que presentaba un porcentaje menor que el día 70 pero mayor que el día 120; en este último se encontró la expresión más baja de todos los días estudiados. En cuanto a la población de Linfocitos T CD8+, se observó que en los días 70 y 120 no se encontró expresión alguna de este receptor; sólo se encontró la presencia de éste en el día 120. A pesar de las diferencias entre los porcentajes de los diferentes días, no se encontró ningún resultado estadístico significativo en ambas poblaciones linfocitarias (Figura 45).

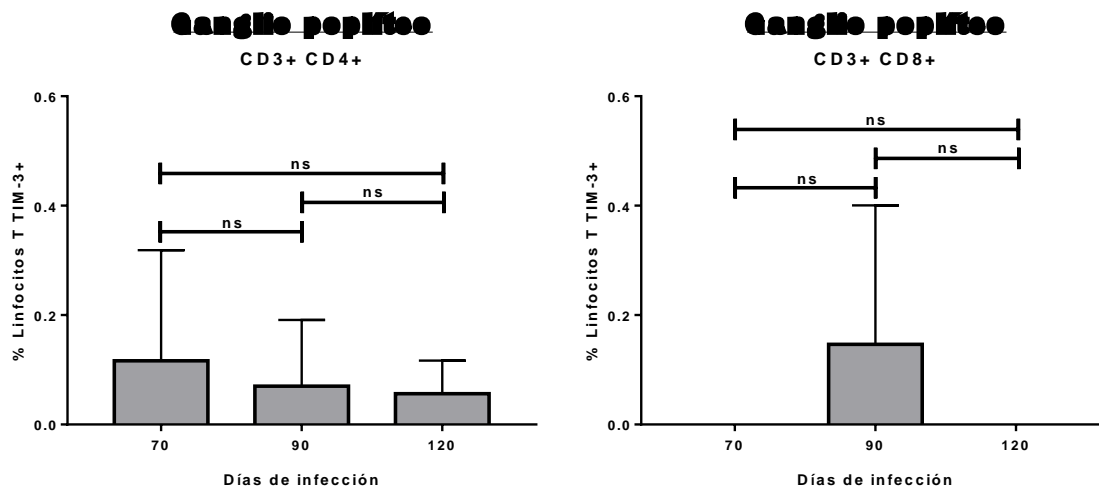


Figura 45. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

La expresión del receptor TIM-3 en las fases aguda y crónica de la infección tuvo un comportamiento diferente al observado con el receptor PD-1. En ambas poblaciones linfocitarias, es decir, en los Linfocitos T CD4+ y los Linfocitos T CD8+ se encontró que, en los días pertenecientes a la fase aguda de la infección, así como en el grupo no infectado fue donde la expresión de TIM-3 era mayor en comparación con la fase crónica. El descenso de este receptor fue muy evidente en la fase crónica, ya que los porcentajes de expresión se encontraban hasta 10 veces por debajo de lo encontrado en la fase aguda. En los Linfocitos T CD4+ por lo general, esta expresión estuvo más pronunciada tanto en la fase aguda como en la crónica; ya que se observó que, en dos días de la infección crónica no había expresión de este receptor por parte de los Linfocitos T CD8+ (Figura 46).

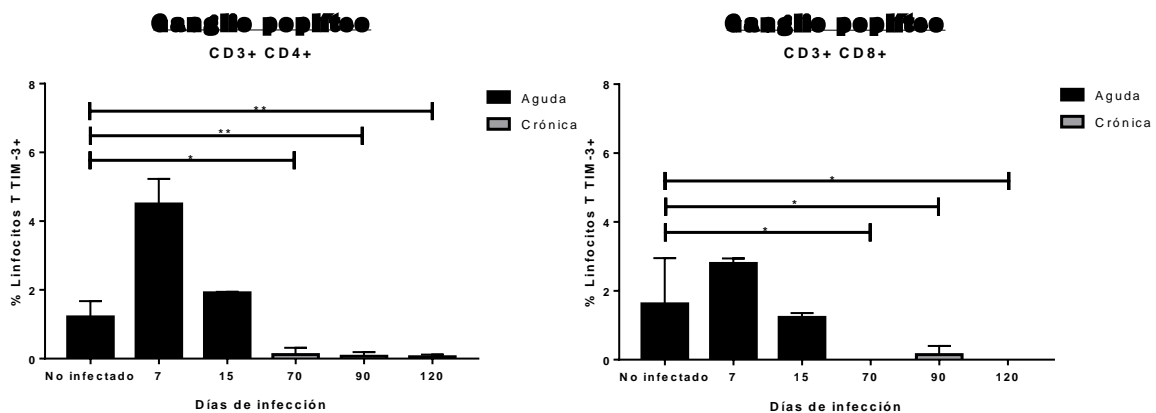


Figura 46. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (CD3+CD4+ * p=0.01, ** p=0.009, ** p=0.008) (CD3+CD8+ * p=0.01, * p=0.02, * p=0.01).

En cuanto a la coexpresión de PD-1 y TIM-3 durante la fase aguda, en la población de Linfocitos T CD4+ se observó que los porcentajes aumentaban conforme progresaba la infección. El día 15 fue el que presentó la mayor coexpresión en comparación con el día 7 y el grupo no infectado; mientras que el día 7 presentó un porcentaje de expresión menor que el día 15 pero mayor que el grupo no infectado; este último fue en donde se encontró menor coexpresión de PD-1 y TIM-3. Por otro lado, en la población de Linfocitos T CD8+ existió un comportamiento diferente en cuanto a la coexpresión de estos receptores. Los días 7 y 15 presentaron porcentajes muy similares entre sí; sin embargo, se pudo distinguir que el día 7 fue en el que se observó un porcentaje un poco más elevado que el día 15 y hasta 5 veces más grande que el observado en los ratones no infectados; en este grupo fue donde se presentó el porcentaje más bajo en la coexpresión de PD-1 y TIM-3, mismo resultado que el observado en los Linfocitos T CD4+. Cabe mencionar que, en la población CD4+ los porcentajes de todos los días estudiados eran más grandes que los encontrados en la población de Linfocitos T CD8+ (Figura 47).

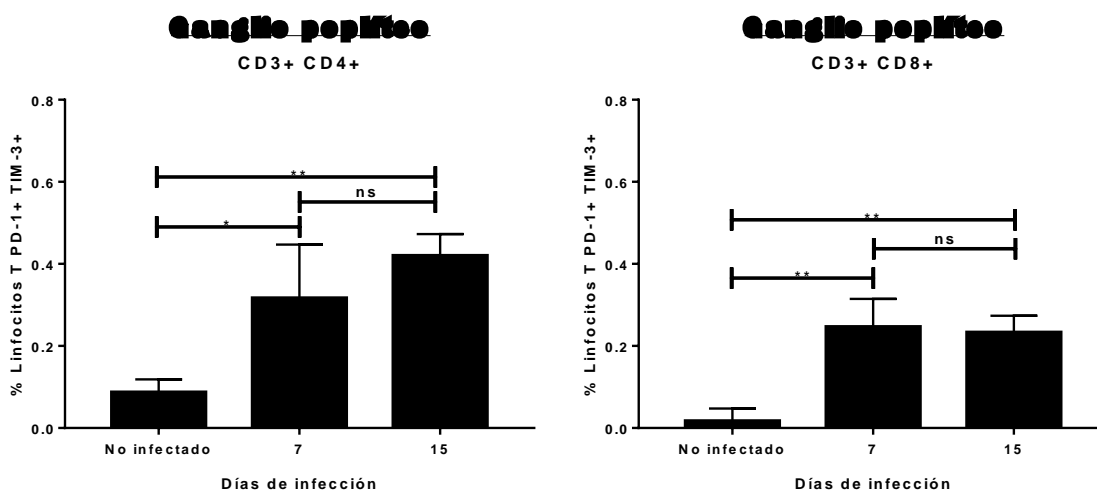


Figura 47. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD4+ * p=0.03, ** p=0.006) (CD3+CD8+ ** p=0.002, ** p=0.004).

Durante la fase crónica de la infección, los porcentajes de coexpresión de los receptores PD-1 y TIM-3 fueron diferentes entre las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+. En la población CD4+ se observó un comportamiento regresivo en los porcentajes conforme progresaba la infección; esto es que, en el día 70 se encontró el porcentaje más alto de los días estudiados en esta fase, en el día 90 se observó una coexpresión menor al día 70 pero mayor al día 120, y en este último día se encontró un valor muy bajo de PD-1 y TIM-3 en comparación con los otros dos días. En lo que respecta a la población de Linfocitos T CD8+, se observó que los porcentajes de los diferentes días estudiados eran más altos que los observados en los Linfocitos T CD4+. Aquí, el día 90 fue el que presentó el porcentaje de coexpresión más elevado, mientras que el día 120, fue el que tenía el más bajo, lo mismo que se observó en la población CD4+; el día 70 fue en el que se encontró una coexpresión más elevada que el día 120 pero menor que el día 90. Cabe mencionar que, los cambios en los porcentajes observados a lo largo de la fase crónica de la infección no fueron suficientes para obtener resultados estadísticos significativos (Figura 48).

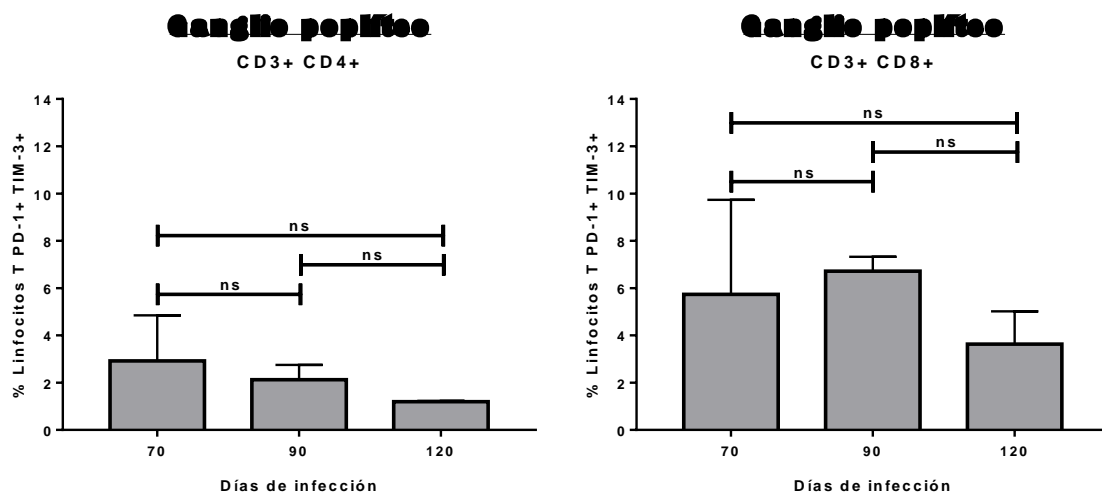


Figura 48. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

Realizando la comparación de los porcentajes de coexpresión de PD-1 y TIM-1 durante las fases aguda y crónica se encontró que, para ambas poblaciones linfocitarias, los Linfocitos T de la fase crónica (días 70, 90 y 120) presentaba mayores porcentajes de estos receptores en comparación con la fase aguda (días 7 y 75) y el grupo no infectado. Este aumento en la fase crónica fue de hasta 10 veces mayor que los porcentajes observados en la fase aguda. Se observó que, en los ratones no infectados, en comparación con los días 70, 90 y 120 de ambas poblaciones celulares, la coexpresión de estos marcadores estaba prácticamente ausente. Cabe mencionar que la población de Linfocitos T CD8+ presentó mayores porcentajes de PD-1 y TIM-3 que la población de Linfocitos T CD4+ (Figura 49).

