

**Evaluación de marcadores de agotamiento celular en toxoplasmosis  
ocular**

Estudiante

**Laura Lorena García López**

DIRECTOR

**Néstor Iván Cardona Pérez, Lic. Biol. M.Sc. PhD.**

CO-TUTORES

**Juan Felipe Osorio Méndez, PhD.**

**Jorge Enrique Gómez Marín, MD, PhD.**

**Trabajo de grado de Maestría presentado como requisito parcial para  
optar al título de Magister en Ciencias Biomédicas**

**Universidad del Quindío  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Maestría en Ciencias Biomédicas  
Mayo de 2019**

## RESUMEN

**Introducción:** La toxoplasmosis ocular (TO) es la causa más común de uveítis posterior y en algunos países, es una de las causas más importantes de discapacidad visual siendo en Suramérica más severa que en otros continentes. La TO se caracteriza por frecuentes reactivaciones debido a quistes tisulares remanentes en la retina después de la infección inicial con *T. gondii*. Respecto a la fisiopatología de las células T CD8, se ha informado en ratones con toxoplasmosis crónica, la pérdida de la función efectora y capacidad proliferativa de estas células T CD8 junto con la alta expresión de los receptores inhibidores PD-1, CD244, LAG-3 y CD160 que conducen a la reactivación de la infección. Sin embargo, hasta el momento no se han identificado los posibles factores inmunológicos humanos asociados con la TO, ni se ha evaluado los niveles de receptores inhibidores (iRs) en la toxoplasmosis ocular.

**Metodología:** en este estudio detectamos y caracterizamos los marcadores de agotamiento celular PD-1, CD244, LAG-3 y CD160 en células T CD8 totales y subpoblaciones celulares de memoria (central y periférica) de individuos con toxoplasmosis ocular. Se evaluaron cinco individuos por cada grupo seleccionado (crónicos sin lesiones oculares, con lesiones oculares y seronegativos para *Toxoplasma*) la expresión génica de estos marcadores se observó utilizando qRT-PCR y citometría de flujo.

**Resultados:** Se encontró que la expresión de estos genes estaba elevada en los individuos con TO principalmente. De manera interesante, el marcador por excelencia del fenómeno de agotamiento celular PD1, se encontró 10 veces más elevado en los individuos con TO respecto a los asintomáticos y 3,5 veces mayor para el marcador CD244 en este mismo grupo. Por el contrario, el marcador LAG-3 fue el menos expresado en todos los grupos. Respecto a los

porcentajes de células positivas por citometría y de la cantidad de moléculas por célula MFI, estos marcadores variaron notablemente entre las subpoblaciones celulares. Es posible observar una disminución en el porcentaje de células positivas para los marcadores PD1 y CD244 en el grupo ocular y un aumento de la cantidad de moléculas expresadas por célula en este mismo grupo. LAG-3 y CD160 no presentaron dichas variaciones en su expresión. Así mismo, no encontramos diferencias en las subpoblaciones de memoria para ningún marcador. De manera llamativa, encontramos una correlación positiva entre el índice de relación MFI/porcentaje celular y el número de lesiones oculares para el marcador PD1.

**Conclusión:** En conjunto, nuestros resultados sugieren la expresión de múltiples iRs principalmente PD1 seguido de CD244, denotado por el MFI, lo que sugiere un posible fenotipo de agotamiento parcial, previamente descrito en otras infecciones crónicas. Si bien el paradigma del agotamiento de CD8+ se ha explorado ampliamente en los modelos virales crónicos, apenas está comenzando a desarrollarse en las infecciones parasitarias.

**Palabras clave:** Toxoplasmosis crónica, PD1, CD244, LAG-3, CD160, agotamiento celular.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIACIONES</b> .....	<b>10</b>
<b>GLOSARIO</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos específicos .....	18
<b>3. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
3.1. Características propias del sistema inmune: memoria de células T.....	19
3.2. Agotamiento y alteración del mantenimiento de la memoria de células T .....	<b>20</b>
3.3. Marcadores de Agotamiento de células T .....	<b>22</b>
3.3.1. Proteína de muerte celular programada 1- PD-1 (B7-H1) .....	23
3.3.2. Gen-3 de activación de linfocitos (LAG-3) .....	24
3.3.3. 2B4 (CD244).....	24
3.3.4. CD160 .....	25
3.4. Agotamiento celular en enfermedades infecciosas .....	<b>26</b>
3.5. Agotamiento celular en enfermedades provocadas por protozoos parásitos.....	<b>27</b>
3.5.1. <i>Plasmodium</i> ( <i>P. vivax</i> , <i>P. yoelii</i> , <i>P. falciparum</i> y <i>P. chaubudí</i> ).....	27
3.5.2. <i>Leishmania</i> ( <i>L. donovani</i> y <i>L. mexicana</i> ).....	28
3.6. Respuesta efectiva y agotamiento de células T CD8+ en <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>30</b>
3.7. Toxoplasmosis ocular y recurrencias .....	<b>33</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1. Aspectos bioéticos en la investigación en seres humanos.....	34
4.2. Población de estudio .....	34
4.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) .	35
4.4. Extracción de ARN total de PBMCs.....	36
4.5. Cuantificación de marcadores de agotamiento celular por RT-qPCR....	36
4.6. Tinción celular de subpoblaciones de linfocitos en PBMCs.....	38

<b>4.7. Detección de los marcadores de agotamiento en subpoblaciones de linfocitos.....</b>	<b>40</b>
<b>4.8 Análisis de datos .....</b>	<b>42</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1. Población de estudio .....</b>	<b>43</b>
<b>5.2. Características de los PBMCs.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3. Cuantificación de marcadores de agotamiento celular por RT-qPCR....</b>	<b>45</b>
5.3.1. Estandarización de las condiciones de RT-qPCR para los genes de interés.....	45
5.3.2 Expresión de ARNm de PD1, CD244 y LAG-3 en los individuos oculares respecto a los asintomáticos .....	47
<b>5.4. Citometría de flujo.....</b>	<b>48</b>
5.4.1. Titulación de anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CD45RA, anti-CCR7, anti-PD1, anti-CD244, anti-LAG3 y anti-CD160 .....	48
5.4.2 Selección de subpoblaciones celulares .....	49
5.4.3 Expresión de marcadores de agotamiento celular en linfocitos T obtenidos de sangre periférica.....	51
5.4.4 Niveles de expresión de PD-1, CD244, LAG-3 y CD160 en células T CD8+ .....	52
5.4.5. PD1 se expresa en mayor proporción en los individuos oculares con mayor número de lesiones .....	55
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>9. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>8. ASPECTOS BIOÉTICOS.....</b>	<b>83</b>
<b>8.1 Investigación en seres humanos .....</b>	<b>83</b>
<b>8.2 Bioseguridad.....</b>	<b>83</b>
8.2.1 Ruta Bioética .....	83
8.2.2 Posibles efectos negativos.....	84
8.2.3 Manejo de la Información y divulgación .....	85
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 12.1. Consentimiento informado.....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 12.2. Optimización del protocolo de extracción de PBMCs de un individuo seronegativo .....</b>	<b>91</b>
<b>Anexo 12.3. Protocolo de aislamiento de ARN en columna y digestión de ADN genómico .....</b>	<b>93</b>
<b>Anexo 12.4. Estrategia experimental para las perlas de compensación .....</b>	<b>97</b>
<b>Anexo 12.5. Estrategia experimental para la tinción superficial de las células....</b>	<b>99</b>
<b>Anexo 12.6. Fotografías de fondo de ojo de los individuos incluidos en el estudio .....</b>	<b>101</b>

<b>Anexo 12.7.</b> Valores de ct de los marcadores de agotamiento amplificados por tiempo real (RT-qPCR) .....	<b>104</b>
<b>Anexo 12.8.</b> Titulaciones de los anticuerpos .....	<b>105</b>
<b>Anexo 12.9.</b> Niveles de expresión de los marcadores de agotamiento en subconjuntos de células T CD8+ .....	<b>107</b>
<b>Anexo 12.10.</b> Niveles de expresión de PD1, CD244, LAG-3 y CD160 en subconjuntos de células T CD8+ .....	<b>108</b>
<b>Anexo 12.11.</b> Índice de relación .....	<b>114</b>
<b>10. APROPIACIÓN SOCIAL DEL CONOCIMIENTO</b> .....	<b>117</b>

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios*

*A mis padres Clara Lorena López Jiménez y Edilber García Valencia*

*A mi Familia*

*A los participantes del proyecto*

*A mis tutores el Dr. Néstor Iván Cardona Pérez y el Dr. Juan Felipe Osorio Méndez*

*A mis profesores de maestría*

*A mis compañeros de maestría Juan Camilo Arenas, Deicy Muñoz y Lina Marcela Pedraza*

*A mi grupo de investigación Gepamol*

*A mi director de grupo Dr. Jorge Enrique Gómez Marín*

*Al Dr. Aylan Arenas, Dra. Gladys Salcedo y la Dra. Diana Galvis del grupo de estadística de la Universidad del Quindío*

*Al grupo de inmunología e infección de la Universidad Tecnológica de Pereira  
A Colciencias*

*Al Centro de Investigaciones Biomédicas*

*A grupo de investigación Gymol*

*A la Dra. Olga Alicia y a Olguita*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo de la estrategia experimental usada en el presente trabajo.....	34
<b>Figura 2.</b> Esquema del diseño metodológico general de la citometría de flujo. .....	41
<b>Figura 3.</b> Fotografías de fondo de ojo. ....	43
<b>Figura 4.</b> Amplificación de los genes GAPDH, PD1, CD244, LAG-3 y CD160 en un individuo seronegativo. ....	47
<b>Figura 5.</b> Niveles de expresión relativa de los genes PD1, CD244 y LAG-3 en PBMCs de individuos con toxoplasmosis ocular, asintomáticos y seronegativos para <i>Toxoplasma</i> . ....	48
<b>Figura 6.</b> Titulación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 de linfocitos T en PBMCs.....	49
<b>Figura 7.</b> Estrategia de gating de linfocitos T CD3+CD8+.....	50
<b>Figura 8.</b> Perfil de agotamiento celular. Expresión de los cuatro marcadores de agotamiento celular PD1, CD244, LAG-3 y CD160 en células T CD3+CD8+... ..	51
<b>Figura 9.</b> Expresión de PD1 en células T CD3+CD8+. ....	54
<b>Figura 10.</b> Expresión de CD244 en células T CD3+CD8+. ....	54
<b>Figura 11.</b> Expresión de LAG-3 en células T CD3+CD8+. ....	55
<b>Figura 12.</b> Expresión de CD160 en células T CD3+CD8+. ....	55
<b>Figura 13.</b> Expresión de PD1, CD244, LAG-3 y CD160 en individuos oculares en células T CD3+CD8+. ....	57

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Características de los linfocitos CD8+ específicos en el curso de la infección por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	32
<b>Tabla 2.</b> Lista de oligonucleótidos usados como iniciadores en las reacciones de RT-qPCR. ....	37
<b>Tabla 3.</b> Diluciones seleccionadas para cada conjugado. ....	39
<b>Tabla 4.</b> Paneles de anticuerpos con los genes objetivo. ....	42
<b>Tabla 5.</b> Características generales de los individuos incluidos en el estudio. ....	44
<b>Tabla 6.</b> Características de los PBMCs extraídos de sangre total.....	45
<b>Tabla 7.</b> Promedios de Ct de los marcadores de agotamiento en las poblaciones de personas seleccionadas.....	47

## LISTA DE ABREVIACIONES

**TO:** Toxoplasmosis ocular

**IL:** interleucina

***T. gondii:*** *Toxoplasma gondii*

**IgG:** inmunoglobulina G

**IgM:** inmunoglobulina M

**APC:** Células presentadoras de antígeno

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**Tcm:** Linfocito de memoria central

**LN:** Ganglio linfático

**CTL:** Linfocitos T citotóxico

**Tem:** Linfocito de memoria efectora

**LCMV:** Virus de la coriomeningitis linfocita

**Tex:** Células T agotadas

**Teff:** Células T efectoras

**Tmem:** Células T de memoria

**IRs:** Receptores inhibitorios

**NK:** Célula Natural Killer

**TNK:** Células T naturales asesinas

**MHC:** Complejo mayor de Histocompatibilidad

**SIV:** Virus de la inmunodeficiencia de simio

**VL:** Leishmaniasis visceral humana

**LCL:** Leishmaniasis cutánea localizada

**DCL:** Leishmaniasis cutánea difusa

**Lm:** *Leishmaniasis mexicana*

**TLR2:** Receptor 2 tipo Toll

**SA:** Aspirados esplénicos

**EDTA:** Ácido etilendiamintetraacético. Atrae a los iones de calcio bloqueando la cascada de coagulación. (sal dipotásica K2 ó K3).