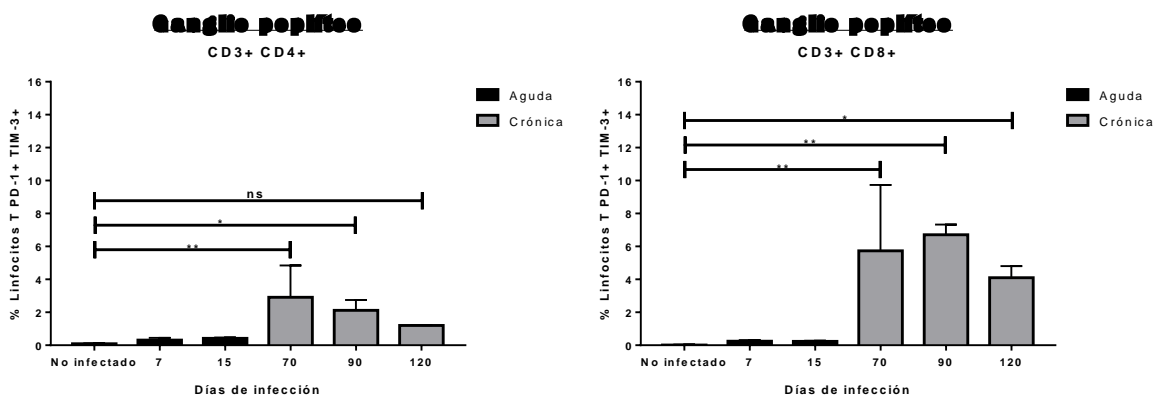


Figura 49. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el ganglio poplíteo en la fase aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del ganglio poplíteo a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (CD3+CD4+ * p=0.04, ** p=0.005) (CD3+CD8+ * p=0.04, ** p=0.005, ** p=0.001).

7.8 Cuantificación de la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ en el cojinete plantar durante las fases aguda y crónica de la Infección.

Utilizando las suspensiones celulares obtenidas a partir de los cojinetes plantares extraídos durante las fases aguda y crónica de la infección, se realizó la tinción de las células con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-PD1 y anti-TIM3 para después ser analizadas por citometría de flujo; esto con el fin de cuantificar las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el órgano mencionado anteriormente y posteriormente, analizar la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en estas poblaciones celulares.

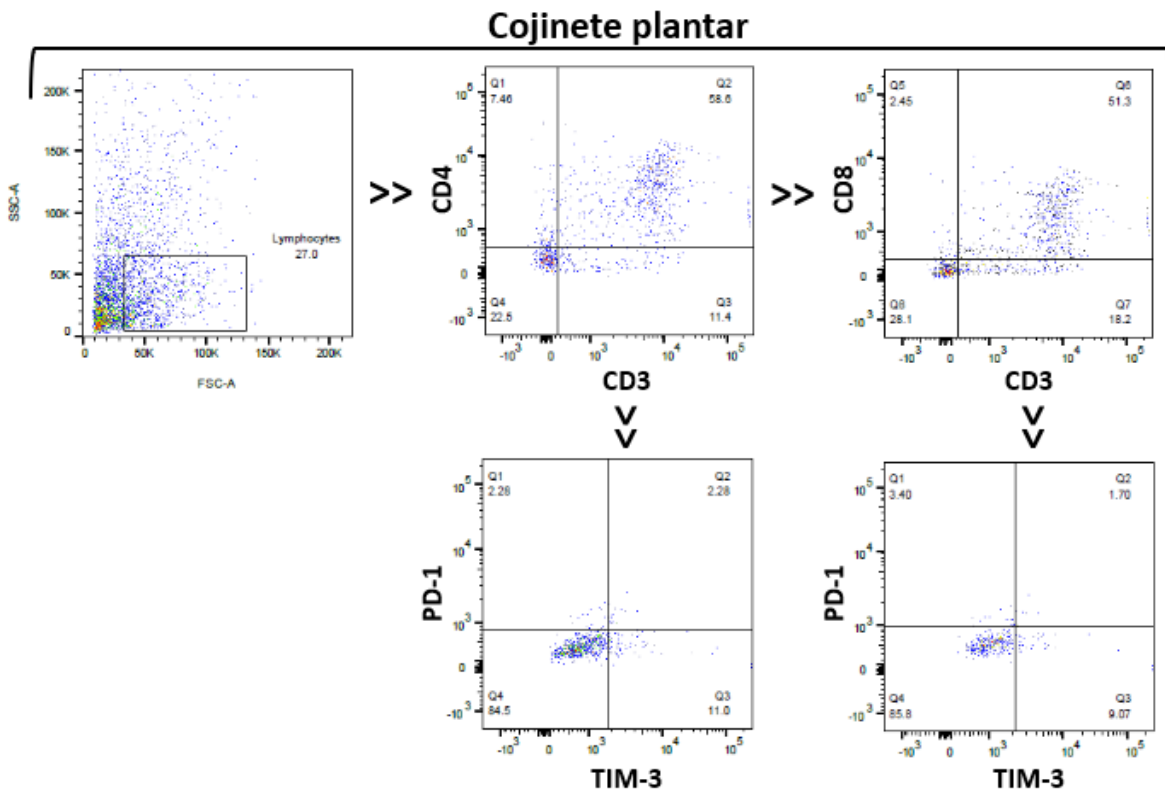


Figura 50. Dot plots representativos de la citometría de flujo en el cojinete plantar para el análisis de PD-1 y TIM-3. A partir de los datos adquiridos de las suspensiones celulares de los cojinetes plantares se realizó la cuantificación de las poblaciones de Linfocitos T Cooperadores CD4+ y Linfocitos T Citotóxicos CD8+ presentes en este órgano linfoide, posteriormente se analizó la expresión de los receptores PD-1 y TIM-3 dentro de estas poblaciones linfocitarias.

En la fase aguda de la infección, en lo que respecta a la expresión de PD-1 se observó que en la población de Linfocitos T CD4+ el mayor porcentaje de este receptor se presentó al día 15 en comparación con el día 7 y el grupo no infectado, este aumento en la expresión de PD-1 en el día 15 fue muy notorio, ya que el porcentaje se elevó casi 10 veces más que en los días anteriores. Por el contrario, el porcentaje más bajo se encontró en el día 7; y el grupo no infectado se observó una expresión más alta que en el día 7 pero más baja que en el día 15. En la población de Linfocitos T CD8+ se encontró un patrón de expresión muy diferente que el observado en la población CD4+. Aquí, el grupo no infectado y el día 15 presentaron porcentajes de expresión muy similares entre sí; mientras que en el día 7 no hubo expresión de PD-1. Cabe mencionar que el grupo no infectado de la población CD8+ presentó un porcentaje de expresión mayor que la CD4+ (Figura 51).

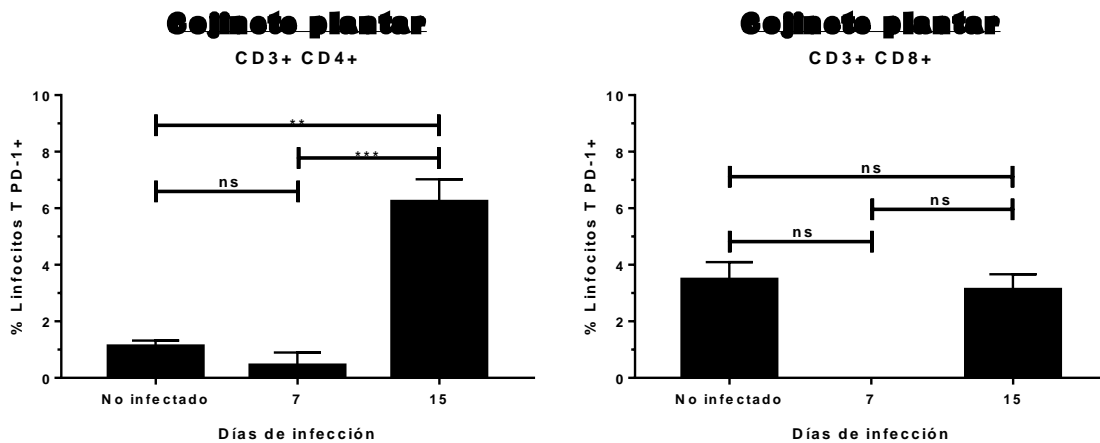


Figura 51. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD4+ ** p=0.01, *** p=0.0007).

Los porcentajes observados de la expresión de PD-1 durante la fase crónica fue muy diferente al observado en la fase aguda. En la población de Linfocitos T CD4+, así como en la población de Linfocitos T CD8+, se encontró que, en el día 70 el porcentaje de este receptor fue menor que el día 90 pero mayor que el día 120; posteriormente en el día 90 este porcentaje presentó el mayor aumento. En el día 120 la expresión del receptor disminuyó alrededor de 50%, que fue menor al porcentaje observado en el día 70. En ambas poblaciones se encontró que los días 70 y 90 presentaron porcentajes de expresión muy similares entre sí. Sin embargo, en la población de Linfocitos T CD8+ los valores de PD-1 fueron más altos que los observados en la población de Linfocitos T CD4+ (Figura 52).

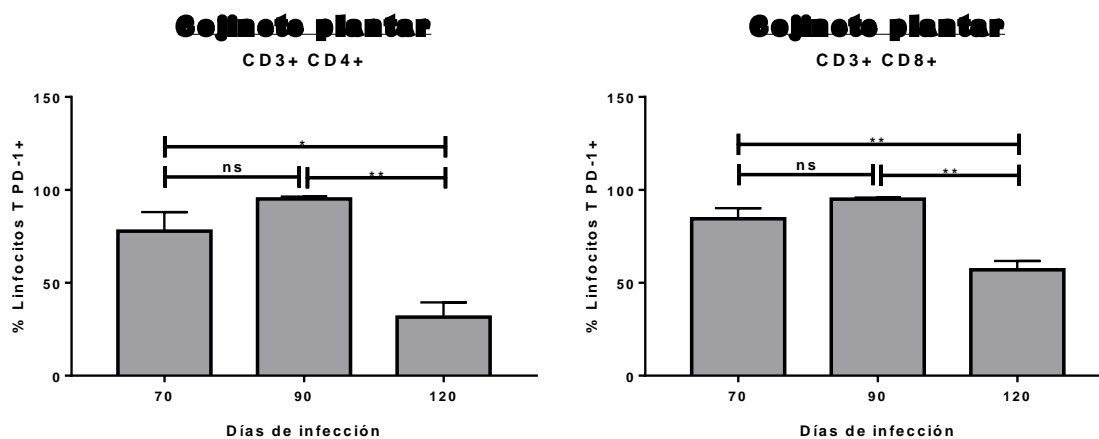


Figura 52. Expresión de PD-1 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD4+ * $p=0.01$, ** $p=0.002$) (CD3+CD8+ ** $p=0.009$, ** $p=0.002$).