**PBMCs:** Células mononucleares de sangre periférica. Es una célula sanguínea caracterizada por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos o los monocitos.

**RPMI:** Medio de cultivo se utiliza para el mantenimiento de numerosas líneas celulares.

**Tm:** Temperatura de fusión

**ARN:** ácido ribonucleico.

**ARNm:** ARN mensajero.

**Dnasa:** desoxirribonucleasa

**MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio

**ADNc:** ADN complementario.

**OD:** Densidad óptica

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

**FITC:** Fluoresceína de isotiocianato

**APC-Cy7:** Alofocianina/Cy7

**PE-Cy5:** Ficoeritrina/Cy5

**PE-Cy7:** Ficoeritrina/Cy7

**APC:** Alofocianina

**PE:** Ficoeritrina

**Ac:** Anticuerpo.

**FMO:** Un control de FMO contiene todos los fluorocromos en un panel, excepto el que se está midiendo. El control de FMO garantiza que la propagación de los fluorocromos al canal de interés se identifique correctamente. Es usado para identificar y hacer un gate de células en el contexto de la dispersión de los datos debido a los múltiples fluorocromos en un panel determinado.

**FSC:** Dispersión frontal en citometría de flujo

**SSC:** Dispersión lateral en citometría de flujo

**SD:** Desviación estándar

**MFI:** Intensidad media de fluorescencia, por sus siglas en inglés (Mean Fluorescence Intensity).

## GLOSARIO

**Cebador:** Una secuencia corta de oligonucleótidos que se utiliza en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la creación de moléculas más largas de ADN.

**GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa es uno de los genes de uso común más utilizados en comparaciones de datos de expresión génica.

**PD-1:** proteína de muerte celular programada 1, también conocida como PD-1 o CD279 (grupo de diferenciación 279). Es un receptor inhibitorio homólogo a CD28 que está expresado en células T activadas y se une a PD-L1 o PD-L2, miembros de la familia de proteínas B7 expresado en varios tipos celulares. PD-1 está sobrerregulado en células T después de una estimulación repetida o prolongada, en el contexto de una infección crónica o tumores. El bloqueo de PD-1 con anticuerpos monoclonales aumenta las respuestas inmunes antitumorales.

**CD244:** El receptor de células NK 2B4 (CD244) es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de Ig. Es un miembro del subconjunto CD2 de las moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). CD244 se expresa en células NK, un subconjunto de células T (incluidas la mayoría de las células T CD8+). CD48 es el ligando de CD244. Estudios recientes han demostrado que el CD244 humano, como el CD244 murino, tiene funciones activadoras e inhibitorias, que dependen de la densidad de la expresión de la superficie 2B4.

**LAG-3:** Gen de activación de linfocitos 3 o CD223, perteneciente a la superfamilia Ig. Se expresa en las células T y células B. Es un regulador negativo de la activación de células T, proporcionando señales inhibitorias a las células T efectoras activadas, son altamente expresados en las células Treg, donde son importantes para amplificar su actividad inhibitoria. Al igual que PD1, estos receptores juegan un doble papel en la inhibición de las respuestas inmunes y el bloqueo con anticuerpos, por lo tanto, tienen múltiples mecanismos de acción potenciales. En particular, PD1 y LAG3 son comúnmente coexpresados en células T anérgicas o agotadas.

**CD160:** de la superfamilia Ig. Se expresa principalmente en células T CD8+. Es un receptor en células inmunes capaces de administrar señales estimulantes o inhibitorias que regulan la activación y diferenciación celular. Tras la estimulación antigénica persistente, como ocurre durante una infección viral crónica, puede inhibir progresivamente la señalización de TCR en las células T CD8+, lo que contribuye al agotamiento de las células T.

**Agotamiento celular:** Es un estado de disfunción de las células T que se caracteriza por el desgaste de las funciones efectoras, la expresión prolongada de los receptores inhibidores y la incapacidad para controlar infecciones o tumores.

**Células T efectoras de memoria:** Las células de memoria efectoras se caracterizan por una alta citotoxicidad, falta de receptor de localización linfoide (CCR7-). Estas células residen preferentemente en tejido no linfoide.

**Células T de memoria central:** Un subconjunto de células T de memoria que expresa CD62L y CC-quimiocina receptor 7 (CCR7+) y residen principalmente

en los ganglios linfáticos y el bazo. Estas células tienen un alto potencial proliferativo en el reencuentro con el antígeno.

**Infección crónica:** Una infección crónica generalmente se produce cuando el huésped no puede eliminar completamente el patógeno. Esto puede ser una consecuencia de la disfunción inmune del huésped o la evasión inmune del patógeno o incluso de ambos.

**Polifuncionalidad:** La polifuncionalidad se define por la capacidad de una sola célula de mostrar múltiples funciones como la citotoxicidad y la secreción de múltiples citoquinas en respuesta a un estímulo antigénico.

**Respuesta de memoria:** Esta respuesta ocurre después de un segundo encuentro con un patógeno o antígeno. La respuesta inmune resultante es generalmente más rápida y más fuerte que una respuesta primaria e involucra células de memoria.

## 1. INTRODUCCIÓN

El parásito apicomplexa *Toxoplasma gondii* es conocido por su capacidad para infectar una amplia gama de huéspedes intermedios, incluidos todos los mamíferos y aves. En los humanos, aunque generalmente es asintomática, la infección por este parásito puede causar lesiones oculares y cerebrales en hospederos inmunocompetentes y malformaciones en el feto cuando se trata de infecciones congénitas(1).

Esto debido principalmente a que, en los humanos, *Toxoplasma* experimenta una conversión de etapa entre el taquizoíto de rápida replicación que se cree que es responsable de la toxoplasmosis aguda y el bradizoíto con replicación lenta, relativamente quiescente y enquistado, que puede persistir posiblemente durante toda la vida. Se cree que la interconversión bradizoíto-taquizoíto llamada comúnmente *reactivación* juega un papel central no solo en el establecimiento de la infección crónica, sino también en el recrudecimiento de la enfermedad (2).

A nivel regional en el departamento del Quindío se ha encontrado una alta prevalencia de toxoplasmosis ocular (TO). Durante el desarrollo de la TO, los individuos presentan riesgo de desarrollar recurrencias debido a reactivaciones en el ojo que pueden aumentar el riesgo de pérdida de la visión (3). En nuestro grupo se han llevado a cabo estudios de incidencia donde se reportaron 80 episodios de recurrencias en 56 pacientes con toxoplasmosis ocular (4). Sin embargo, hasta el momento no se conocen los factores inmunológicos del hospedero causantes de dichas reactivaciones (5).

Lo que sí sabemos es que las respuestas inmunes locales y sistémicas en la infección por *T. gondii*, son fuertemente dependientes no solo del genotipo del parásito, sino también de la genética y el estado inmune de los infectados. En este sentido, la respuesta efectiva de las células T CD8+ es crítica para el

control de infección aguda y crónica por *Toxoplasma* (6) (7). Estas células se activan y adquieren funciones efectoras, incluyendo la producción de citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , así como la citotoxicidad mediada por granzima y perforina que permiten eliminar o controlar la infección (8) (9).

Sin embargo, la persistencia del parásito que lleva a la infección crónica tiene un profundo impacto en la capacidad efectora de estas células T CD8 que induce a un estado gradual de disfunción, fenómeno conocido como **agotamiento de las células T** (10). Estudios recientes en ratones susceptibles (C57BL/6) han demostrado que las células T CD8+ durante la última fase de la toxoplasmosis crónica presentan un desgaste progresivo de su funcionalidad, se transforman de células trifuncionales en bifuncionales, o monofuncionales e incluso a no funcionales. Tienen además un aumento de la apoptosis y una respuesta de células T de memoria deficiente junto con una expresión elevada del receptor inhibitorio de muerte celular programada (PD-1), característico del agotamiento celular (11).

Este receptor se encontró que se expresa de manera aumentada y preferentemente en células T CD8+ lo que las hace propensas a morir por apoptosis (12). Junto con el agotamiento gradual de CD8, los parásitos experimentan una reactivación que resulta en la mortalidad del huésped infectado en ensayos con ratones (13). De igual manera, se encontró que en un modelo de reinfección por *Toxoplasma gondii* en ratón, cuando se administra una infección secundaria letal, las células T CD8+ y CD4+ regulan de forma ascendente varios receptores inhibitorios además de PD-1, como TIM-3, 4-1bb y CTLA-4 (14).

De manera interesante, el tratamiento de ratones infectados crónicamente con un anticuerpo  $\alpha$ PD-L1 que inhibe la interacción de PD1 con su ligando PD-L1 redujo la apoptosis de las células T CD8+ y rescató la proliferación y

polifuncionalidad de estas, aunque de manera parcial. El bloqueo de la interacción PD-1/PDL-1 redujo además la conversión del estadio del parásito y la parasitemia, y lo más importante, evitó la mortalidad del huésped en una infección primaria (11).

El agotamiento de las células T se caracterizó por primera vez en los modelos de infección viral crónica (15,16), pero ahora se estudia ampliamente en el cáncer (17,18), en infecciones bacterianas (19,20); y en los modelos de infección parasitaria (21). En algunas de estas enfermedades la firma molecular del agotamiento de las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> se ha definido detalladamente, y se han identificado varios marcadores para distinguir estos estados hipoprotectores (22–24). Dentro de esos marcadores clave que etiquetan las células T CD8 o CD4 como agotadas están los altos niveles de expresión de los receptores inhibidores PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, CD244 (2B4), BTLA, y CD160 (22). Las células pueden presentar la mayoría, o una parte, de estos marcadores, y la expresión del marcador varía con el modelo usado, el tipo celular y la gravedad de la enfermedad (10).

En general, hay pruebas sólidas de que el agotamiento de las células T CD8<sup>+</sup> desempeña un papel importante en la reactivación de la toxoplasmosis crónica hasta ahora en ratones. Estudios adicionales sugieren posibles roles de los receptores inhibitorios PD-1, CD244, LAG-3, y CD160 durante la infección humana por *T. gondii*. Sin embargo, los niveles de expresión y el papel preciso de estas vías sigue siendo poco conocido (25). Por lo anterior, en este estudio detectamos y caracterizamos en diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> la expresión de las moléculas PD-1, CD244, LAG-3 y CD160 y en PBMCs obtenidos de sangre periférica de individuos con toxoplasmosis ocular.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Establecer los niveles de expresión de receptores inhibitorios en células T CD3+CD8+ en individuos con toxoplasmosis ocular.

### **2.2. Objetivos específicos**

Evaluar los niveles de expresión de los genes de agotamiento celular (PD1, CD244, LAG-3 y CD160) en individuos con toxoplasmosis ocular.

Identificar la presencia de los receptores inhibitorios (PD1, CD244, LAG-3 y CD160) expresados en la membrana celular en diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD3+CD8+ en individuos con toxoplasmosis ocular.

### 3. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Características propias del sistema inmune: memoria de células T

Durante una infección aguda las células APC presentan antígenos derivados de patógenos y proporciona las señales coestimuladoras apropiadas a la célula T para provocar su activación (27,28). Esta activación conduce a la proliferación, diferenciación y adquisición de funciones efectoras de la célula T CD8 específicas de antígeno en el transcurso de 1 a 2 semanas, acompañada de una reprogramación transcripcional, epigenética y metabólica, y la adquisición de características cardinales de las células T efectoras (29,30).

Tras el pico de expansión de células efectoras, la resolución de la inflamación y la eliminación del antígeno; la mayoría de las células T activadas mueren, pero un pequeño subconjunto persiste y hace una transición a células T de memoria. Estas células permanecen preparadas para elaborar rápidamente funciones efectoras tras la reexposición a patógenos y tienen muchas propiedades en común con las células *naïve*, incluida la pluripotencia, la capacidad de migrar a los ganglios linfáticos y al bazo (31) y la persistencia través de la auto-renovación homeostática mediada por IL-7- e IL-15 (32). Además estas células mantienen la secreción de citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y la citotoxicidad que promueve un mayor desarrollo de la inmunidad adaptativa y el control de patógenos a largo plazo (7).

Estas células T de memoria altamente funcionales se desarrollan y están dotadas de varias propiedades definitorias que las distinguen de las células T *naïve* y efectoras (33–35) y es posible diferenciarlas a través de su ubicación anatómica, la expresión de marcadores de superficie celular y algunas

funciones efectoras. En este sentido, las células T CD8 de memoria central ( $T_{CM}$ ) son una población clásica de células T CD45RA<sup>-</sup> con una alta expresión de CCR-7 lo que permite su localización eficiente a los ganglios linfáticos (LN) (36). Por el contrario las células T CD8 de memoria efectora ( $T_{EM}$ ) permanecen preparadas para proporcionar funciones efectoras inmediatas, carecen de la expresión de estos receptores de LN y están ubicadas en tejidos no linfoides, es decir a nivel periférico (37).

En general, la memoria inmunológica mediada principalmente por células T permite combatir patógenos debido a que entre otras cosas están presentes en mayor número que las células T *naïve*, persisten durante períodos prolongados debido al recambio homeostático independiente del antígeno y responden rápidamente al reencontrarse con los patógenos (38).

### **3.2. Agotamiento y alteración del mantenimiento de la memoria de células T**

En contraste, durante las infecciones crónicas y el cáncer, que implican una exposición persistente a antígenos y/o inflamación, este programa de diferenciación de células T de memoria está notablemente alterado (39) y ha sido denominado como el fenómeno de “*agotamiento celular*” que tiene varios rasgos característicos, como la pérdida progresiva y jerárquica de las funciones efectoras de dichas células, la regulación sostenida y la coexpresión de múltiples receptores inhibidores, la expresión alterada de factores de transcripción clave, desajustes metabólicos, y una falla en la capacidad de respuesta homeostática de las células T de memoria independiente del antígeno (10). Además de la disminución de la producción de citoquinas como la interleucina (IL) -2 y el IFN- $\gamma$  importante para el control de la infección (40,41).

El agotamiento de las células T se describió por primera vez en la infección crónica por LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica), donde las células T desarrollaron una serie de defectos, particularmente en la capacidad de mediar las funciones efectoras, proliferar y adquirir propiedades únicas de las células T de memoria (15,16,42,43). Durante la infección crónica en ratones, las células T CD8+ no desarrollaron células de memoria funcionales, debido a que las células T CD8+ agotadas tienen una expresión baja de CD122 (la cadena  $\beta$  del receptor de IL-2 e IL-15) y CD127 (la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-7), por tanto, responden mal a las interleuquinas IL-7 e IL-15 (44) mencionadas anteriormente como importantes para el mantenimiento de las células T de memoria.

De otro lado, los esfuerzos para analizar las diferencias entre las células T de memoria funcionales y agotadas han demostrado una característica única de estas células a nivel transcripcional debido a que las células agotadas mantienen el fenotipo adquirido durante la infección crónica y la transmiten a sus hijas, incluso después de retirar el antígeno (45). La comparación entre el perfil transcripcional de células agotadas ( $T_{ex}$ ) versus las células T efectoras ( $T_{eff}$ ) o de memoria ( $T_{mem}$ ) reveló una regulación positiva de un gran número de **receptores inhibidores (iRs)** de la superficie celular (46), los cuales se habían definido previamente como importantes para la regulación negativa de la función de los linfocitos (47,48).

En este sentido, debido a que los linfocitos requieren no solo la señalización del receptor de antígeno, sino también una segunda señal que proporciona información contextual adicional, lo que se conoce como el modelo original de dos señales para la activación de linfocitos (49–51), los receptores inhibidores resultan ser vías reguladoras negativas cruciales que controlan la reactividad y la inmunopatología (52). Aunque los iRs se expresan de forma transitoria en las células T efectoras funcionales durante la activación, la expresión más alta

y sostenida de estos en células T CD8+ y CD4+ tanto en modelos animales como en humanos, es un sello distintivo de las células T agotadas (53). Muchos estudios durante la última década han vinculado aún más la expresión de iRs como PD1, CTLA-4, TIM3, LAG3, CD160, BTLA y CD244 (2B4) al fenómeno del “*agotamiento de las células T*” tanto en modelos de ratón como en personas con diferentes infecciones crónicas (54).

### **3.3. Marcadores de Agotamiento de células T**

Las moléculas coestimuladoras/coinhibidoras se dividen comúnmente en 4 familias: **1)** la familia B7, que incluye CD28, CTLA-4, PD-1, coestimulador inducible de células T (ICOS) y el atenuador de linfocitos T y B (BTLA), **2)** la familia de receptores TNF- $\alpha$  incluyendo CD27, **3)** la familia CD2/SLAM, incluida la molécula de activación de señalización de linfocitos (SLAM), CD244 (2B4) y CD48 y **4)** la familia de las inmunoglobulinas (Ig), que incluye inmunoglobulina mucin-3 de células T (TIM-3), Gene-3 de activación de linfocitos (LAG-3) y CD160 (47,55,56). Cada molécula co-inhibitoria/coestimuladora interactúa con uno o varios receptores expresados por uno o varios tipos de células (57).

Aunque el mecanismo molecular para la regulación mediada por receptores inhibitorios en la mayoría de los casos no se ha definido, muchos de estos receptores contienen dominios de señalización intracelular capaces de transmitir una señal negativa, a menudo a través de la actividad de una fosfatasa u otras moléculas adaptadoras. De hecho, se ha sugerido que algunos iRs operan mediante la competencia por la unión de ligandos (58,59); o potencialmente median la función inhibitoria sin una cola citoplásmica, por ejemplo, CD160 (60).

Además de su función propia, una posibilidad es que los iRs individuales regulen distintas funciones celulares. Por ejemplo, la vía PD-1 parece afectar fuertemente la supervivencia y/o proliferación de células T CD8+ (61–63). LAG-3 afecta la progresión del ciclo celular, pero tiene menos influencia en la supervivencia celular o apoptosis (54,64). CD244 (2B4) y CD160 también pueden afectar las funciones no superpuestas de las células T CD8+ agotadas (54). Se ha descrito además que el número de iRs y la densidad de estos en la membrana celular afecta la intensidad del agotamiento de las células T (21). En general, los estudios sugieren que los receptores inhibitorios podrían atenuar las respuestas de las células T de más de una manera (10).

### **3.3.1. Proteína de muerte celular programada 1- PD-1 (B7-H1)**

PD-1, un miembro de la subfamilia CD28 de receptores de Ig, es quizás el más estudiado de estos receptores inhibidores en infecciones debido a su papel en el agotamiento de las células T (25).

Durante infecciones agudas, la expresión de PD-1 es transitoria, regresando en la mayoría de los casos a niveles bajos después de resolución de la infección (66). En contraste, durante las infecciones crónicas, su expresión se mantiene y, de hecho, la cantidad de PD-1 expresada a menudo es mayor (63,67,68). Esto relacionado posiblemente, a patrones de metilación establecidos en el locus *Pdcd1* durante las infecciones crónicas y que pueden influir en la persistencia o la expresión de PD-1 (69,70).

El papel natural primordial de PD-1 en la regulación de la tolerancia periférica se observó cuando los científicos demostraron que los ratones deficientes en PD-1 desarrollaron trastornos autoinmunes graves (71). Luego de la unión del receptor PD1 con su ligando PDL-1, la secreción de IL-2 es una de las primeras funciones de las células T efectoras en disminuir, seguida de la disminución

de TNF- $\alpha$  (72), IFN- $\gamma$  y  $\beta$ -quimioquinas. Además, las células T CD8+ también parecen perder su capacidad de causar desgranulación al detectar células infectadas intracelularmente.

### **3.3.2. Gen-3 de activación de linfocitos (LAG-3)**

Si bien algunos estudios sugieren que la manipulación de LAG-3 solo en LCMV crónico tiene poco impacto en las células T<sub>ex</sub> (73), el bloqueo conjunto de LAG-3 y PD-1 condujo a una notable sinergia (Blackburn et al., 2009) (54), sugiriendo tal vez un papel subordinado de LAG-3 cuando otros receptores inhibidores fuertes están presentes (25). De otro lado, la expresión de LAG-3 a menudo se encuentra en T<sub>ex</sub>, aunque su detección en sangre periférica en humanos, en comparación con el sitio de infección, es un desafío en algunas configuraciones (74,75).

### **3.3.3. 2B4 (CD244)**

CD244 es otro miembro importante de la familia SLAM. Es una glicoproteína de la superficie celular relacionada estructuralmente con moléculas similares a CD2 (76) y parece ser particularmente importante para la función efectora citotóxica de las células T CD8+ y las células NK (77,78). Se ha demostrado de forma variable que el compromiso de 2B4 activa o inhibe los linfocitos que expresan este receptor.

Aunque la mayoría de los receptores de la familia SLAM participan en interacciones homotípicas, 2B4 interactúa con CD48 y actualmente está bien aceptado esta interacción puede mediar tanto señales de activación como de inhibición. En humanos, la ligación de 2B4 con anticuerpos específicos o células diana que expresan CD48 proporciona una señal de activación para las células NK (79). En contraste el empalme alternativo en ratones genera

una forma corta de 2B4 que contiene solo un motivo ITSM (80). Mientras que la sobreexpresión de 2B4 de longitud completa afectó la citotoxicidad de células NK, la forma corta de 2B4 facilitó la lisis de células tumorales (81).

#### **3.3.4. CD160**

CD160, es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, expresado principalmente en linfocitos CD8+, células TNK y las NK (82,83). Se ha reportado que la expresión de este receptor aumenta luego de la activación de células T CD4+ humanas (60). Asimismo, su expresión en estas células es menor que en las células T CD8+. En linfocitos humanos de PBMCs no estimulados, CD160 se expresó en células T CD4+ y CD8+ en pequeñas cantidades (aproximadamente 8% y 18% respectivamente). En células T CD4+, CD160 se expresó en una subpoblación considerable de células T de memoria (CD45RA-) y células T recientemente activadas (CD45RA+) pero fue apenas detectable en las células T *naïve* (CD45RA+), lo que sugiere que se induce CD160 durante o después de la activación de las células T (60).

De igual modo, el entrecruzamiento de CD160 con un anticuerpo, inhibe fuertemente la proliferación de células T CD4+ y la producción de citoquinas, identificando así CD160 como un regulador negativo de la activación de células T CD4+ (60). Igualmente, el bloqueo de la interacción CD160/CD160-L restauró la capacidad de proliferación de células T CD8, y el grado de restauración se correlacionó directamente con la proporción *ex vivo* de células T CD8+ CD160+(87).

### 3.4. Agotamiento celular en enfermedades infecciosas

El agotamiento de las células T se ha demostrado en una amplia variedad de modelos animales y en humanos con infecciones virales, bacterianas y parasitarias crónicas, así como en el cáncer (33). Se considera una característica general de las infecciones crónicas, por ejemplo, se ha descrito en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el adenovirus, el virus de la leucemia de Friend, el virus de la hepatitis del ratón (88), la tuberculosis (89,90); el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV) (91), Hepatitis C (VHC) (92), y el virus de la Hepatitis B (VHB) (93).

De manera interesante, bloquear la interacción del receptor inhibitorio PD-1 con su ligando PDL-1 usando un anticuerpo monoclonal restauró las respuestas de las células T CD8+ efectoras en infecciones crónicas como el VIH, la hepatitis C y el virus LCMV (66,94,95). De igual manera, estas observaciones se han extendido al modelo de ratón humanizado de infección por VIH donde el bloqueo de la misma vía condujo además a una reducción significativa en la carga viral (96). Asimismo, durante la infección con el virus SIV, el bloqueo *in vivo* de PD-1 condujo no solo a la mejora sustancial en las respuestas de las células T CD8+ específicas del virus sino también a la mejora de las respuestas de las células B y de anticuerpos y lo más importante al aumento en la supervivencia en monos (91).

Gran parte de la discusión del agotamiento celular se ha centrado en las infecciones virales. Sin embargo, estudios recientes demuestran que este paradigma puede extenderse también a las enfermedades protozoarias, aunque con notables diferencias (21).

### **3.5. Agotamiento celular en enfermedades provocadas por protozoos parásitos**

Aunque los parásitos provocan una respuesta inmune inflamatoria inicial, la inmunidad por sí misma en algunos casos no logra eliminar el patógeno, lo que lleva a una etapa crónica de la infección (21). En este sentido, los receptores inhibidores también desempeñan un papel central en la regulación de las respuestas inmunes a los patógenos no virales. Por ejemplo, se ha informado de un papel importante de PD-1 y otros iRs en la infección persistente con *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. yoelii*, *P. falciparum*, *P. chabudii*) *Leishmania* (*L. donovani* & *L. mexicana*), *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*, donde se encontró que la expresión elevada de este receptor inhibitorio se asocia con la disfunción o agotamiento de las células T (25). En cada uno de estos entornos hay evidencia de un papel de PD-1 u otras vías inhibitorias que limitan la efectividad de la respuesta inmune.