El comportamiento de la expresión de PD-1 durante las fases aguda y crónica en el cojinete plantar, fue el mismo que el observado en el bazo y en el ganglio poplíteo; en la fase crónica de la infección se presentaron porcentajes más elevados de PD-1 en comparación con la fase aguda y con el grupo no infectado. En particular, en el cojinete plantar se observó que en el día 120 de ambas poblaciones linfocitarias la expresión de este receptor disminuía un 50% en comparación con los días 70 y 90; este comportamiento tan peculiar no se observó en los dos órganos linfoides presentados anteriormente. Sin embargo, en los días 70, 90 y 120 existió un aumento muy pronunciado que variaba entre 20 y 80% en los porcentajes de PD-1, en comparación con los días restantes estudiados de tanto Linfocitos T CD4+ como de Linfocitos T CD8+; Cabe destacar que, estas dos poblaciones comparten porcentajes de expresión de este receptor muy similares entre sí tanto en los días de fase aguda como en los de fase crónica (Figura 53).

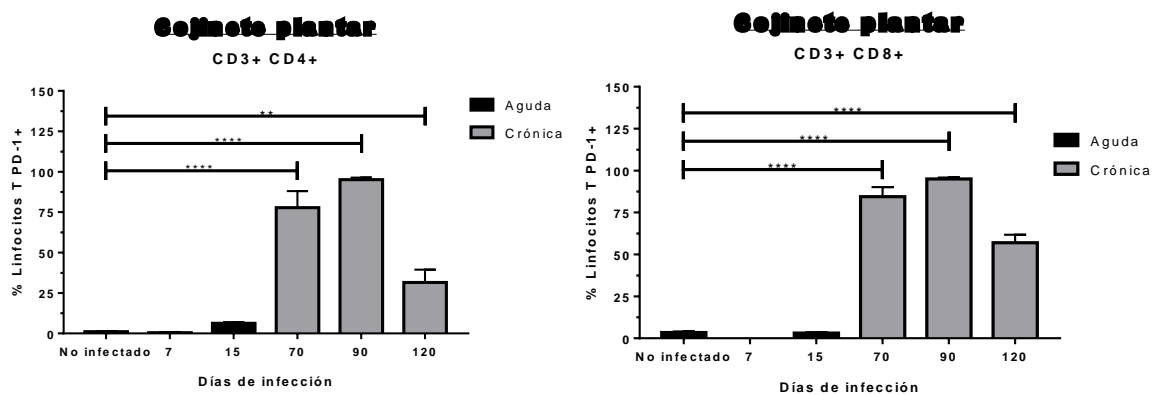


Figura 53. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (CD3+CD4+ ** p=0.006, **** p=0.0001) (CD3+CD8+ **** p=0.0001).

En lo que respecta a la expresión de TIM-3 en la fase aguda de la infección, se observó que en la población de Linfocitos T CD4+ el grupo no infectado presentó niveles de este receptor más altos que los observados en el día 7 pero compartió mucha similitud de estos niveles con el día 15 de infección, es por esto, que entre el grupo no infectado y el día 15 no se pudo distinguir si había alguna diferencia entre los porcentajes de TIM-3; mientras que, en el día 7 se observó el porcentaje de expresión más bajo en esta fase de infección. A pesar de estas diferencias, no se encontraron resultados estadísticos significativos. Por otro lado, en la población de Linfocitos T CD8+ se observó que en el día 7 no había expresión de TIM-3; y que al igual a lo observado en la población CD4+, el grupo no infectado y el día 15 mostraron valores muy similares; sin embargo, aquí se distinguió que el día 15 era el que presentaba un porcentaje mayor en la expresión de este receptor (Figura 54).

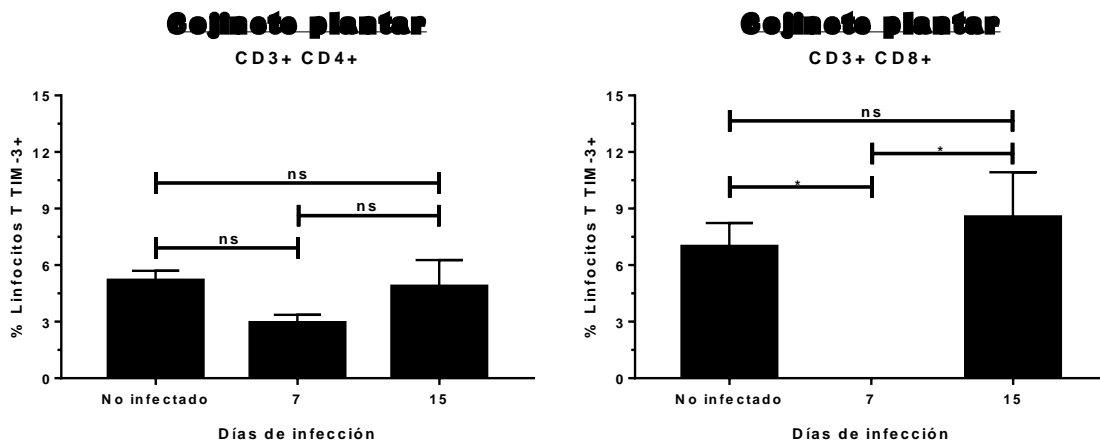


Figura 54. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD8+ * p=0.04, * p= 0.01).

En la fase crónica de la infección, se observó un comportamiento en la expresión de TIM-3 contrario al observado en la fase aguda. En la mayoría de los días estudiados pertenecientes a la fase crónica, la expresión de este receptor estuvo prácticamente ausente. En la población de Linfocitos T CD4+ se observó que este receptor solo estuvo presente en el día 70, mientras que en los días 90 y 120 no se observó su expresión. El mismo patrón ocurrió en la población de Linfocitos T CD8+, con la diferencia de que, en el día 70 el porcentaje observado era mayor que el de la población CD4+ (Figura 55).

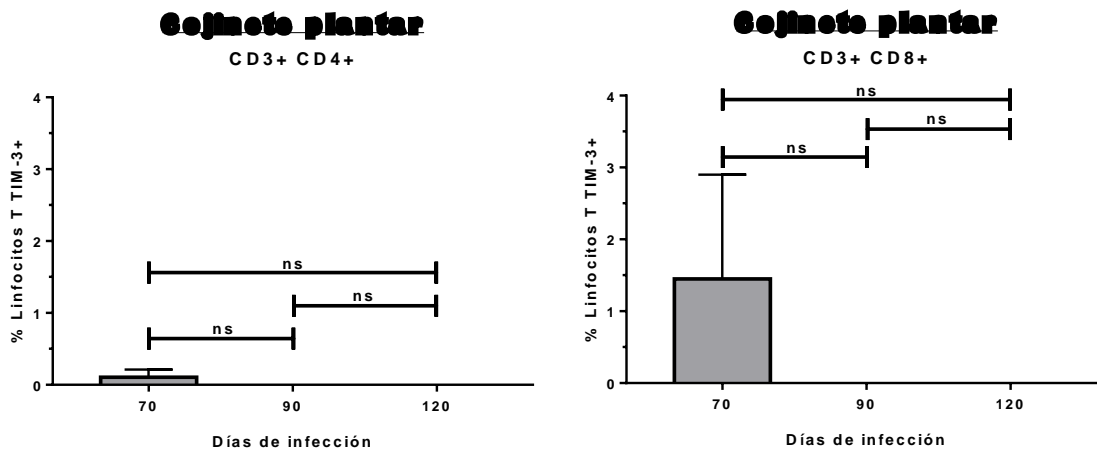


Figura 55. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey.

Comparando la expresión del receptor TIM-3 en las fases aguda y crónica se observó que en la población de Linfocitos T CD4+ y en la población de Linfocitos T CD8+ la fase aguda presentó mayores porcentajes de este receptor, aun cuando en la población CD8+ en el día 7 no se encontró expresión alguna de TIM-3. En la fase crónica se observó una clara disminución de alrededor del 10% del receptor TIM-3 en el día 70 de la infección, mientras que en los días que le siguieron, es decir los días 90 y 120, no presentaron la expresión de este receptor. Cabe destacar que, dentro de estas dos poblaciones linfocitarias estudiadas, los Linfocitos T CD8+ presentaron mayores porcentajes de TIM-3 en comparación con los Linfocitos T CD4+. Cabe resaltar que el patrón de comportamiento de la expresión de TIM-3 en el cojinete plantar resultó ser muy similar a los dos órganos linfoides anteriormente estudiados (bazo y ganglio poplíteo) (Figura 56).

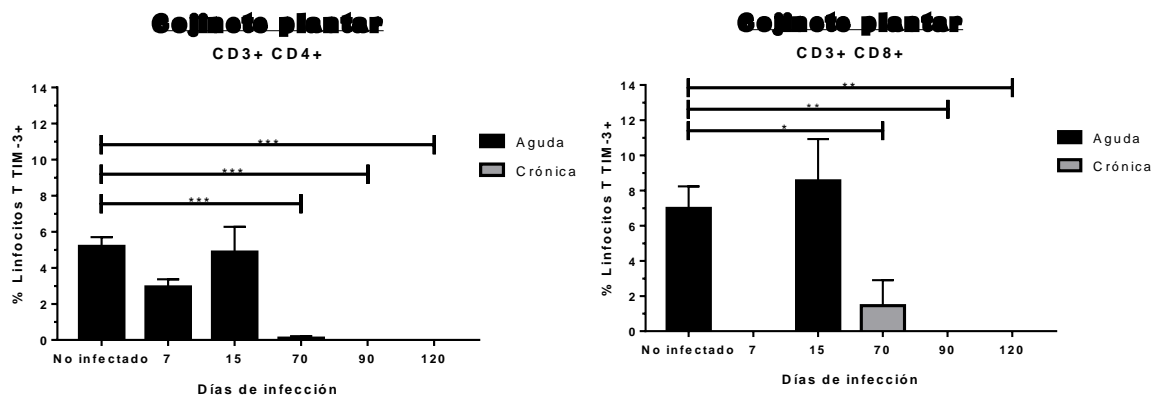


Figura 56. Expresión de TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en este órgano linfoide. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (CD3+CD4+ *** p=0.0004) (CD3+CD8+ * p=0.03, ** p=0.007).

En cuanto a la coexpresión de los receptores PD-1 y TIM-3 en la fase aguda, se encontró que en la población de Linfocitos T CD4+ el grupo no infectado y el día 7 de infección presentaron porcentajes de coexpresión muy similares entre sí y, por lo tanto, no se pudo distinguir si había una diferencia entre estos dos. En lo que respecta al día 15, se observó un valor menor a los observados en los días anteriores. En cuanto a los Linfocitos T CD8+ se observó que los porcentajes del grupo no infectado y el día 15 de esta población eran más grandes que los encontrados en la población de Linfocitos T CD4+; además un dato que no se observó en esta última fue que en el día 7 no se encontró expresión alguna de estos dos receptores, cosa que sí sucedió en la población CD8+. Por otro lado, el grupo no infectado y el día 15 presentaron porcentajes muy similares entre sí, destacando que, el día 15 tenía un porcentaje ligeramente mayor (Figura 57).

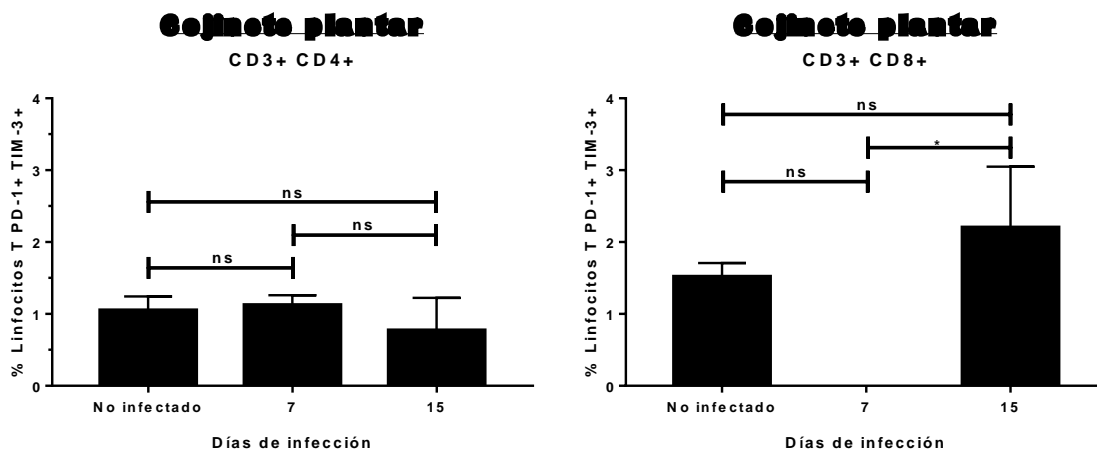


Figura 57. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase aguda de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD8+ * p=0.04).

En lo que respecta a la fase crónica de la infección, se observó que la coexpresión de PD-1 y TIM-3 en la población de Linfocitos T CD4+ tenía un comportamiento progresivo, es decir, los porcentajes de esta coexpresión aumentaron gradualmente conforme avanzaba la infección. Por lo tanto, se encontró que el día 70 presentaba el porcentaje más pequeño en comparación con los dos días posteriores estudiados; el día 90 presentó una coexpresión mayor que la del día 70 pero menor que la observada en el día 120, y en este último se presentó el porcentaje más alto de PD-1 y TIM-3. Cabe mencionar que, a pesar de las diferencias encontradas entre los porcentajes de los diferentes días de infección, no se encontraron resultados estadísticos significativos. En cuanto a la población de Linfocitos T CD8+ se observó que los días 70 y 90 presentaron porcentajes de coexpresión muy similares entre sí, pero menores a los encontrados en el día 120, donde se presentó la mayor expresión de PD-1 y TIM-3 (Figura 58).

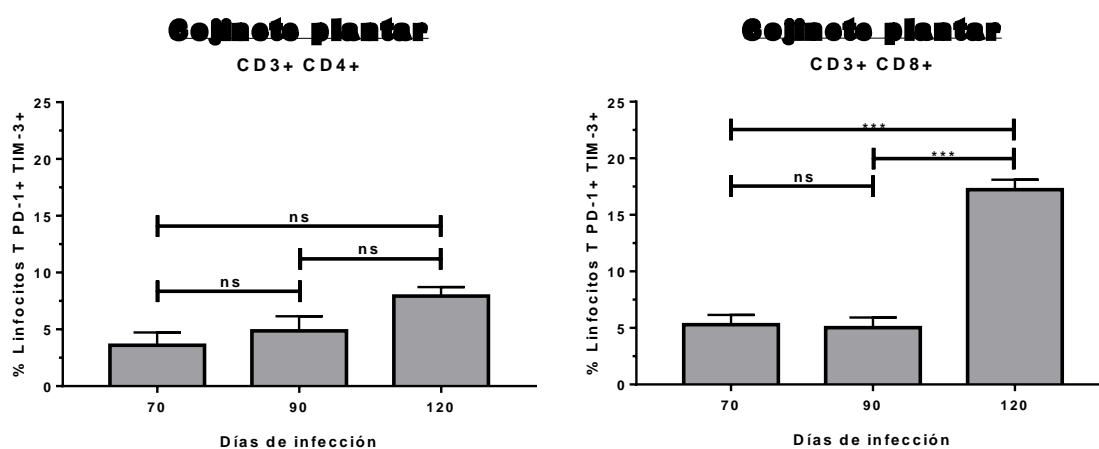


Figura 58. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en la fase crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Tukey (CD3+CD8+ *** p=0.0002).

Observando las fases aguda y crónica y la coexpresión de los receptores PD-1 y TIM-3 se encontró que el comportamiento de los porcentajes era progresivo, tanto en la población de Linfocitos T CD4+ como en la de Linfocitos T CD8+. Es decir, conforme avanzaba la infección, estos porcentajes aumentaban con el tiempo o se mantenían constantes. Era evidente que en los días pertenecientes a la fase crónica de la infección (día 70, 90 y 120) la coexpresión de estos receptores inhibidores estaba muy por encima de los porcentajes observados en la fase aguda (días 7 y 15) y en el grupo no infectado (alrededor de 5-10%). Un dato interesante, es que este patrón de expresión también se observó en los órganos linfoides mencionados anteriormente (bazo y ganglio poplíteo). Es de destacar que, en la población CD8+ la coexpresión de PD-1 y TIM-3 en el día 120 fue mucho más grande que la encontrada en cualquiera de los otros días estudiados (Figura 59).

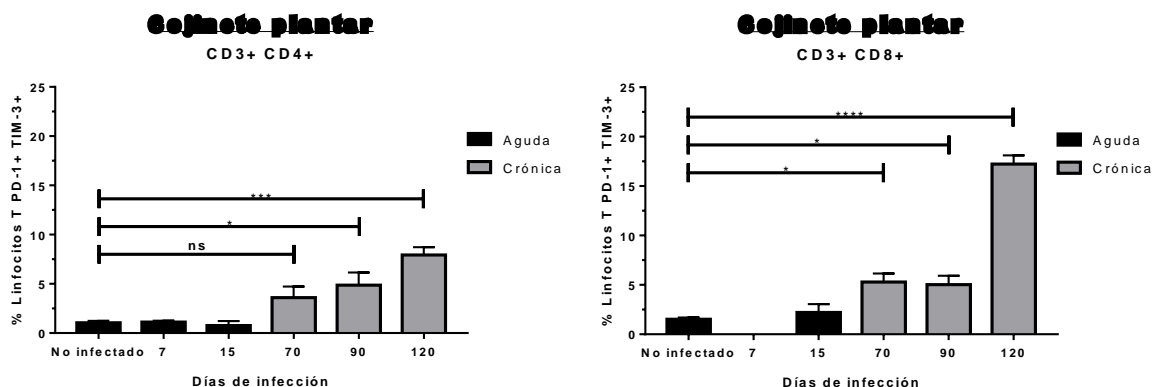


Figura 59. Expresión de PD-1 y TIM-3 por Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ presentes en el cojinete plantar en las fases aguda y crónica de la infección. A partir de las suspensiones celulares obtenidas del cojinete plantar a los diferentes días de infección señalados, se realizó el análisis por citometría de flujo para cuantificar la expresión de PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en el tejido infectado. ANOVA de una vía, Comparación múltiple de Dunnett (CD3+CD4+ * p=0.02, *** p=0.0002) (CD3+CD8+ * p=0.01. **** p=0.0001).

CAPÍTULO 8

Discusión

En infecciones crónicas causadas por virus, bacterias, así como en cáncer ha sido ampliamente reportado por diversos grupos de trabajo la presencia del fenotipo del Linfocito T agotado, tanto en el sitio de infección, como en lugares lejanos a este como en órganos linfoides y sangre periférica. Este agotamiento se ha demostrado tanto en modelos animales como en infecciones crónicas presentes en humanos, entre las más estudiadas encontramos a infecciones virales como VIH, HCV, HBV y LCMV;¹⁰² infecciones bacterianas causadas por *Salmonella spp* y *Mycobacterium tuberculosis*^{103,104}; y diversos tipos de cáncer entre los que destacan la leucemia mieloide crónica, cáncer colorrectal, sarcoma de Kaposi, entre otros. Sin duda alguna, la lista de enfermedades en donde se encuentra presente este tipo de Linfocito no funcional sigue en aumento^{42,105}.

Una de las características de este fenotipo de Linfocitos T agotado, que es considerada como un sello distintivo de éste, es la múltiple expresión sostenida de receptores inhibidores como PD-1, TIM-3, LAG-3, CTLA-4 entre otros; así como también el continuo estímulo antigénico presente en las infecciones crónicas^{35,42}.

Es por todo lo anterior mencionado que en este trabajo nos enfocamos primero: en demostrar la presencia de los Linfocitos T en el tejido infectado, así como en órganos linfoides; segundo: en detectar si en el modelo experimental por *N. brasiliensis* había una persistencia antigénica como la detectada en otras infecciones crónicas; y tercero: en cuantificar la expresión de los receptores inhibidores PD-1 y TIM-3 en las poblaciones de Linfocitos T. Todo esto con el propósito de dar una posible explicación a la persistencia de la infección y a los eventos inmunológicos que pudieran estar sucediendo durante el transcurso de esta.

La infección experimental por *Nocardia brasiliensis* ha sido ampliamente estudiada, y con las observaciones hechas a través de los años se ha podido determinar la presencia de diversas poblaciones celulares en el sitio de infección^{14,25,106}. Dentro

de estas podemos encontrar presentes a macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, y diversas subpoblaciones de Linfocitos T. Entre las subpoblaciones más estudiadas se encuentran la población de Linfocitos T CD4+ y T CD8+; las cuales desempeñan un papel muy importante en eliminar la infección, recordando que los Linfocitos T CD4+ de fenotipo Th1 son los encargados de eliminar a bacterias intracelulares, como es el caso de *N. brasiliensis*, así mismo los Linfocitos T CD8+ ayudan con la secreción de perforinas y granzimas para eliminar a las células que ya se encuentran infectadas por esta misma bacteria¹⁹. Por lo anterior en este trabajo nos enfocamos en evidenciar la presencia de estas dos poblaciones.

Si bien se han realizado varias investigaciones demostrando la presencia de diversas poblaciones celulares en el tejido infectado, muy pocas se han realizado para conocer la carga bacteriana presente durante el transcurso de la infección. Por esto mismo, en este trabajo se cuantificó la carga bacteriana presente en el sitio infectado conforme progresaba la infección, en las fases aguda y crónica. Así mismo, en los mismos días estudiados se determinó el volumen del cojinete plantar, es decir, del tejido infectado, como indicador de inflamación y del progreso de la infección.

Se encontró que las UFC presentes en el cojinete plantar fueron disminuyendo conforme progresaba la infección en la fase aguda, es decir, en el día 15 había menos UFC que las que existían en el día 7 y, por tanto, en el día 7 había menos UFC que con las que inicialmente se comenzó la infección. Sin embargo, una vez que se determinaron las UFC en la fase crónica, se observó un cambio drástico; donde en los días 70, 90 y 120 se observó un aumento cada vez un poco mayor en las UFC conforme progresaba la infección. Las UFC de la fase crónica eran un poco mayor que las encontradas en el día 7 de infección. Aquí es donde se comprueba que la bacteria siempre está presente en el sitio infectado y, aunque durante la fase aguda decline en cantidad, conforme progresa la infección, ésta aumenta en número y por tanto no se elimina; confirmando así que en el modelo experimental por *N.brasiliensis* hay una continua persistencia antigénica durante el curso de la

infección. Esto concuerda con muchos otros autores que han descrito la presencia de bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* en el sitio donde se desarrolla la infección; y se ha demostrado que solamente la persistencia del continuo estímulo antigénico es suficiente para desencadenar la transformación de Linfocitos T funcionales a Linfocitos T agotados. Además en estos mismos trabajos, una vez que es retirado el estímulo antigénico, los Linfocitos T restauran sus funciones efectores produciendo más citocinas proliferativas como la IL-2 y otras citocinas, como IFN- γ que ayudan a eliminar al patógeno^{107,108}.