#### **3.5.1. *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. yoelii*, *P. falciparum* y *P. chabudii*)**

Costa y colaboradores en 2015 demostraron que los niveles de PD-1 y LAG-3, aumentaron en las células T humanas durante la malaria aguda. Demostraron además que la infección desencadena la expresión de moléculas reguladoras en las células T y que el patrón de expresión difiere en las células T CD4+ y CD8+. Además de que las frecuencias más altas de CD4+ expresan más de 1 molécula reguladora en comparación con las células T CD8+ (97).

En 2006, Butler y colaboradores, en ratones encontraron que el bloqueo de LAG-3 junto con PD-L1 mejora las funciones de las células T CD4+, amplifica las células T ayudadoras foliculares, las células B del centro germinal, y el número de plasmoblastos, aumenta la protección de anticuerpos y elimina

rápidamente la malaria en estadio sanguíneo (99). Además de lo anterior, estos resultados sugieren que el agotamiento de las células T es independiente de los alelos MHC y no está restringido a ninguna cepa de ratones en particular (99).

En general, la infección por malaria puede clasificarse entre las infecciones crónicas en las que el agotamiento de las células T dificulta la eliminación del parásito. Sin embargo, el papel de otros receptores como CD244, CD160 y varios represores transcripcionales rara vez se ha investigado (100).

### **3.5.2. *Leishmania (L. donovani y L. mexicana)***

El agotamiento de las células T CD4+ y CD8+ durante la leishmaniasis visceral (VL) canina sintomática mostró una pérdida significativa por etapas de la proliferación de células específicas de antígeno y la producción de IFN- $\gamma$ , que fue congruente con un aumento de la sintomatología. Además, el agotamiento se asoció con un aumento de PD-1 de hasta cuatro veces en la población sintomáticas respecto al control. Y lo que era de esperarse, el bloqueo con anticuerpos del ligando de PD-1, promovió el retorno de la función de las células T CD4+ y CD8+ y aumentó dramáticamente la producción de especies reactivas de oxígeno en fagocitos derivados de monocitos co-cultivados, y como resultado, estos fagocitos tenían una carga parasitaria disminuida (Kevin J. Esch, *et al.*, 2013)(101).

En el caso de *Leishmania mexicana* (Lm) causante de la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y difusa (DCL). Los pacientes con DCL tienen una mala respuesta inmune, sus células T CD8+ exhibían baja citotoxicidad, baja proliferación de células específicas de antígeno y baja producción de IFN- $\gamma$ ,

en comparación con los pacientes con LCL. Estas características son similares al "agotamiento celular" descrito en las infecciones crónicas.

Se ha demostrado que las células T CD8+ de leishmaniasis visceral humana (VL) contribuyen al control de parásitos y desempeñan un papel importante en la inmunidad generada por la vacuna. Sin embargo, los genes y los marcadores de superficie sugieren que las células T CD8+ obtenidas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y aspirados esplénicos (SA), tienen características de células agotadas, vistas de acuerdo a la expresión elevada de los ARNm de PD1 y CTLA-4, acompañadas de un alto nivel de ARNm de IL-10 (103). Por lo que, se sugiere que las células T CD8+ pueden ser conducidas al agotamiento en la VL humana, lo que afecta su capacidad para contribuir a las respuestas inmunitarias protectoras.

Del mismo modo como ha ocurrido en infecciones por malaria, *L. donovani* es capaz de evadir el ataque de las células T CD8+ al suprimir su expansión y su función efectora. A pesar de la presencia constante de parásitos en el bazo, las respuestas de las células T CD8+ exhibieron un patrón de activación bifásico, donde el primer momento de activación llevó a una expansión limitada y el segundo momento dio como resultado la muerte celular y el agotamiento de las células T CD8+. El bloqueo B7-H1 rescató las respuestas de las células T CD8+ de la muerte celular y redujo significativamente la carga del parásito esplénico, pero no logró restaurar completamente la producción de citoquinas (Joshi T, *et al.* 2009) (104).

En conclusión, estos estudios primarios han desempeñado un papel importante en el desarrollo de lo que serían nuevas terapias para tratar las infecciones crónicas por protozoos parásitos mediante la identificación de mecanismos que permitirían reactivar las funciones efectoras de las células

que alguna vez se reportaron que estaban en un estado no funcional de agotamiento celular. Estos hallazgos resaltan la importancia de la investigación centrada en la memoria de las células T específicamente CD8+, que ha dado como resultado avances tangibles en la salud humana (36).

### **3.6. Respuesta efectiva y agotamiento de células T CD8+ en *Toxoplasma gondii***

El control de la infección de *Toxoplasma gondii* depende principalmente de la respuesta inmune mediada por células. Está demostrado que en el modelo murino, tanto las células T CD4+ como las CD8+ son importantes para el control de la infección (Suzuki Y, Remington JS. 1988)(105), incluyendo la producción de IFN- $\gamma$  y la citotoxicidad mediada principalmente por las células T CD8+ con la liberación de granzima, perforina y especies reactivas de oxígeno (106).

*Toxoplasma gondii* es quizás el parásito más exitoso en todo el mundo, debido a que infecta una variedad extraordinariamente amplia de huéspedes (animales y seres humanos) y casi todos los tipos de células. En la mayoría de los hospedadores inmunocompetentes, la infección primaria ocurre asintóticamente. Pero al final de la etapa de infección aguda, al igual que las anteriores infecciones crónicas, el sistema inmunológico de algunos huéspedes no es capaz de erradicar el patógeno totalmente, por lo que bajo la presión de la inmunidad celular generada, los taquizoitos que son la forma rápida de replicación del parásito se convierten a bradizoitos o quistes que son las formas lentas de replicación o formas "latentes" y preferiblemente colonizan cerebro, músculos y ojos (107). Se cree que la interconversión de taquizoito a bradizoito juega un papel central no solo en el establecimiento de la infección crónica, sino también en el recrudecimiento de la enfermedad (2).

Sin embargo, los factores responsables de la reactivación de la infección crónica *in vivo* siguen siendo poco conocidos.

Por otro lado, las respuestas inmunes locales y sistémicas en la infección por *T. gondii*, son fuertemente dependientes no solo del genotipo del parásito, sino también de la genética y el estado inmune de los infectados. Las células T específicas se activan y adquieren sus funciones efectoras (8,9). Sin embargo, estudios recientes han revelado que en la toxoplasmosis crónica tardía en ratones los linfocitos T CD8+ se vuelven progresivamente agotados y se sugiere que esta disfunción es responsable de la reactivación de la infección latente, que puede resultar en una enfermedad potencialmente mortal en individuos inmunocomprometidos como los pacientes con VIH que usualmente desarrollan encefalitis por *Toxoplasma* (108).

Las células T CD8+ de estos ratones crónicamente infectados se transformaron de células trifuncionales en bifuncionales o monofuncionales e incluso a no funcionales de manera progresiva. Igualmente, la frecuencia total de linfocitos T CD8+ polifuncionales disminuyó considerablemente tanto en el bazo como en el cerebro (11,109). Además estas células presentaron aumento en la apoptosis, una respuesta de memoria deficiente y una expresión elevada del receptor inhibitorio PD-1 (11).

Junto con el agotamiento gradual de CD8+, los parásitos experimentan una reactivación que resulta en la mortalidad del huésped infectado (13). Sin embargo, todavía no está claro si el agotamiento en la toxoplasmosis está determinado genéticamente o es inducido solo por factores microambientales como la alta carga de antígeno, la inflamación (incluidos los factores antiinflamatorios) o ambos durante la fase aguda pueden ser responsables del desarrollo de este fenómeno durante la etapa crónica tardía de la infección.

El tratamiento de ratones infectados crónicamente con el anticuerpo  $\alpha$ PD-L1 redujo la apoptosis de las células T CD8+ y rescató la proliferación y polifuncionalidad de estas, aunque de manera parcial, redujo la conversión del estadio del parásito y la parasitemia, y evitó la mortalidad del huésped (11). En general, existen pruebas sólidas de que el agotamiento de las células T CD8+ desempeña un papel importante en la reactivación de la toxoplasmosis crónica hasta ahora en ratones. Sin embargo, estudios adicionales deberán realizarse para observar el posible rol de otros iRs además de PD-1 durante la infección humana por *T. gondii*, debido a que el papel preciso de estas vías sigue siendo desconocido (25).

**Tabla 1.** Características de los linfocitos CD8+ específicos en el curso de la infección por *Toxoplasma gondii*.

Características	Infección por <i>Toxoplasma</i>	
	Aguda/Crónica temprana	Crónica tardía/Reactivado
Linfocitos CD8+	Funcional → (naïve activado)	Agotado
Grado de polifuncionalidad*	Alto	Bajo
Carga de antígeno <i>T. gondii</i>	Alto-Bajo	Alto
Reacción frente a un segundo encuentro (Recall)	Alto	Bajo
Receptores inhibitorios (ejemplo: PD-1)	Bajo	Alto
Factores de transcripción (T-bet, Eomes)	Bajo	Alto
Apoptosis	Bajo	Alto

\*Linfocitos CD8+ muestran simultáneamente tres actividades: citotoxicidad (granzima B), producción de citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) y proliferación. Modificado de (110).

### **3.7. Toxoplasmosis ocular y recurrencias**

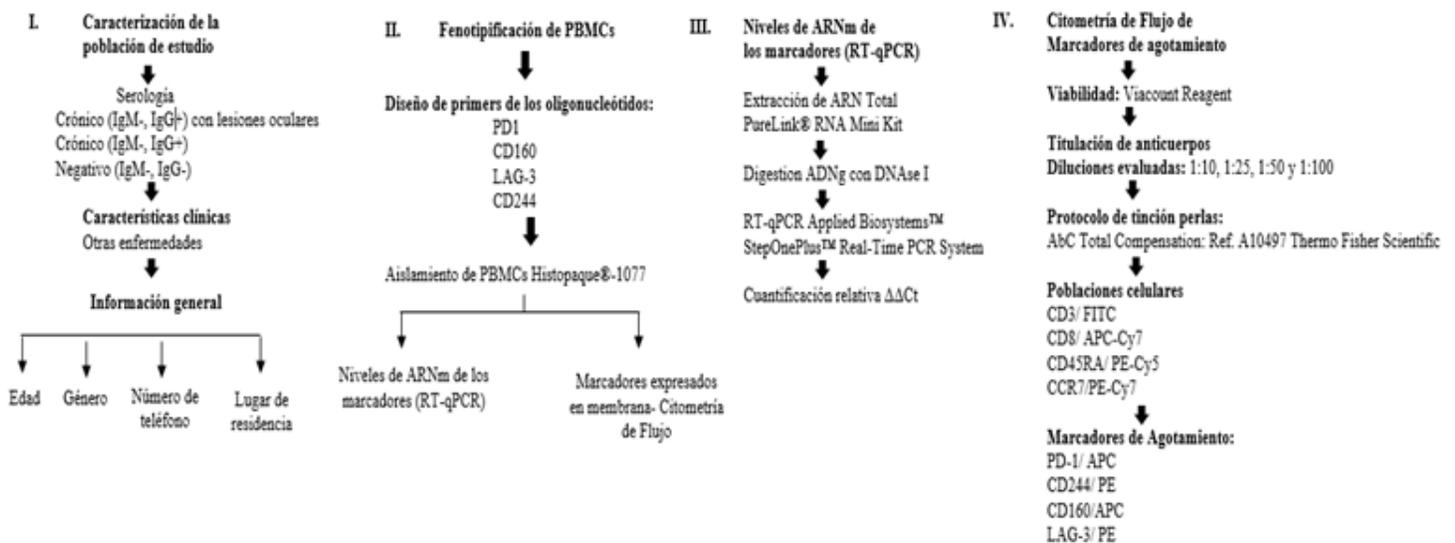
La afectación que el parásito *T. gondii* produce a nivel visual, se conoce como toxoplasmosis ocular (TO). Esta infección puede causar deterioro visual y ceguera (4,111) afectando la calidad de vida de los individuos debido a las secuelas irreversibles por reactivaciones frecuentes de quistes que permanecen en la retina después de la infección inicial (112).

Los determinantes clínicos más importantes del riesgo de reactivación no relacionados con la edad parecen ser la susceptibilidad del huésped y la virulencia del parásito (115). Aunque la TO es una enfermedad recurrente típica, todavía no se sabe porque ocurren las recurrencias y como evitarlas (4), debido a que los tratamientos actuales tienen una eficacia controvertida (116,117). Por tanto, los principales desafíos respecto a esta infección están basados en limitar el daño, evitar secuelas y prevenir las recurrencias a través de la búsqueda de intervenciones inmunológicas basadas en la comprensión clínica y fisiopatológica de la TO (118).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Aspectos bioéticos en la investigación en seres humanos

El uso de sujetos humanos siguió las recomendaciones descritas en la declaración de Helsinki. El consentimiento informado se obtuvo de todos los participantes (**Anexo 12.1**). La aprobación ética se obtuvo del Comité de bioética de la Universidad del Quindío.