A la persistencia bacteriana de *N. brasiliensis* se le pueden atribuir diversos factores de virulencia característicos de ésta; uno de ellos es la producción de enzimas como la catalasa y la oxido dismutasa, la producción de proteasas, la formación de macrófagos espumosos, así como la inducción de un ambiente inmunosupresor caracterizado por la presencia de las citocinas IL-10 y TGF- β ^{24,109,110}. Todos estos factores, podrían estar desencadenando la formación del fenotipo de agotamiento en los Linfocitos T, y todo en conjunto estar ayudando a que la infección persista y, por tanto, a que el patógeno no sea eliminado.

A los mismos días que se demostró que la bacteria estaba presente en el tejido infectado, también se cuantificaron las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y T CD8+ en el cojinete plantar, bazo y ganglio poplíteo.

En la fase aguda de la infección en bazo y en ganglio poplíteo encontramos que tanto en la población de Linfocitos T CD4+ como en la de Linfocitos T CD8+ existe un mayor número de estas células en comparación con la fase crónica, cabe mencionar que nuestros hallazgos son similares a los encontrados en otros trabajos publicados con el mismo modelo experimental. Este predominio en el bazo durante la infección aguda puede deberse a que, si bien *N. brasiliensis* es inmóvil y ocasiona una infección localizada, los antígenos solubles de la misma pueden llegar a bazo y ocasionar que los Linfocitos T presentes en se activen y proliferen para después viajar al sitio de infección y tratar de eliminar la bacteria. En lo que respecta a la fase crónica de la infección, pudimos observar que en ambas poblaciones linfocitarias los porcentajes, así como los números absolutos sufrieron una disminución drástica

al comparar con la fase aguda. Esto puede explicarse debido a la persistencia antigénica que se puede estar presentando, en varios grupos de trabajo se ha establecido que cuando una célula está en constante contacto con el antígeno, como ocurre en las infecciones crónicas, esta célula tiene una probabilidad muy alta de perder su capacidad proliferativa, así como de perder la capacidad de respuesta a interleucinas proliferativas como la IL-2; y en el caso de Linfocitos T de memoria se pierde la capacidad de respuesta a la IL-7 e IL-15, convirtiendo su renovación dependiente de antígeno^{42,111,112}. Por todo lo anterior mencionado, la disminución en las poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ se puede deber al constante estímulo antigénico de los antígenos solubles de *N. brasiliensis* que llegan hasta este órgano linfoide. Ocasionando así que los Linfocitos T presentes en el bazo no reaccionen a citocinas proliferativas y por lo tanto pierdan su capacidad de proliferar, disminuyendo los números de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+. Otra posible explicación, que no descarta lo mencionado anteriormente, es que una proporción de Linfocitos T efectores este migrando constantemente al tejido infectado para así ayudar a tratar de eliminar la infección y al antígeno causante de la misma. Este patrón de comportamiento ya ha sido demostrado en el bazo, donde los Linfocitos T residentes de la pulpa blanca que reconocen antígenos presentes en la sangre son capaces de activarse y proliferar para después viajar al sitio de infección y ayudar a eliminar la misma¹¹³.

En el ganglio poplíteo puede estar ocurriendo algo similar a lo observado en el bazo, cabe recordar que este ganglio es el de drenaje, ya que es el más próximo al sitio de infección. Por tanto, a este órgano linfoide pueden estar llegando estos mismos antígenos solubles vía sistema linfático o a través de células presentadoras de antígenos. Por tanto, es de esperar que, en la fase aguda de la infección, que es cuando se lleva el reconocimiento del antígeno, se presenten mayores cantidades de Linfocitos T; ya que al estarse activando estos van a estar en constante proliferación para después a través de los vasos eferentes viajar al sitio donde está localizada la infección para así tratar de eliminar al patógeno. En cuanto a la fase crónica en este órgano linfoide se observó que al igual que en bazo, los números de células conformando a las poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ disminuyeron

en comparación con la fase aguda de la infección. Sin embargo, a pesar de esta disminución en los días 70 y 90, en el día 120 se observó un aumento de estas poblaciones celulares, alcanzando así los niveles observados en la fase crónica de la infección. Este comportamiento puede deberse en un inicio a que en el sitio de la lesión es cada vez más grande la demanda de Linfocitos T para tratar de eliminar la infección y erradicar a *N. brasiliensis*, y cómo el órgano linfoide más próximo es el ganglio poplíteo, es de dónde provienen la mayoría de los Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en el sitio de la infección. Sin embargo, se puede apreciar que los esfuerzos por eliminar la infección por parte de los Linfocitos T no son suficientes, ya que el sitio de la lesión presenta diariamente más inflamación, ocasionando la deformidad del tejido infectado y comenzando a secretar gránulos que son evidencia de que el patógeno sigue estando presente en la fase crónica de la infección.

Un patrón de comportamiento diferente al observado en bazo y en ganglio poplíteo se encontró en el cojinete plantar. En la población de Linfocitos T CD4+ se observó que los porcentajes de la fase aguda eran mayores que los que existieron en la fase crónica. Sin embargo, al observar los números absolutos de células conformando esta población se encontró que los días 15, 70 y 120 compartían números absolutos similares, es decir, un día de la fase aguda y dos días de la fase crónica tenían prácticamente los mismos números. Estas diferencias se pueden explicar por el hecho de que los porcentajes comúnmente son utilizados para darnos una idea de qué células se encuentran en mayor proporción dentro de una población determinada; sin embargo, los números absolutos nos indican la cantidad real de células que se encuentran conformando las poblaciones. Por otro lado, en cuanto a la población de Linfocitos T CD8+ las diferencias entre porcentajes y números absolutos fueron casi nulas, teniendo un comportamiento prácticamente similar en ambos casos. Aquí, la fase crónica de la infección es la que presentó la mayor proporción de esta población en comparación a la fase aguda.

Para dar una posible explicación al patrón de comportamiento observado en ambas poblaciones celulares es necesario recordar que desde hace años atrás es bien conocido que normalmente en los tejidos periféricos de cualquier organismo no se

encuentran en gran cantidad Linfocitos T, y en presencia de lo reconocido como extraño, en estos tejidos la respuesta es más lenta debido a que las células presentadoras de antígenos tienen que viajar al órgano linfoide más cercano para activar a los Linfocitos T y comenzar a proliferar; posteriormente los Linfocitos T efectores se dirigirán al sitio de infección para tratar de eliminar al patógeno causante de la misma⁵². Esto concuerda con los datos observados durante el transcurso de la infección; donde en la fase aguda de la infección se encontraron en menos cantidad ambas poblaciones linfocitarias, ya que el tiempo que transcurre desde que la célula presentadora de antígenos viaja al órgano linfoide más cercano y comienza la activación, proliferación y migración del Linfocito T, es el tiempo que nos tardamos en observar el aumento de estas poblaciones celulares en el sitio de la infección.

Por consiguiente, en los días 15, 70 y 120 era de esperarse que existiera un mayor número de Linfocitos T presentes en el tejido infectado, ya que para esta etapa de la infección en este trabajo se demostró que existe persistencia antigénica continua, y por tanto, Linfocitos T que continuamente están siendo activados, para después proliferar y migrar de órganos linfoides secundarios hacía el sitio donde se encuentra el patógeno. Esto concuerda con la disminución observada de las poblaciones linfocitarias en ganglio poplíteo y bazo durante la fase crónica de la infección; dando una posible explicación al aumento de los Linfocitos T en el cojinete plantar. También existe la posibilidad de que Linfocitos T de memoria formados durante la fase aguda de la infección pudieran estar presentes en el sitio infectado, ya que se ha publicado de manera reciente que en diversas infecciones crónicas está presente este fenotipo de memoria, sin embargo, éste se encuentra alterado de manera metabólica, genética y funcional^{114,115}.

De esta manera se puede confirmar que, aunque la infección siga progresando, indudablemente estas células inmunitarias están presentes en el sitio infectado para tratar de eliminar al patógeno y por tanto la patología. Sin embargo, los mecanismos efectores de estos Linfocitos T, si es que existen, no son suficientes para detener la infección.

Este comportamiento es compatible con el observado en varias infecciones crónicas virales y en la infección por *M. tuberculosis*, donde se ha demostrado que tanto en pacientes con la infección activa, así como en modelos experimentales las poblaciones de Linfocitos T aumentan en el sitio de infección, y en órganos linfoides secundarios^{108,116}. Demostrando que, aunque estas células estén presentes en los tejidos infectados, estas no son suficientes para erradicar la infección. Por consiguiente, tanto mecanismos evasores de la bacteria como disfunciones en los Linfocitos T podrían ser la causa de la persistencia antigénica y de que la infección no sea eliminada.

Una vez que se cuantificó la población de Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ se procedió a examinar la presencia de los receptores inhibidores PD-1 y TIM-3 en cada población linfocitaria. En este análisis se cuantificaron las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ que eran positivas para la expresión de PD-1 y negativas para la de TIM-3 (PD-1+ TIM-3-), también cuando se presentaba el caso contrario donde los Linfocitos T CD4+ y CD8+ eran positivas para la expresión de TIM-3 y negativas para la de PD-1 (PD-1- TIM-3+); y finalmente se cuantificaron las poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ positivas para ambos receptores (PD-1+ y TIM-3+). Todas estas poblaciones fueron identificadas tanto en cojinete plantar como en bazo y ganglio poplíteo.

En todos los tejidos analizados, es decir, en bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar del grupo no infectado se encontró una expresión basal de los receptores PD-1 y TIM-3; sin embargo, no se observó una subpoblación positiva para la coexpresión de estos dos receptores cuando se analizaron las muestras. Es bien conocido desde finales de los años 90 que el receptor PD-1 se expresa en cantidades pequeñas en varios tipos celulares, entre los que destacan los Linfocitos T, esta baja expresión está asociada al mantenimiento de la tolerancia inmunológica en tejidos periféricos, previniendo así el reconocimiento de lo propio como ajeno y por tanto evitando reacciones inmunológicas innecesarias^{117,118}. Esto ha sido demostrado en varios modelos experimentales, en donde se ha observado que ratones knock out para el gen de PD-1 (*Pdcd1*^{-/-}) desarrollan enfermedades autoinmunes severas, además al

momento de inducir algún tipo de infección, estos ratones no logran controlar a tal y mueren en cuestión de días, esto debido a la inflamación severa presente en el animal a causa de la ausencia del receptor¹¹⁹. Una situación similar ocurre en ausencia de TIM-3, cuando se utilizan anticuerpos monoclonales para bloquear la expresión de este receptor, así como cuando se utilizan modelos knock out para TIM-3 se observa un deterioro en la salud de los animales, así como el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple; además está demostrado que los Linfocitos Th1 se muestran hiperreactivos y existe un aumento en las citocinas IL-12 e IFN- γ provocando una inflamación constante^{120,121}. Comprobando que el receptor TIM-3 también tiene un papel importante en la regulación de las respuestas inmunes y en ayudar a mantener la tolerancia inmunológica en tejidos periféricos.

En lo que respecta a los días 7 y 15 de infección en los tres tejidos estudiados se encontró un patrón de comportamiento similar para la expresión del receptor PD-1. Donde se observó que tanto para la población de Linfocitos T CD4+ como para la de Linfocitos T CD8+ la expresión iba aumentando conforme progresaba la infección; por tanto, en el día 15 fue donde se obtuvo un mayor porcentaje de expresión de PD-1. Esto concuerda con la función inmunorreguladora que posee este receptor, aparte de participar en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, PD-1 posee características que le conceden regular las respuestas inmunes tardías de los Linfocitos T para mantener el autocontrol a la patología.

En una infección aguda, una vez que el patógeno es eliminado, PD-1 se expresa en cantidades altas y de una manera transitoria en los Linfocitos T encargados previamente de eliminar al patógeno, esto con el fin de controlar la magnitud de la respuesta inmune parando las respuestas efectoras ejercidas por estos Linfocitos, mediante diferentes mecanismos, entre los que destacan: inhibir la proliferación celular, disminuir la capacidad de producción de citocinas como IFN- γ y anular la capacidad citotóxica de los Linfocitos T; todo esto para que posteriormente el sistema inmune pueda volver a la homeostasia^{78,119}.

Es por esto por lo que en el día 15 de infección es donde se encontró un mayor porcentaje de expresión de PD-1, ya que en la infección experimental en el cojinete plantar se observó un decline en el volumen de este y por tanto del estado inflamatorio del tejido infectado. Con estas observaciones se podría decir que la expresión aumentada de PD-1 se debe a que el sistema inmune ya no detecta más bacteria presente en el tejido y por ende, “cree” que el patógeno ha sido eliminado, es por esto que, mediante el aumento de la expresión de PD-1 se está tratando de parar las respuestas inmunes efectoras ejercidas por los Linfocitos T para que posteriormente ocurra todo el proceso de homeostasis y el organismo pueda volver a su equilibrio natural. Esta función de PD-1 de controlar la magnitud de las respuestas inmunes ha sido propuesta por varios autores, sin embargo, hasta el día de hoy no ha sido completamente comprendida.

Por otro lado, en cuanto a la fase crónica de la infección, en el bazo, ganglio poplíteo y cojinete plantar se encontró que en las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en los días 70, 90 y 120 pertenecientes a esta fase presentaban un aumento importante en la expresión de PD-1 en comparación con los días de fase aguda y el grupo no infectado. También se observó que la población linfocitaria positiva para PD-1 y negativa para TIM-3 era la más abundante en comparación con la población de Linfocitos T PD-1- TIM3+ y con la población en donde se encontraba la coexpresión PD-1+ TIM-3+. Estas observaciones concuerdan con varios autores que han demostrado que en infecciones crónicas virales, bacterianas o causadas por parásitos las células expresando PD-1 aumentan, en conjunto la cantidad de este receptor en las membranas de los Linfocitos T CD4+ y CD8+ también aumenta drásticamente^{81,122-124}. Esta expresión aumentada está ampliamente relacionada con diversos factores que ayudan al desarrollo del fenotipo de Linfocito T agotado. Uno de estos factores, es el estímulo antigénico constante; se ha observado en diversas investigaciones que la carga bacteriana está directamente relacionada con el aumento en la expresión de PD-1, y si bien la expresión por sí sola de este receptor no es indicador de agotamiento, se ha demostrado que los Linfocitos T que presentan a este receptor en cantidades aumentadas y constantes son más propensos a expresar una gran cantidad de receptores inhibidores y por

consiguiente ir perdiendo gradualmente sus capacidades efectoras hasta transformarse en Linfocitos T no funcionales o agotados^{107,125}. Además, se ha demostrado que el bloqueo utilizando anticuerpos monoclonales contra PD-1 restaura las funciones efectoras de los Linfocitos T CD4+ y CD8+. En estos Linfocitos T se observa un aumento en la producción de citocinas y en su capacidad proliferativa, además en diversos trabajos en la infección con *M. tuberculosis* se ha observado que los Linfocitos T CD8+ recuperan su capacidad citotóxica aumentando la secreción de granzimas y perforinas^{83,84,108}.

Patrones de comportamiento totalmente contrarios fueron las que encontramos al observar la expresión del receptor TIM-3 durante los diferentes días de infección estudiados. Esto se debe a que se ha observado que la función de este receptor es totalmente dependiente del contexto donde se encuentre; es decir, va a depender de la célula donde se encuentre expresado, así como del ambiente de citocinas presente y del patógeno en particular que se quiere eliminar⁸⁸.

Ya hemos comentado a lo largo del texto que TIM-3 tiene ciertas características que lo ayudan a mantener la tolerancia inmunológica, sin embargo, esta no es la única función que posee este receptor. Recientemente se ha demostrado que TIM-3, aparte de estar asociado con el fenotipo de agotamiento en infecciones crónicas, también puede funcionar como co-estimulador en infecciones agudas; es decir, su presencia en ciertos tipos celulares ayuda a mejorar la función microbicida de células inmunes, así como a producir y secretar más citocinas del tipo Th1 con el fin de eliminar a patógenos y células afectadas que están ocasionando la enfermedad⁸⁵.

Es por esto por lo que, se puede explicar que en los tres tejidos estudiados la expresión de TIM-3 durante la fase aguda de la infección tuviera porcentajes mucho mayores que los observados en la fase crónica. Durante el día 7 de infección se presentó un aumento en la expresión de este receptor en comparación con el grupo no infectado, y el día 15 fue en el que se observó el mayor porcentaje de TIM-3 de todos los días estudiados. Este patrón se puede deber a que durante la infección aguda el día 7 es donde generalmente se observa un pico de inflamación en el tejido

infectado debido a que el sistema inmune está tratando de eliminar a la bacteria causante de la infección. En varios estudios se ha demostrado que durante infecciones agudas los Linfocitos Th1 expresan cantidades aumentadas de TIM-3, y este receptor al interactuar con su ligando la Galectina-9 presente en células como los macrófagos, aumenta las funciones microbicidas de estas células inmunes e incrementa la secreción de la citocina IFN- γ ayudando a eliminar a bacterias intracelulares^{92,94}. Por otro lado, cabe recordar que una de las funciones por las cuales se dio a conocer TIM-3, fue por su capacidad para inducir la muerte celular en los Linfocitos Th1 y Tc1 y así detener las respuestas efectoras de estos⁸⁶. Esto explicaría el aumento en la expresión de este receptor en el día 15 de infección; en donde se observó que los números de Linfocitos T que expresan TIM-3 eran mayores en comparación con los demás días de infección estudiados. En este día en particular, también se observó una disminución en el volumen del tejido infectado y por lo tanto, también en la inflamación prominente observada en días anteriores, junto con todos los factores causantes de esta. Es por esto por lo que la expresión alta de este receptor en el día 15 puede estar indicando que los Linfocitos T presentes tanto en el tejido infectado como en bazo y ganglio poplíteo están siendo inducidos a parar sus respuestas efectoras mediante apoptosis, y, por tanto, el proceso inflamatorio está casi ausente a partir de este día. Este comportamiento concuerda con varios autores que han demostrado que la presencia de este receptor induce apoptosis en los Linfocitos T secretores de IFN- γ , es decir, Linfocitos Th1, esta muerte celular inducida ha sido ampliamente reportada en infecciones virales, así como en infecciones bacterianas. Así mismo, varios autores destacan que el comportamiento de TIM-3 es exclusivamente dependiente del contexto de donde se encuentre expresado, es decir: el tipo celular presente, las citocinas secretadas y el estímulo antigénico^{77,126}.

Por otro lado, la presencia de los Linfocitos T expresando TIM-3 en la fase crónica de la infección eran casi imperceptibles, incluso, en algunos días estudiados no se encontraron Linfocitos T PD-1- TIM-3+. A pesar de que la expresión por sí sola de este receptor ha sido asociado con el fenotipo de agotamiento en varias infecciones crónicas, en el caso de la infección por *N.brasiliensis* no se encontró dicha

asociación. Ya que los Linfocitos T que solo expresaban a este receptor no fueron abundantes en los días 70, 90 y 120 pertenecientes a la fase crónica. Esto puede deberse a que debido a la naturaleza de la infección se pueden estar expresando con mayor abundancia otros tipos de receptores inhibidores como lo son CTLA-1, LAG-3, BTLA entre otros.

Es de vital importancia recordar que la expresión de cualquier receptor inhibidor es dependiente exclusivamente del proceso infeccioso y que intervienen diversos factores a considerar como lo son el tipo de patógeno que el organismo está tratando de eliminar, los mecanismos evasores que este utiliza para establecer la infección, el ciclo de vida de este, la duración de la infección, así como diversos factores de virulencia característicos de cada agente infeccioso. Es por todo lo anterior, que aunque en la infección por *N.brasiliensis* no se presenten Linfocitos T expresando únicamente TIM-3, pueden estarse expresando otros receptores no analizados en este trabajo causando la persistencia de la infección e impidiendo que los Linfocitos T sean capaces de eliminar al agente infeccioso.

En cuanto a la coexpresión de PD-1 y TIM-3 se observó que, en el grupo no infectado, así como en los días pertenecientes a la fase aguda de la infección los porcentajes eran más bajos que los encontrados en la fase crónica. Hay que recordar que anteriormente ya se expuso que estos dos receptores, además de que están asociados al fenotipo de Linfocito T agotado, cumplen con funciones positivas en el mantenimiento de la tolerancia periférica y modulan la magnitud de las respuestas inmunes una vez que el patógeno ha sido eliminado. Estas diversas funciones podrían estar explicando la coexpresión baja de estos dos receptores en el grupo no infectado y en la fase aguda. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la infección por LCMV, donde se demostró que utilizando la cepa LCMV Arm que ocasiona una infección aguda estos receptores se expresan en los Linfocitos T CD4+ y CD8+ pero de una manera transitoria, ya que después del día 15 de infección la población linfocitaria PD-1+ TIM-3+ desaparece, además la expresión de estos receptores ocurre a una proporción muy baja a cuando es comparada con la cepa LCMV Clone-13 que ocasiona la infección crónica, donde

se observa que la coexpresión de estos receptores por los Linfocitos T es hasta cinco veces mayor que en la infección aguda y esta población linfocitaria no desaparece y persiste durante la infección crónica, a diferencia de lo observado anteriormente, además esta coexpresión está asociada a la disfunción de los mismos⁵⁹.

En contraste, en la fase crónica de la infección observamos que la coexpresión de PD-1 y TIM-3 se encontraba aumentada en los Linfocitos T CD4+ y CD8+, de estas dos poblaciones y es de destacar que la población linfocitaria CD8+ presentaba una expresión más alta de estos receptores en comparación con los Linfocitos T CD4+. Además, los Linfocitos T positivos para PD-1 y para TIM-3 eran más abundantes en el tejido infectado que en el bazo o en el ganglio poplíteo. Esto concuerda con varios estudios donde se ha demostrado que en infecciones crónicas virales y bacterianas los Linfocitos T que coexpresan varios receptores inhibidores se encuentran en altas proporciones en el tejido que se encuentra infectado^{40,58}.