**Figura 1.** Diagrama de flujo de la estrategia experimental usada en el presente trabajo. Se muestran las cuatro fases principales en las que se dividieron los experimentos.

### 4.2. Población de estudio

Se incluyeron 5 individuos seronegativos para toxoplasmosis (IgG-IgM-), 5 individuos con toxoplasmosis crónica asintomática (IgG+ IgM- sin lesiones

oculares) y 5 individuos con toxoplasmosis crónica ocular (IgG+ IgM- con lesiones). Los individuos con toxoplasmosis ocular se diagnosticaron por examen de fondo de ojo para establecer si presentaban cicatrices de retinocoroiditis caracterizadas por un médico experto en toxoplasmosis del Centro de Salud de la Universidad del Quindío. Al total de individuos se les realizó una prueba confirmatoria a través de un ELFA comercial del estuche VIDAS TOXO IgG II Ref. 30210 y Toxo IgM Ref. 30202 marca BioMerieux. No se incluyeron en el estudio aquellas personas que tuvieran antecedentes de tratamiento con esteroides, cáncer, transfusiones sanguíneas, enfermedades crónicas por otros parásitos diferentes a *Toxoplasma gondii*, y/o presencia de enfermedades autoinmunes. Las muestras fueron colectadas en el Centro de Salud de la Universidad del Quindío y procesadas en el laboratorio de Biomédicas de la misma Universidad para los ensayos posteriores y en la Universidad Tecnología de Pereira.

Las personas se seleccionaron con base en cinco criterios principalmente: prueba serológica, estado de la enfermedad (agudo o crónico) y características clínicas generales.

#### **4.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)**

Se obtuvieron muestras de sangre total en tubos de recolección con EDTA. El proceso de separación de PBMCs del resto de los elementos de la sangre, se basa en la diferencia de densidad. Para cada muestra de sangre se adicionaron 15 mL de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, USA) en un tubo cónico de 50 mL con 30 mL de sangre. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 700g por 30 min a temperatura ambiente. Se aspiró la capa leucocítica y se realizaron dos lavados con medio RPMI 1640 suplementado con ampicilina (1 µg/ml) - estreptomycin (1 µg/ml). Por último, el sedimento celular obtenido se resuspendió en 1mL del mismo medio (**protocolo optimizado Anexo 12.2**). A las células obtenidas se les realizó conteo en hemocitómetro. Estas células

fueron transportadas en medio frío hasta la Universidad Tecnológica de Pereira.

#### **4.4. Extracción de ARN total de PBMCs**

Se aisló ARN total de PBMCs con el estuche PureLink ARN Mini (Ref. 12183025 Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la eliminación del ADN genómico utilizando DNAsa I (Invitrogen) por 45 min a temperatura ambiente (**protocolo optimizado Anexo 12.3**). Se calculó la concentración y la pureza del ARN extraído por espectrofotometría en un equipo EPOCH (BIOTEK) utilizando solo 2  $\mu$ L de la muestra. Se realizó lectura de densidad óptica a 260 y 280 nm, para medir ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente. Se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Así mismo se verificó la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa.

#### **4.5. Cuantificación de marcadores de agotamiento celular por RT-qPCR**

Se cuantificó por RT-qPCR la expresión de 4 marcadores de agotamiento celular (PD-1, CD-244, LAG-3 y CD-160) en los tres grupos de personas evaluados (oculares, asintomáticos y negativos). Para este fin, se utilizó una estrategia de cuantificación relativa ( $\Delta\Delta$  Ct) (131) usando como método de detección Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step (Applied Biosystems) en un equipo StepOnePlus (Life technologies) empleando el programa de amplificación sugerido por el fabricante. Utilizamos concentraciones de 100 ng de ARN por pozo por triplicado. La razón de pureza varió entre 1.9 y 2.0. Como gen normalizador se utilizó el gen de la GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) a una concentración final de 100nM y como grupo de referencia a los crónicos asintomáticos. La cebadores y condiciones de

amplificación se muestran en la **Tabla 2**. Se usaron controles negativos NTC (sin ARN) y -RT (sin enzima retrotranscriptasa).

Para la amplificación de los marcadores de agotamiento se recuperaron todas las secuencias del GenBank del NCBI. Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa GeneRunner ([www.generunner.net/](http://www.generunner.net/)) tomando las secuencias de referencia reportadas en NCBI. Los números de acceso de las secuencias fueron PD-1 > NM\_005018.2; CD244 >NM 016382.4; LAG-3 >BC052589.1. y CD160 > CCDS72861.1. Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia consenso de cada marcador.

Finalmente, luego del proceso de estandarización se utilizaron los cebadores diseñados para CD244, LAG-3 y CD160 y se probaron y seleccionaron los cebadores para GAPDH y PD1 reportados en la literatura (*GAPDH*: Robert D. Barber, Dan W. Harmer, Robert A. Coleman, and Brian J. Clark. 2005), (*PD1*: Syeda S. Hassan, Muhammad Akram, Elizabeth C. King, Hazel M. Dockrell, Jacqueline M. Cliff. 2015). Los cebadores se analizaron para determinar su temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) con la herramienta Oligo Analyzer 3.1 (Owczarzy et al. 2008) y se analizaron las curvas de melting para indicar la especificidad de los amplicones.

**Tabla 2.** Lista de oligonucleótidos usados como iniciadores en las reacciones de RT-qPCR.

<b>Gen amplificado</b>	<b>Oligonucleótidos</b>
<p><b>GADPH</b></p> <p>69 pb</p> <p>Tm: 73.4</p>	<p><b>Directo:</b></p> <p>5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'</p> <p><b>Reverso:</b></p> <p>5-'AGAGTTAAAAGCAGCCCTGG-3'</p>

<p><b>PD-1</b></p> <p>106 pb</p> <p>Tm: 76.1</p>	<p><b>Directo:</b></p> <p>5'-CGTGGCCTATCCACTCCTCA-3'</p> <p><b>Reverso:</b></p> <p>5'-ATCCCTTGTCCCAGCCACTC-3'</p>
<p><b>CD160</b></p> <p>142pb</p> <p>Tm: 72.2</p>	<p><b>Directo:</b></p> <p>5'-TCACCATAAGCCAAGTCACAC-3'</p> <p><b>Reverso:</b></p> <p>5'-TTCAATCCCGTCACTGTGTAG-3'</p>
<p><b>CD244</b></p> <p>100 pb</p> <p>Tm: 74.2</p>	<p><b>Directo:</b></p> <p>5'-GTTGAGAAACCCCGCCTACA-3'</p> <p><b>Reverso:</b></p> <p>5'-AGGACACATTGCCATCCCTG-3'</p>
<p><b>LAG-3</b></p> <p>104 pb</p> <p>Tm: 74.2</p>	<p><b>Directo:</b></p> <p>5'-GGTCAGCCTCAGGTGGGAAA-3</p> <p><b>Reverso:</b></p> <p>5'-TGGCATCACAGGGTGGGTTT-3'</p>

#### 4.6. Tinción celular de subpoblaciones de linfocitos en PBMCs

Para determinar la presencia y expresión de los marcadores de agotamiento celular evaluados (PD-1, CD-244, LAG-3 y CD-160,) en distintas subpoblaciones de linfocitos presentes en los PBMCs se realizaron ensayos de citometría de flujo. Los anticuerpos incluidos en los paneles de citometría de flujo y su utilidad se describen en la **Tabla 3**. Para determinar las condiciones de detección de los antígenos se realizaron titulaciones de cada

uno de los anticuerpos en PBMCs aislados. Para ello, se partió de la dilución recomendada por la casa comercial y se hicieron cinco diluciones seriadas 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100. Las células ( $1 \times 10^6$  células), se incubaron en oscuridad durante 60 min a 4 °C, y se lavaron dos veces con 100  $\mu$ L del tampón de tinción celular (Biolegend). Las células se cosecharon por centrifugación a 350 g por 5 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 200  $\mu$ L del mismo tampón de tinción. Una vez teñidas las células con los anticuerpos individuales, se adquirieron 200.000 eventos en el citómetro Guava EasyCyte 8H (Merck).

**Tabla 3.** Diluciones seleccionadas para cada conjugado.

Proteína detectada	Anticuerpo	Fluorocromos	Utilidad	Dilución usada
CD3	cat. 300306 Biolegend	FITC	Molécula que se expresa específicamente en timocitos y células T.	1:100
CD8	cat. 344712 Biolegend	APC-Cy7	Molécula que se expresa en la superficie de algunas células T, conocidos como citolíticas.	1:100
CD45RA	cat. 304110 Biolegend	PE-Cy5	Marcador de linfocitos de memoria	1:10
CCR7	cat. 353226 Biolegend	PE-Cy7	Receptor de quimiocinas C-C tipo 7 (proteína codificada por el gen CCR7). Marcador de migración celular.	1:10
PD1	cat. 329908 Biolegend	APC	Molécula que identifica linfocitos activados y/o agotados	1:10

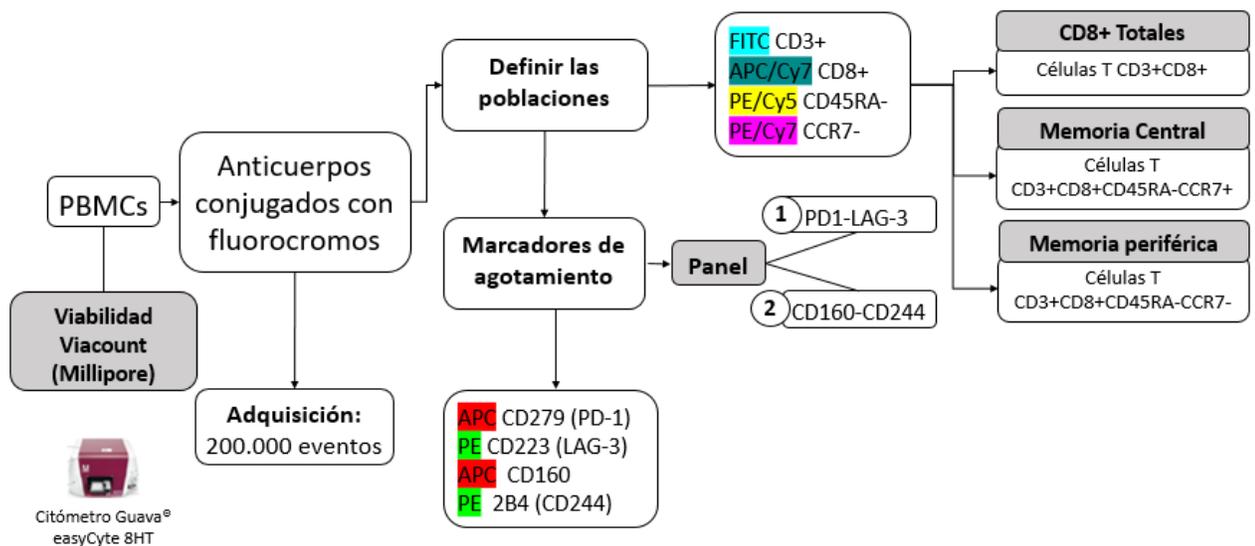
CD244	cat.329508 Biolegend	PE	Molécula que identifica linfocitos activados y/o agotados	1:50
CD160	cat. 341208 Biolegend	APC	Molécula que identifica linfocitos activados y/o agotados	1:10
LAG3	cat.369306 Biolegend	PE	Molécula que identifica linfocitos activados y/o agotados	1:25

#### 4.7. Detección de los marcadores de agotamiento en subpoblaciones de linfocitos

Para la detección simultánea de distintos antígenos, los experimentos de citometría de flujo se compensaron con perlas de captura (AbC Total Compensation: Ref. A10497 Thermo Fisher Scientific) incubadas con los anticuerpos usados (**Tabla 3**). Se usaron controles 'singles' (incubados solo con uno de los anticuerpos), FMO (con todos los anticuerpos, menos uno) y negativos (sin anticuerpo). Se siguieron las indicaciones del fabricante. Para el análisis de los paneles de anticuerpos a evaluar, se adicionaron 50  $\mu$ L de muestra con  $1 \times 10^6$  de PBMCs en placas de 96 pozos. Luego de esto se agregaron 5  $\mu$ L del bloqueador de receptores Fc para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos por estas regiones (Human TruStain FcXTM, Biolegend) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se adicionaron los anticuerpos a las diluciones indicadas (**Tabla 3**) y se incubó a 4° C en oscuridad por 1 hora. Las células se lavaron dos veces con 100  $\mu$ L del tampón de tinción celular y se centrifugaron a 1800 rpm por 5 min (**Anexo 12.5**).

Finalmente, se resuspendió el precipitado de nuevo en tampón de tinción celular. Se analizó la viabilidad de las células obtenidas usando el estuche Guava Viacount Reagent (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante,

aquellas que tenían porcentajes mayores al 80% se adquirieron. Inicialmente se adquirieron 5.000 eventos para ajustar las poblaciones usando las células sin marcar y posteriormente se adquirieron 200.000 eventos por muestra, en el equipo Guava® easyCyte 8HT (MEREK Millipore) y analizados en el software Incyte 3.1 (Millipore). Debido a que algunos de los anticuerpos de las moléculas de agotamiento a evaluar compartían el mismo fluorocromo se hicieron dos paneles de lectura para estos (**Tabla 4**).



**Figura 2.** Esquema del diseño metodológico general de la citometría de flujo.

**Tabla 4.** Paneles de anticuerpos con los genes objetivo.

<b>Panel</b>	<b>Anticuerpos</b>	<b>Objetivo</b>
<b>Panel 1</b>	CD3, CD8, CD45RA, CCR7, <b>PD1, LAG-3</b>	Medir expresión de PD-1 y LAG-3 en la subpoblación de linfocitos de interés.
<b>Panel 2</b>	CD3, CD8, CD45RA, CCR7, <b>CD244, CD160</b>	Medir expresión de CD244 y CD160 en la subpoblación de linfocitos de interés.

#### 4.8 Análisis de datos

Se colectaron datos de expresión de genes por PCR tiempo real (seronegativos, individuos con lesiones oculares y asintomáticos) que se normalizaron con base en el gen GAPDH. Los niveles de expresión entre los grupos estudiados se compararon utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para cada gen (PD-1, CD244, LAG-3 y CD160) (131).

De otro lado, se obtuvieron los porcentajes de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (MFI) en una escala logarítmica de 1–20.000 de las diferentes subpoblaciones de células T CD3+CD8+. Se analizaron 200.000 eventos para cada muestra. Utilizamos tanto la "intensidad de fluorescencia media" (MFI) como el "porcentaje de células positivas" como métricas para la expresión de marcadores de células individuales.

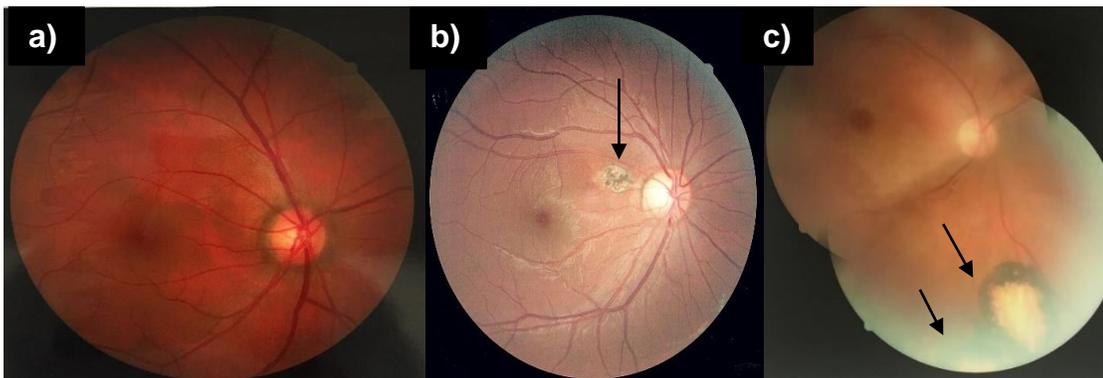
Posteriormente con los datos de los individuos oculares se obtuvo un índice de relación para cada marcador (MFI/%). La asociación entre el número de lesiones y el índice de relación de los individuos oculares se exploró usando el análisis de regresión lineal. La significancia estadística de la correlación se

probó usando la prueba de Pearson, considerando significancia estadística valores menores a  $p < 0,05$  utilizando el software estadístico Prisma 7.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Población de estudio

Las 15 personas seleccionadas fueron 11 mujeres (73%) y 4 hombres (27%) entre los 23 y 52 años de edad, residentes de la ciudad de Armenia y pueblos aledaños (**Tabla 5**). Cinco de los individuos fueron seronegativos para toxoplasmosis, cinco fueron diagnosticados con toxoplasmosis crónica asintomática sin lesiones oculares, y cinco individuos con toxoplasmosis ocular. La evidencia de lesión retinocoroidea es la presencia de lesiones satelitales inactivas (pigmentadas de color oscuro), que indican las áreas locales de cicatrices que involucran la retina y coroides sin actividad al momento de toma de muestra para el estudio (**Fig. 3**).



**Figura 3.** Fotografías de fondo de ojo. **a)** Ojo derecho sano. **b)** Ojo derecho de un individuo con TO con una lesión ocular. **c)** Ojo derecho de un individuo con TO con múltiples lesiones oculares. **Círculo rojo:** Papila del nervio óptico. Las flechas indican la localización de la lesión. La evidencia de lesión

retinocoroidea es la presencia de cicatriz atrófica, con bordes o zonas hiperpigmentadas, que comprometen la retina y la coroides; la evidencia de antecedentes de reactivaciones es la presencia de lesiones satélites inactivas (pigmentadas de color oscuro), que indican las áreas locales de cicatrices que involucran la retina y coroides, sin actividad al momento de la toma de muestra **(Anexo 12.6)**.

**Tabla 5.** Características generales de los individuos incluidos en el estudio.

<b>Grupo</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tipos de lesión</b>	<b>Código del individuo con número de lesiones oculares</b>
Negativos	23-30	M (1) F (4)	NA*	PN111, PN112, PN113, PN114, PN115
Asintomáticos	24-50	M (1) F (4)	NA*	PA106, PA107, PA108, PA109, PA110
Oculares	32-43	M (2) F (3)	Inactivas	PO101, PO102, PO103, PO104, PO105

\*NA: No aplica

## **5.2. Características de los PBMCs**

La sangre periférica es la fuente primaria de obtención de células mononucleares o PBMCs que incluyen en su mayoría células T. A pesar de la variación de la frecuencia de estas poblaciones entre individuos, las células obtenidas tenían rangos de subpoblaciones que se esperaban con un promedio de células de  $6 \times 10^3$  PBMCs/mL de sangre total de los cuales 77,7% corresponden a linfocitos **(Tabla 6)**. En general el porcentaje de viabilidad de los PBMCs obtenidos fue mayor al 90%. Debido a la cantidad de células que se debían obtener de cada individuo se optimizó un protocolo de extracción **(Anexo 12.2)**.

**Tabla 6.** Características de los PBMCs extraídos de sangre total.

Tipo de célula	Rango (%)	Promedio (%)
Granulocitos	10-30	9
Linfocitos	70-90	82,84

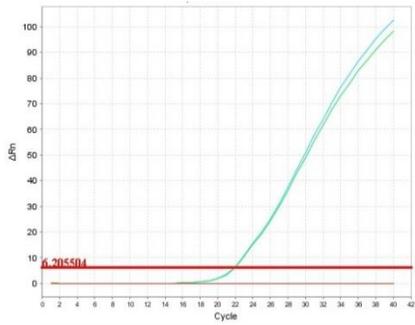
### 5.3. Cuantificación de marcadores de agotamiento celular por RT-qPCR

#### 5.3.1. Estandarización de las condiciones de RT-qPCR para los genes de interés

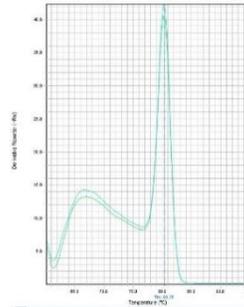
Se obtuvieron concentraciones mayores a 50 ng/μl de ARN y no se observó degradación de ninguna muestra, tal como lo evidenció el corrido electroforético. Para observar la expresión de los cuatro marcadores característicos del fenómeno de agotamiento celular (PD-1, CD-244, LAG-3, CD-160), se probaron por triplicado dichos genes por la técnica de RT-qPCR en un individuo negativo para estandarizar las condiciones de amplificación. Los valores de Ct para el gen constitutivo GAPDH fueron ( $21 \pm 2,1$ ) y para los genes de interés (PD1:  $33 \pm 3,8$ ), (CD244:  $34 \pm 2,9$ ), (LAG-3:  $34 \pm 2,4$ ). En general, hubo poca variabilidad del resultado de Ct entre los ensayos. Asimismo, el análisis de la curva de *melting* o fusión indicó que los fragmentos de amplificación eran específicos y correspondían a los amplicones de interés con temperaturas de fusión para GAPDH de 80,3 °C, PD1 Tm: 88,1°C, CD244 Tm: 81,5°C y LAG-3 Tm: 82,7°C. (**Fig. 4**). Sin embargo, dichas condiciones no fueron las mejores para CD160 luego de probar 4 juegos de cebadores para este gen, por lo que se excluyó del análisis (**Fig. 4e**).

### GAPDH- control endógeno

a)

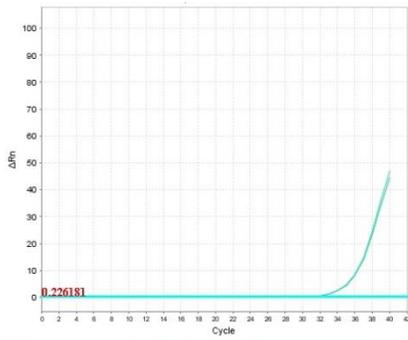


NTC (Sin ARN)  
■  
 -RT  
 (Sin Retrotranscriptasa)  
■  
 M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■

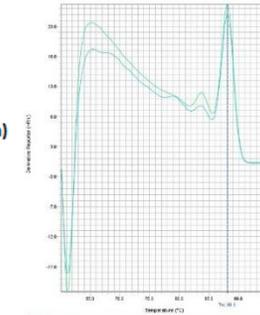


M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■  
**TM: 80.35**  
**CT: 21.91**

b)

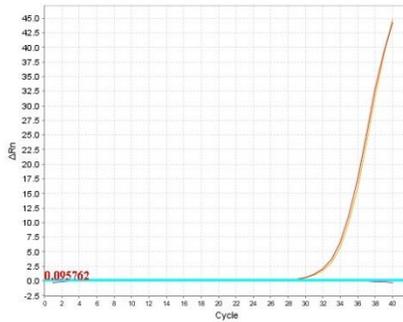


NTC (Sin ARN)  
■  
 -RT  
 (Sin Retrotranscriptasa)  
■  
 M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■

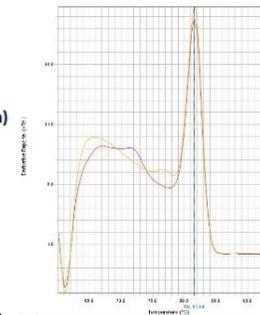


M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■  
**TM: 88.1**  
**CT: 30.28**

c)

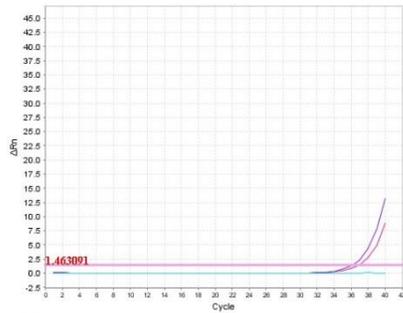


NTC (Sin ARN)  
■  
 -RT  
 (Sin Retrotranscriptasa)  
■  
 M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■

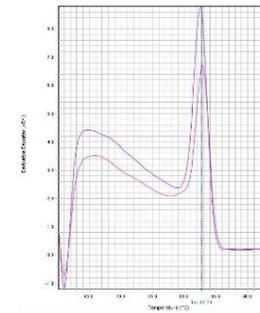


M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■  
**TM: 81.54**  
**CT: 27.34**

d)



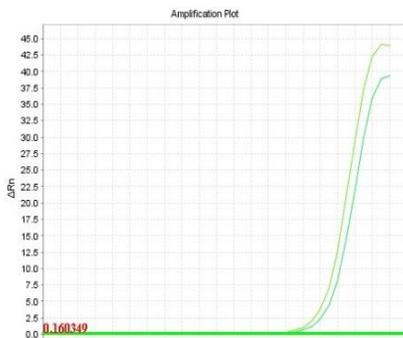
NTC (Sin ARN)  
■  
 -RT  
 (Sin Retrotranscriptasa)  
■  
 M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■



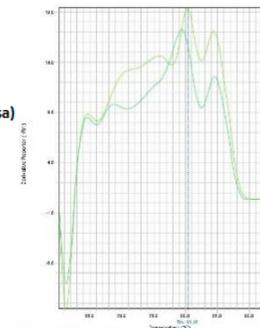
M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■  
**TM: 82.74**  
**CT: 36.30**

### CD160

e)



NTC (Sin ARN)  
■  
 -RT  
 (Sin Retrotranscriptasa)  
■  
 M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■



M (Muestra Neg)  
 PBMCS  
■ ■  
**CT: 31,72**

**Figura 4.** Amplificación de los genes **a)** GAPDH, **b)** PD1, **c)** CD244, **d)** LAG-3 y **e)** CD160 en un individuo seronegativo.