Existen varias investigaciones donde específicamente la expresión dual de los receptores PD-1 y TIM-3 está íntimamente relacionada con el agotamiento de los Linfocitos T CD4+ y CD8+. En el caso de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria intracelular al igual que *N.brasiliensis*, se ha observado que existen diferentes poblaciones linfocitarias expresando uno o más receptores inhibidores, y se ha demostrado que la población de Linfocitos T PD-1+ TIM-3+ está asociado al fenotipo de agotamiento, ya que estas células pierden su capacidad proliferativa, la secreción de IFN- γ e IL-2 se encuentra disminuida y en contraste, producen y secretan más citocinas inmunosupresoras como la IL-10. Otro punto para sumar es que esta misma población linfocitaria expresa más receptores inhibidores en su membrana y conforme la infección progresa aumenta su expresión. En contraste cuando se utilizan anticuerpos monoclonales para bloquear la expresión del receptor TIM-3, se observó que la carga bacteriana se reduce y que las funciones de los Linfocitos T pueden ser restauradas. Por lo que se puede decir que esta coexpresión es uno de los principales motivos por los cuales los Linfocitos T se encuentran en un estado disfuncional⁵⁸.

Esta coexpresión y su relación con los Linfocitos T agotados también ha sido reportada en diversos tipos de cáncer, como es el cáncer de tiroides, melanomas y diversos tipos de leucemias. Así mismo en infecciones virales como VIH, HCV, y LCMV. En todas estas patologías se ha confirmado que la expresión dual de los receptores PD-1 y TIM-3 está relacionada con la falta de respuesta de los Linfocitos T CD4+ y CD8+ y por tanto con la persistencia de la infección; ya que en diversos experimentos se ha podido observar que estos Linfocitos T PD-1+ TIM-3+ son deficientes en la secreción de citocinas proliferativas como la IL-2 y las que promueven la eliminación del patógeno como IFN- γ , además de disminuir su capacidad citotóxica en el caso de los Linfocitos T CD8+, así como de producir y secretar más IL-10 promoviendo un ambiente inmunosupresor^{127,128}. Es de destacar que en la coinfección HCV/VIH se ha demostrado que la expresión dual de estos receptores está íntimamente relacionada con la progresión de la enfermedad en el hígado; otro caso similar ocurre en la infección por LCMV donde se ha probado que esta coexpresión define a una población de Linfocitos T disfuncionales⁴⁴.

Así mismo, en el modelo experimental utilizado en este trabajo se ha confirmado la presencia de Interleucinas como la IL-10, IL-17 y la citocina TGF- β , todas estas citocinas inmunosupresoras, por lo cual se puede afirmar que *N.brasiliensis* provoca un ambiente inmunosupresor, lo que ocasiona que la bacteria no sea eliminada por las células inmunes presentes y por tanto que la infección se establezca y perdure hasta ocasionar la destrucción del tejido y la pérdida de la función del órgano afectado.

Este ambiente inmunosupresor demostrado, sumado a la constante persistencia antigénica presente y a la coexpresión de los receptores inhibidores PD-1 y TIM-3 son indicadores de que tanto en el tejido infectado como en el bazo y el ganglio poplíteo es muy probable la presencia de Linfocitos T CD4+ y CD8+ agotados; ya que en trabajos anteriores y en este se ha demostrado que los Linfocitos T sí están presentes en estos tejidos, sin embargo, no son suficientes para eliminar al patógeno y la infección sigue progresando. Por tanto, sería de vital importancia considerar el análisis de otros receptores inhibidores, así como la capacidad

proliferativa y citotóxica de los Linfocitos T. Un punto adicional por probar sería el bloqueo mediante anticuerpos monoclonales de estos receptores para observar si de esta manera se restauran las funciones efectoras de los Linfocitos T y si estos receptores son los causantes de que estas células no funcionen correctamente.

CAPÍTULO 9

Conclusión

En el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* existe un aumento en la expresión de PD-1 y TIM-3 en Linfocitos T presentes en el sitio de la lesión y órganos linfoides, los cuales podrían desempeñar un papel importante en la persistencia de la infección.

CAPÍTULO 11

Perspectivas

- Analizar la expresión de otros receptores inhibidores (LAG-3, CTLA-4, 2B4) en los Linfocitos T CD4+ y CD8+.
- Estudiar el potencial proliferativo de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en el tejido infectado y en órganos linfoides.
- Analizar la expresión de los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2) y TIM-3 (Galectina-9).
- Definir las vías de señalización utilizadas por los receptores PD-1 y TIM-3 durante las fases aguda y crónica de la infección.
- Utilizar anticuerpos monoclonales para bloquear la interacción de PD-1 y TIM-3 con sus ligandos.

Bibliografía

1. López-Martínez, R. *et al.* Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gac. Médica México* **7**.
2. Zijlstra, E. E. *et al.* Mycetoma: a unique neglected tropical disease. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 100–112 (2016).
3. Fahal, A. H. Mycetoma: a thorn in the flesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **98**, 3–11 (2004).
4. Welsh, O., Vera-Cabrera, L. & Salinas-Carmona, M. C. Mycetoma. *Clin. Dermatol.* **25**, 195–202 (2007).
5. Corti, E. & Villafafie, F. Review Nocardiosis: a review. **8**.
6. Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Welsh, E. & Salinas, M. C. Actinomycetoma and advances in its treatment. *Clin. Dermatol.* **30**, 372–381 (2012).
7. Hay, R. J., Mahgoub, E. S., Leon, G., Al-Sogair, S. & Welsh, O. Mycetoma. *Med. Mycol.* **30**, 41–49 (1992).
8. Murray, P. R. & American Society for Microbiology. *Manual of clinical microbiology*. (ASM Press, 1999).
9. Conville, P. S., Brown-Elliott, B. A., Smith, T. & Zelazny, A. M. The Complexities of Nocardia Taxonomy and Identification. *J. Clin. Microbiol.* **56**, e01419-17 (2017).
10. Welsh, O. Mycetoma.: Current Concepts in Treatment. *Int. J. Dermatol.* **30**, 387–398 (1991).
11. McNeil, M. M. & Brown, J. M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 357–417 (1994).
12. Salinas-Carmona, M. C., Torres-Lopez, E., Ramos, A. I., Licon-Trillo, A. & Gonzalez-Spencer, D. Immune Response to Nocardia brasiliensis Antigens in an Experimental Model of Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* **67**, 2428–2432 (1999).
13. Salinas-Carmona, M. C. Nocardia brasiliensis: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect.* **2**, 1373–1381 (2000).
14. Solis-Soto, J. M. *et al.* In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with Nocardia brasiliensis. *Histol. Histopathol.* **23**, 573–581 (2008).

15. Kaufmann, S. H. E. Immunity to Intracellular Bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 129–163 (1993).
16. Gonzalez-Suarez, M. L., Salinas-Carmona, M. C. & Pérez-Rivera, I. IgM but not IgG monoclonal anti- *Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **57**, 17–24 (2009).
17. Salinas-Carmona, M. C. & Pérez-Rivera, I. Humoral Immunity through Immunoglobulin M Protects Mice from an Experimental Actinomycetoma Infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect. Immun.* **72**, 5597–5604 (2004).
18. Mahgoub, E. S. Experimental infection of athymic nude New Zealand mice, nu nu strain with mycetoma agents. *Sabouraudia* **16**, 211–216 (1978).
19. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. In *m u n o l o g í a celular y molecular*. 532.
20. Deem, R. L., Beaman, B. L. & Gershwin, M. E. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. *Infect. Immun.* **38**, 914–920 (1982).
21. Folb, P. I., Timme, A. & Horowitz, A. *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and in other inbred mouse strains. *Infect. Immun.* **18**, 459–466 (1977).
22. Vera-Cabrera, L., Rodríguez-Quintanilla, M. A., Boiron, P., Salinas-Carmona, M. C. & Welsh, O. Experimental Mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats. *J. Mycol.* **8**, 183–187 (1998).
23. Dawi, A. F. A. *et al.* The association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles and the occurrence of eumycetoma in Sudanese patients. 7.
24. Rosas-Taraco, A. G., Perez-Liñan, A. R., Bocanegra-Ibarias, P., Perez-Rivera, L. I. & Salinas-Carmona, M. C. *Nocardia brasiliensis* Induces an Immunosuppressive Microenvironment That Favors Chronic Infection in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* **80**, 2493–2499 (2012).
25. Salinas-Carmona, M. C., Rosas-Taraco, A. G. & Welsh, O. Systemic increased immune response to *Nocardia brasiliensis* co-exists with local immunosuppressive microenvironment. *Antonie Van Leeuwenhoek* **102**, 473–480 (2012).

26. Nathan, C. F., Murray, H. W. & Cohn, Z. A. The Macrophage as an Effector Cell. *N. Engl. J. Med.* **303**, 622–626 (1980).
27. Beamer, G. L. *et al.* Interleukin-10 Promotes *Mycobacterium tuberculosis* Disease Progression in CBA/J Mice. *J. Immunol.* **181**, 5545–5550 (2008).
28. Pasche, B. *et al.* Sex-Dependent Susceptibility to *Listeria monocytogenes* Infection Is Mediated by Differential Interleukin-10 Production. *Infect. Immun.* **73**, 5952–5960 (2005).
29. Pie, S., Matsiota-Bernard, P., Truffa-Bachi, P. & Nauciel, C. Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and resistant mice during the early phase of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.* **64**, 849–854 (1996).
30. Castellino, F. *et al.* Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell–dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890–895 (2006).
31. Williams, M. A., Tyznik, A. J. & Bevan, M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* **441**, 890–893 (2006).
32. Elsaesser, H., Sauer, K. & Brooks, D. G. IL-21 Is Required to Control Chronic Viral Infection. *Science* **324**, 1569–1572 (2009).
33. Yi, J. S., Cox, M. A. & Zajac, A. J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion: T-cell exhaustion. *Immunology* **129**, 474–481 (2010).
34. Kaech, S. M., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 251–262 (2002).
35. Okoye, I. S., Houghton, M., Tyrrell, L., Barakat, K. & Elahi, S. Coinhibitory Receptor Expression and Immune Checkpoint Blockade: Maintaining a Balance in CD8+ T Cell Responses to Chronic Viral Infections and Cancer. *Front. Immunol.* **8**, 1215 (2017).
36. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* **173**, 1099–1109 (1991).

37. Zimmerli, S. C. *et al.* HIV-1-specific IFN- γ /IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7239–7244 (2005).
38. Kaech, S. M. & Ahmed, R. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat. Immunol.* **2**, 415–422 (2001).
39. Fuertes Marraco, S. A., Neubert, N. J., Verdeil, G. & Speiser, D. E. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
40. Wykes, M. N. & Lewin, S. R. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 91–104 (2018).
41. Baumeister, S. H., Freeman, G. J., Dranoff, G. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 539–573 (2016).
42. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).
43. Fourcade, J. *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med.* **207**, 2175–2186 (2010).
44. Vali, B. *et al.* HCV-specific T cells in HCV/HIV co-infection show elevated frequencies of dual Tim-3/PD-1 expression that correlate with liver disease progression. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2493–2505 (2010).
45. Sakhdari, A. *et al.* Tim-3 Negatively Regulates Cytotoxicity in Exhausted CD8⁺ T Cells in HIV Infection. *PLoS ONE* **7**, e40146 (2012).
46. Larsen, M. *et al.* Exhausted Cytotoxic Control of Epstein-Barr Virus in Human Lupus. *PLoS Pathog.* **7**, e1002328 (2011).
47. Davis, M. M. & Bjorkman, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**, 395–402 (1988).
48. Piccirillo, C. A. & Shevach, E. M. Cutting Edge: Control of CD8⁺ T Cell Activation by CD4⁺ CD25⁺ Immunoregulatory Cells. *J. Immunol.* **167**, 1137–1140 (2001).

49. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
50. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12**, 492–499 (2011).
51. Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 749–761 (2012).
52. Masopust, D. & Schenkel, J. M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 309–320 (2013).
53. McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S. & Wherry, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 457–495 (2019).
54. Jin, H.-T., Jeong, Y.-H., Park, H.-J. & Ha, S.-J. Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. *BMB Rep.* **44**, 217–231 (2011).
55. Pauken, K. E. & Wherry, E. J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* **36**, 265–276 (2015).
56. Wang, C., Singer, M. & Anderson, A. C. Molecular Dissection of CD8 + T-Cell Dysfunction. *Trends Immunol.* **38**, 567–576 (2017).
57. Hui, E. *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. *Science* **355**, 1428–1433 (2017).
58. Jayaraman, P. *et al.* TIM3 Mediates T Cell Exhaustion during Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLOS Pathog.* **12**, e1005490 (2016).
59. Jin, H.-T. *et al.* Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 14733–14738 (2010).
60. Crawford, A. *et al.* Molecular and Transcriptional Basis of CD4+ T Cell Dysfunction during Chronic Infection. *Immunity* **40**, 289–302 (2014).
61. Kaufmann, D. E. *et al.* Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat. Immunol.* **8**, 1246–1254 (2007).
62. Kahan, S. M., Wherry, E. J. & Zajac, A. J. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* **479–480**, 180–193 (2015).

63. Zajac, A. J. *et al.* Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *J. Exp. Med.* **188**, 2205–2213 (1998).
64. Doering, T. A. *et al.* Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. *Immunity* **37**, 1130–1144 (2012).
65. Matloubian, M., Concepcion, R. J. & Ahmed, R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J. Virol.* **68**, 8056–8063 (1994).
66. Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. & Ahmed, R. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *J. Virol.* **77**, 4911–4927 (2003).
67. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.* **10**, 29–37 (2009).
68. Bucks, C. M., Norton, J. A., Boesteanu, A. C., Mueller, Y. M. & Katsikis, P. D. Chronic Antigen Stimulation Alone Is Sufficient to Drive CD8 + T Cell Exhaustion. *J. Immunol.* **182**, 6697–6708 (2009).
69. Brooks, D. G. Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. *J. Clin. Invest.* **116**, 1675–1685 (2006).
70. Streeck, H. *et al.* Antigen Load and Viral Sequence Diversification Determine the Functional Profile of HIV-1–Specific CD8p T Cells. *PLoS Med.* **5**, 15 (2008).
71. Kasprovicz, V. *et al.* Hepatitis C Virus (HCV) Sequence Variation Induces an HCV-Specific T-Cell Phenotype Analogous to Spontaneous Resolution. *J. Virol.* **84**, 1656–1663 (2010).
72. Honda, T. *et al.* Tuning of Antigen Sensitivity by TCRT Cell Receptor-Dependent Negative Feedback Controls T Cell Effector Function in Inflamed Tissues. *Immunity* **40**, 235–247 (2014).
73. Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S. & Honjo, T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat. Immunol.* **14**, 1212–1218 (2013).

74. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J. Immunol.* **173**, 945–954 (2004).
75. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T. & Honjo, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13866–13871 (2001).
76. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* **209**, 1201–1217 (2012).
77. *Negative Co-Receptors and Ligands*. vol. 350 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
78. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
79. Utzschneider, D. T. *et al.* T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. *Nat. Immunol.* **14**, 603–610 (2013).
80. Duraiswamy, J. *et al.* Phenotype, Function, and Gene Expression Profiles of Programmed Death-1^{hi} CD8 T Cells in Healthy Human Adults. *J. Immunol.* **186**, 4200–4212 (2011).
81. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
82. Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350–354 (2006).
83. Freeman, G. J., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Sharpe, A. H. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1–PD-1 ligand blockade. *J. Exp. Med.* **203**, 2223–2227 (2006).
84. Nakamoto, N. *et al.* Functional Restoration of HCV-Specific CD8 T Cells by PD-1 Blockade Is Defined by PD-1 Expression and Compartmentalization. *Gastroenterology* **134**, 1927-1937.e2 (2008).

85. Sakuishi, K., Jayaraman, P., Behar, S. M., Anderson, A. C. & Kuchroo, V. K. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. *Trends Immunol.* **32**, 345–349 (2011).
86. Zhu, C. *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* **6**, 1245–1252 (2005).
87. Wang, Z. *et al.* Tim-3 inhibits macrophage control of *Listeria monocytogenes* by inhibiting Nrf2. *Sci. Rep.* **7**, 42095 (2017).
88. Banerjee, H. & Kane, L. P. Immune regulation by Tim-3. *F1000Research* **7**, 316 (2018).
89. Zehn, D. & Wherry, E. J. Immune Memory and Exhaustion: Clinically Relevant Lessons from the LCMV Model. in *Crossroads Between Innate and Adaptive Immunity V* (eds. Schoenberger, S. P., Katsikis, P. D. & Pulendran, B.) vol. 850 137–152 (Springer International Publishing, 2015).
90. Golden-Mason, L. *et al.* Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T Cells. *J. Virol.* **83**, 9122–9130 (2009).
91. Jones, R. B. *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **205**, 2763–2779 (2008).
92. Jayaraman, P. *et al.* Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J. Exp. Med.* **207**, 2343–2354 (2010).
93. Avery, L., Filderman, J., Szymczak-Workman, A. L. & Kane, L. P. Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 2455–2460 (2018).
94. Gorman, J. V. & Colgan, J. D. Acute stimulation generates Tim-3-expressing T helper type 1 CD4 T cells that persist *in vivo* and show enhanced effector function. *Immunology* **154**, 418–433 (2018).
95. Anderson, A. C. & Anderson, D. E. TIM-3 in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 665–669 (2006).

96. Sabatos, C. A. *et al.* Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* **4**, 1102–1110 (2003).
97. Sánchez-Fueyo, A. *et al.* Tim-3 inhibits T helper type 1–mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* **4**, 1093–1101 (2003).
98. Anderson, A. C. *et al.* Promotion of Tissue Inflammation by the Immune Receptor Tim-3 Expressed on Innate Immune Cells. *Science* **318**, 1141–1143 (2007).
99. Su, E. W., Bi, S. & Kane, L. P. Galectin-9 regulates T helper cell function independently of Tim-3. *Glycobiology* **21**, 1258–1265 (2011).
100. Takamura, S. *et al.* Premature Terminal Exhaustion of Friend Virus-Specific Effector CD8⁺ T Cells by Rapid Induction of Multiple Inhibitory Receptors. *J. Immunol.* **184**, 4696–4707 (2010).
101. Miles, A. A., Misra, S. S. & Irwin, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg. (Lond.)* **38**, 732–749 (1938).
102. Schietinger, A. & Greenberg, P. D. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* **35**, 51–60 (2014).
103. Khan, N., Vidyarthi, A., Amir, M., Mushtaq, K. & Agrewala, J. N. T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 133–141 (2017).
104. López-Medina, M., Carrillo-Martín, I., Leyva-Rangel, J., Alpuche-Aranda, C. & Ortiz-Navarrete, V. Salmonella impairs CD8 T cell response through PD-1: PD-L axis. *Immunobiology* **220**, 1369–1380 (2015).
105. Amezquita, R. A. & Kaech, S. M. The chronicles of T-cell exhaustion. *Nature* **543**, 190–191 (2017).
106. Guimarães, C. C., Castro, L. G. M. & Sotto, M. N. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop.* **87**, 377–384 (2003).

107. Day, C. L. *et al.* PD-1 Expression on Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4 T Cells Is Associated With Bacterial Load in Human Tuberculosis. *Front. Immunol.* **9**, 1995 (2018).
108. Jurado, J. O. *et al.* Programmed Death (PD)-1:PD-Ligand 1/PD-Ligand 2 Pathway Inhibits T Cell Effector Functions during Human Tuberculosis. *J. Immunol.* **181**, 116–125 (2008).
109. Licón-Trillo, A., Angeles Castro-Corona, M. & Salinas-Carmona, M. C. Immunogenicity and biophysical properties of a *Nocardia brasiliensis* protease involved in pathogenesis of mycetoma. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **37**, 37–44 (2003).
110. Meester, I., Rosas-Taraco, A. G. & Salinas-Carmona, M. C. *Nocardia brasiliensis* Induces Formation of Foamy Macrophages and Dendritic Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* **9**, e100064 (2014).
111. Hashimoto, M., Im, S. J., Araki, K. & Ahmed, R. Cytokine-Mediated Regulation of CD8 T-Cell Responses During Acute and Chronic Viral Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, a028464 (2019).
112. Blackburn, S. D. & Wherry, E. J. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. *Trends Microbiol.* **15**, 143–146 (2007).
113. Bronte, V. & Pittet, M. J. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity* **39**, 806–818 (2013).
114. Wherry, E. J. *et al.* Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* **27**, 670–684 (2007).
115. Angelosanto, J. M., Blackburn, S. D., Crawford, A. & Wherry, E. J. Progressive Loss of Memory T Cell Potential and Commitment to Exhaustion during Chronic Viral Infection. *J. Virol.* **86**, 8161–8170 (2012).
116. Kaufmann, S. H. E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 20–30 (2001).
117. Im, F., Pt, S. & Ah, S. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* **236**, 219–242 (2010).

118. Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Freeman, G. J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* **8**, 239–245 (2007).
119. Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K. & Honjo, T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J. Biomed. Sci.* **24**, 26 (2017).
120. Mariat, C. *et al.* Regulation of T cell dependent immune responses by TIM family members. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **360**, 1681–1685 (2005).
121. Anderson, A. C., Joller, N. & Kuchroo, V. K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* **44**, 989–1004 (2016).
122. Shen, L. *et al.* PD-1/PD-L pathway inhibits M.tb-specific CD4+ T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis. *Sci. Rep.* **6**, 38362 (2016).
123. Horne-Debets, J. M. *et al.* PD-1 Dependent Exhaustion of CD8+ T Cells Drives Chronic Malaria. *Cell Rep.* **5**, 1204–1213 (2013).
124. Wei, F. *et al.* Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E2480–E2489 (2013).
125. Hofmeyer, K. A., Jeon, H. & Zang, X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) Pathway in Chronic Infection-Induced Cytotoxic T Lymphocyte Exhaustion. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 1–9 (2011).
126. Gorman, J. V. & Colgan, J. D. Regulation of T cell responses by the receptor molecule Tim-3. *Immunol. Res.* **59**, 56–65 (2014).
127. Zhou, Q. *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* **117**, 4501–4510 (2011).
128. McMahan, R. H. *et al.* Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* **120**, 4546–4557 (2010).

Resumen Autobiográfico

Diana Ivonne Duarte Mata

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunología
Médica

Tesis: Identificación de TIM-3 y PD-1 en Linfocitos T en un modelo de actinomicetoma experimental.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Biografía: Nacida el 20 de abril de 1993 en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Hija de Juan Carlos Duarte Yanes y Leticia Mata Landaverde.

Educación: Egresada de la Licenciatura de Químico Biólogo Clínico por la Universidad de Sonora en el año 2016.