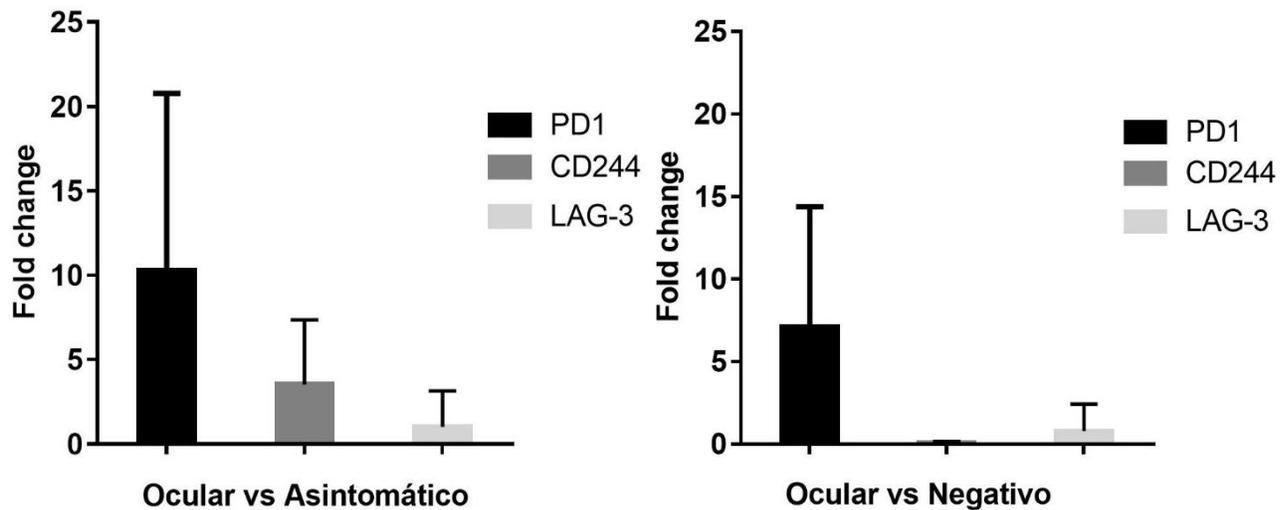
### 5.3.2 Expresión de ARNm de PD1, CD244 y LAG-3 en los individuos oculares respecto a los asintomáticos

Como se esperaba los valores de Ct para los cuatro marcadores de agotamiento en todos los individuos evaluados fueron mayores a los obtenidos para GAPDH ( $24 \pm 0,75$ ), lo que indicó una baja cantidad de los ARNm de estos genes (**Tabla 7**), (**Anexo 12.7**). Para comprobar la consistencia de estos datos se repitieron los ensayos de tiempo real para 3 personas con diferentes alícuotas de ARN y se observaron Ct igualmente elevados.

**Tabla 7.** Promedios de Ct de los marcadores de agotamiento en las poblaciones de personas seleccionadas.

Oculares			Asintomáticos			Negativos		
PD1	CD244	LAG-3	PD1	CD244	LAG-3	PD1	CD244	LAG-3
$31 \pm 3,5$	$34 \pm 2,1$	$33 \pm 2$	$32 \pm 3,1$	$33 \pm 1,8$	$32 \pm 5,4$	$34 \pm 1,10$	$33 \pm 2,34$	$35 \pm 1,17$

De manera interesante, al comparar los niveles de los marcadores entre los grupos, observamos que PD1 tuvo 10 veces más ARNm en los individuos oculares, respecto a los asintomáticos y 7 veces más respecto a los negativos. Igualmente, para CD244 se encontró 3,5 veces más ARNm en el grupo de interés respecto a los asintomáticos. LAG-3 no tuvo diferencias en su expresión por ARNm y fue el menos expresado entre los grupos (**Fig. 5**).



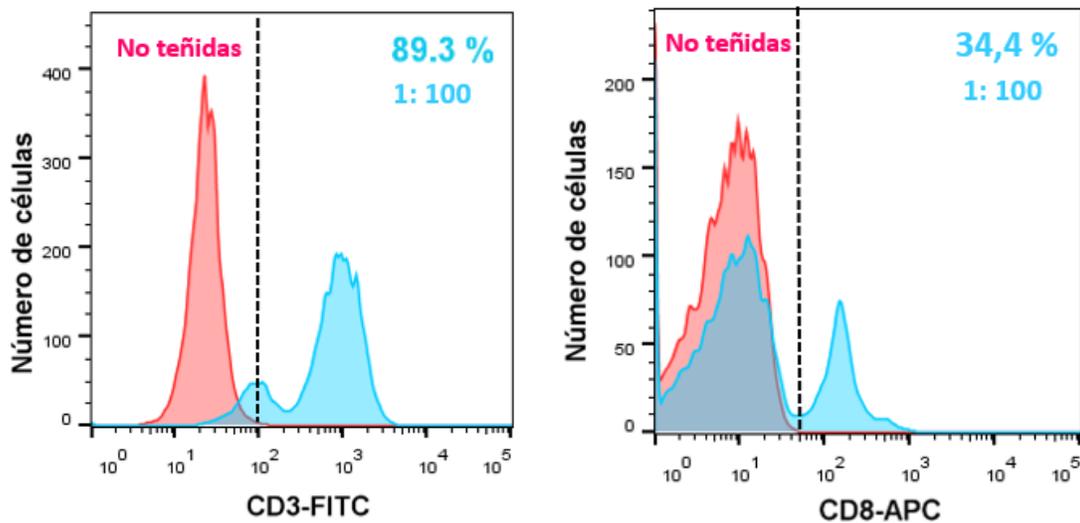
**Figura 5.** Niveles de expresión relativa de los genes PD1, CD244 y LAG-3 en PBMCs de individuos con toxoplasmosis ocular, asintomáticos y seronegativos para *Toxoplasma*. Las barras expresan el promedio más la desviación estándar en el cambio en expresión (*Fold change*) de los pacientes oculares (N=5) con respecto al grupo de asintomáticos (N=5) o Negativos (N=5) para cada uno de los iRs (PD1, CD244 o LAG3).

#### 5.4. Citometría de flujo

##### 5.4.1. Titulación de anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CD45RA, anti-CCR7, anti-PD1, anti-CD244, anti-LAG3 y anti-CD160

Una de las consideraciones más importantes al construir paneles multicolores es la titulación de los anticuerpos, debido a que se requiere identificar la concentración óptima de tinción de estos que diferencie claramente una señal positiva del ruido de fondo o de uniones inespecíficas. El porcentaje de células positivas de las concentraciones seleccionadas fue: anti-CD3/FITC (89,3%)

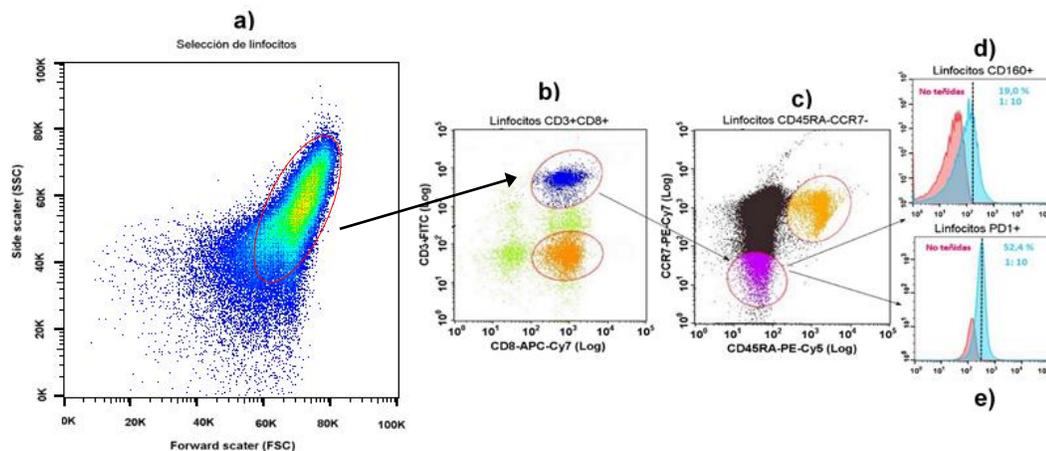
(Fig. 6), anti-CD8/APC (34,4%), anti-CD45RA/PE-Cy5 (55,3%), anti-CCR7/Cy7 (44,8%), anti-PD1/APC (52,4%), anti-CD-244/PE (32,4%), anti-CD-160/APC (19,0%), anti-LAG-3/PE (13,6%) (**Anexo 12.8**).



**Figura 6.** Titulación de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 de linfocitos T en PBMCs. Los histogramas muestran intensidades de fluorescencia de las células negativas (rojas) y positivas (azul). La dilución seleccionada fue 1:100 para ambos anticuerpos poblacionales.

#### 5.4.2 Selección de subpoblaciones celulares

En este trabajo se investigaron los niveles de expresión de los marcadores de agotamiento celular PD1, CD244, LAG-3 y CD160, comparando el porcentaje de células positivas y la intensidad de fluorescencia en células T CD3+CD8+ de dos grupos diferentes de pacientes con toxoplasmosis. El análisis de subpoblaciones celulares permitió identificar los distintos tipos de células que conforman los PBMCs, seleccionar los linfocitos y excluir los desechos (**Fig. 7**).

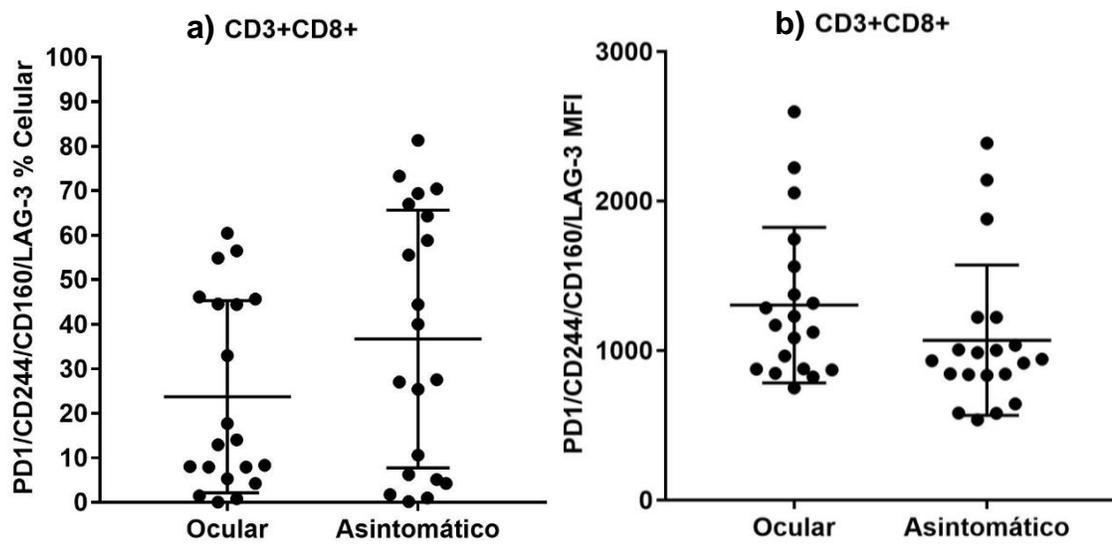


**Figura 7.** Selección de subpoblaciones de linfocitos T CD3+CD8+. **a)** Diagrama de dispersión frontal y lateral para la selección de linfocitos. **b)** Población de células T CD3+CD8+. **c)** Subconjuntos de células T efectoras de memoria que expresan los receptores inhibitorios **d)** CD160 y **e)** PD-1. Además, se evaluaron los marcadores de agotamiento celular en las poblaciones de linfocitos de memoria central (CD45RA-CCR7+). La línea base para la tinción se determinó utilizando controles negativos y controles de isotipo.

Obtuvimos una población aproximada de linfocitos totales de 70 a 85% de los cuales  $\approx 38,99\%$  correspondían a linfocitos T CD3+CD8+. Dentro de este grupo se seleccionaron además las poblaciones CD3+CD8+CD45RA-CCR7+ de linfocitos de memoria central  $\approx 18,6\%$  y CD3+CD8+CD45RA-CCR7- linfocitos de memoria efectora  $\approx 25,5\%$ . En estos subgrupos se identificó el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) de los marcadores de agotamiento. Posteriormente para las muestras oculares se obtuvo un IR que correspondiente a la relación del MFI y el porcentaje celular.

### 5.4.3 Expresión de marcadores de agotamiento celular en linfocitos T obtenidos de sangre periférica

Los niveles de linfocitos T CD3+CD8+ que expresan PD1, CD244, LAG-3 y CD160 fueron estudiados en células mononucleares de individuos oculares e individuos crónicamente infectados. Al comparar el porcentaje de células entre los grupos se observó una tendencia hacia el aumento de células positivas para todos los marcadores en conjunto en los individuos asintomáticos (**Fig. 8a**). Por el contrario, se observó un aumento de los niveles de expresión de estos marcadores por célula (MFI) en los pacientes oculares (**Fig. 8b**). Al comparar estos resultados con las demás subpoblaciones celulares de memoria central y periférica, no encontramos diferencias significativas respecto al porcentaje de células ni al MFI (**Anexo 12.9**).



**Figura 8. Perfil de agotamiento celular.** Expresión de los cuatro marcadores de agotamiento celular PD1, CD244, LAG-3 y CD160 en células T CD3+CD8+. **a)** Porcentaje de células positivas. **b)** Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE (N=5 para cada grupo) para el

porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para la MFI (N=5) en las dos poblaciones de interés.

#### **5.4.4 Niveles de expresión de PD-1, CD244, LAG-3 y CD160 en células T CD8+**

Se ha informado de que los niveles altos de estos marcadores son una indicación de la extensa activación de las células T seguida de agotamiento y que su expresión varía de acuerdo con el tipo celular. Por lo anterior, evaluamos los niveles de cada marcador de manera individual en las células T CD8+ totales.

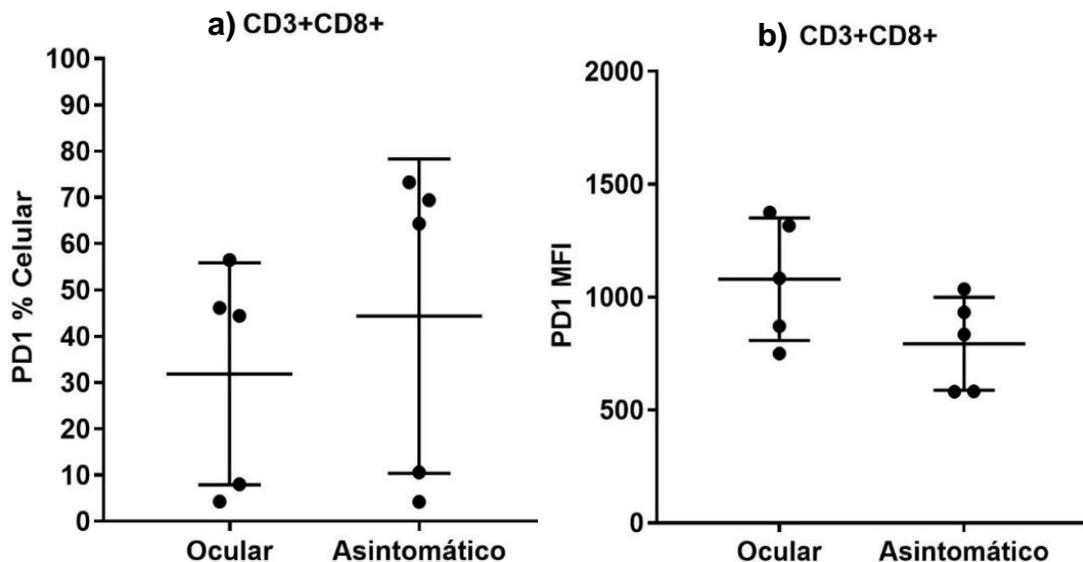
El porcentaje promedio de células PD-1+ fue mayor en los individuos asintomáticos 44,3% (4,2%-73,2%) comparado con los individuos oculares 31,8% (4,2% - 56,4%) (**Fig. 9a**). Por el contrario, se observó un aumento en el MFI de los individuos oculares, indicando una mayor cantidad de moléculas PD1 expresadas por célula (**Fig. 9b**). De otro lado, CD244 tiene funciones activadoras e inhibitorias, que dependen de la densidad de su expresión de la superficie. De igual manera como PD1, el porcentaje promedio de linfocitos T CD8+ positivos para este marcador fue mayor en los individuos asintomáticos 49,4% (27% a 81,3%) respecto a los oculares 30,4% (0,03% a 60,4%) (**Fig.10a**) permaneciendo una tendencia aumentada en MFIs en los oculares, lo que indicaría una mayor densidad de este marcador a nivel membranal (**Fig. 10b**).

Por otra parte, LAG-3 (CD223) que es un regulador negativo de la activación de células T y junto con PD1 son comúnmente expresados en células T agotadas, fue el marcador que se expresó menos. Específicamente, para el total de células T CD8+, el porcentaje promedio de células positivas fue menor en el grupo ocular 8,3% (0,7% a 17,6%) respecto al asintomático 13,6% (0,9%

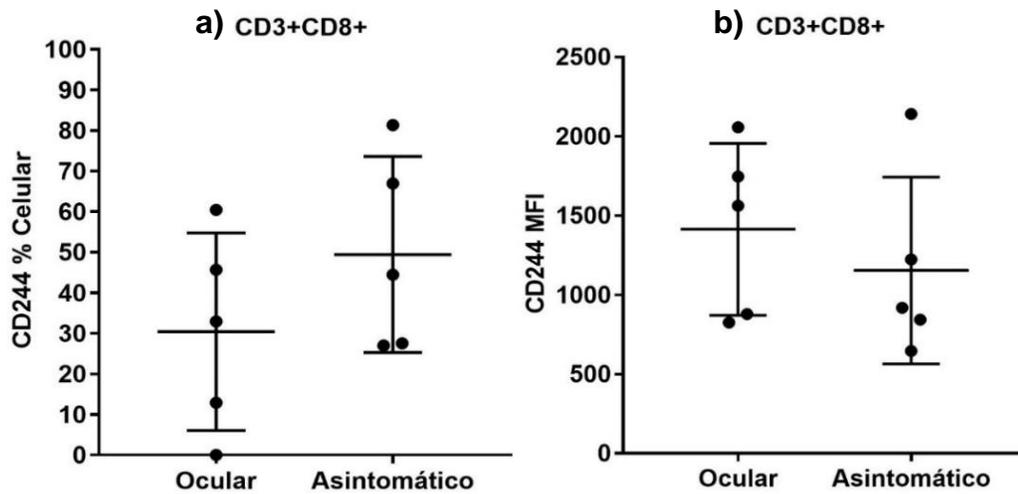
a 40%), sin diferencias entre los dos grupos respecto a la proporción de moléculas expresadas por célula o MFI (**Fig. 11a**).

La expresión de CD160 por su parte, puede inhibir progresivamente la señalización de TCR en los subtipos de células T CD8+ de memoria, por lo cual quisimos evaluar su expresión en estas subpoblaciones. Para el caso de las células T CD8+ totales el comportamiento de este marcador fue similar a los demás. Se observó el promedio del porcentaje de células positivas ligeramente mayor en los individuos asintomáticos 39,2% (5,1% a 70,4%) respecto a los oculares 24,1% (5,2% a 54,8%). Sin embargo, ambos grupos presentaron medidas de fluorescencia similares (**Fig.12b**).

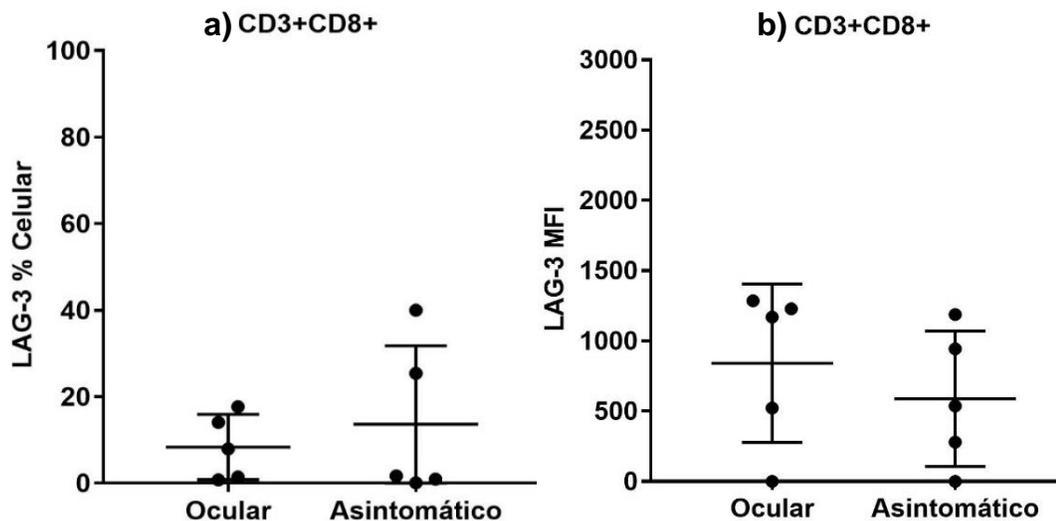
En general, la expresión de estos marcadores resultó ser muy variable entre los grupos. A pesar de esto, de manera interesante la mayoría de los marcadores presentaron un valor mayor de MFI en los individuos oculares para la población total CD3+CD8+, exceptuando LAG-3. Para las demás poblaciones de memoria el porcentaje de células positivas varió entre grupos de acuerdo al marcador y la subpoblación (**Anexo 12.10**).



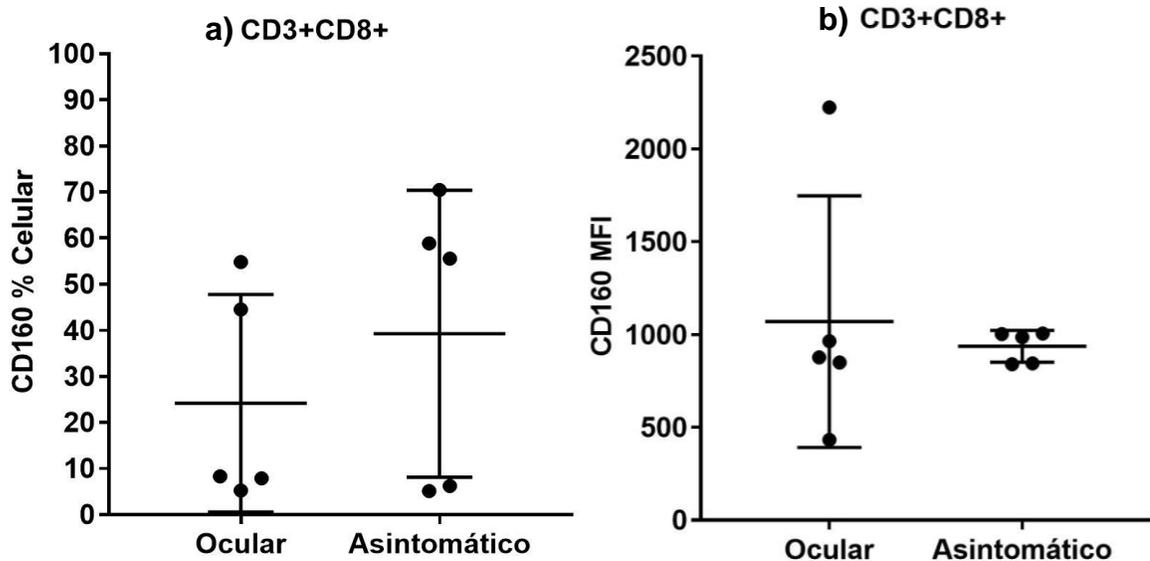
**Figura 9.** Expresión de PD1 en células T CD3+CD8+. **a)** Porcentaje de células positivas. **b)** Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE (N=5 para cada grupo) para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para la MFI (N=5) en las dos poblaciones de interés.



**Figura 10.** Expresión de CD244 en células T CD3+CD8+. **a)** Porcentaje de células positivas. **b)** Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE (N=5 para cada grupo) para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para la MFI (N=5) en las dos poblaciones de interés.



**Figura 11.** Expresión de LAG-3 en células T CD3+CD8+. **a)** Porcentaje de células positivas. **b)** Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE (N=5 para cada grupo) para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para la MFI (N=5) en las dos poblaciones de interés.



**Figura 12.** Expresión de CD160 en células T CD3+CD8+. **a)** Porcentaje de células positivas. **b)** Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para la MFI en las dos poblaciones de interés.

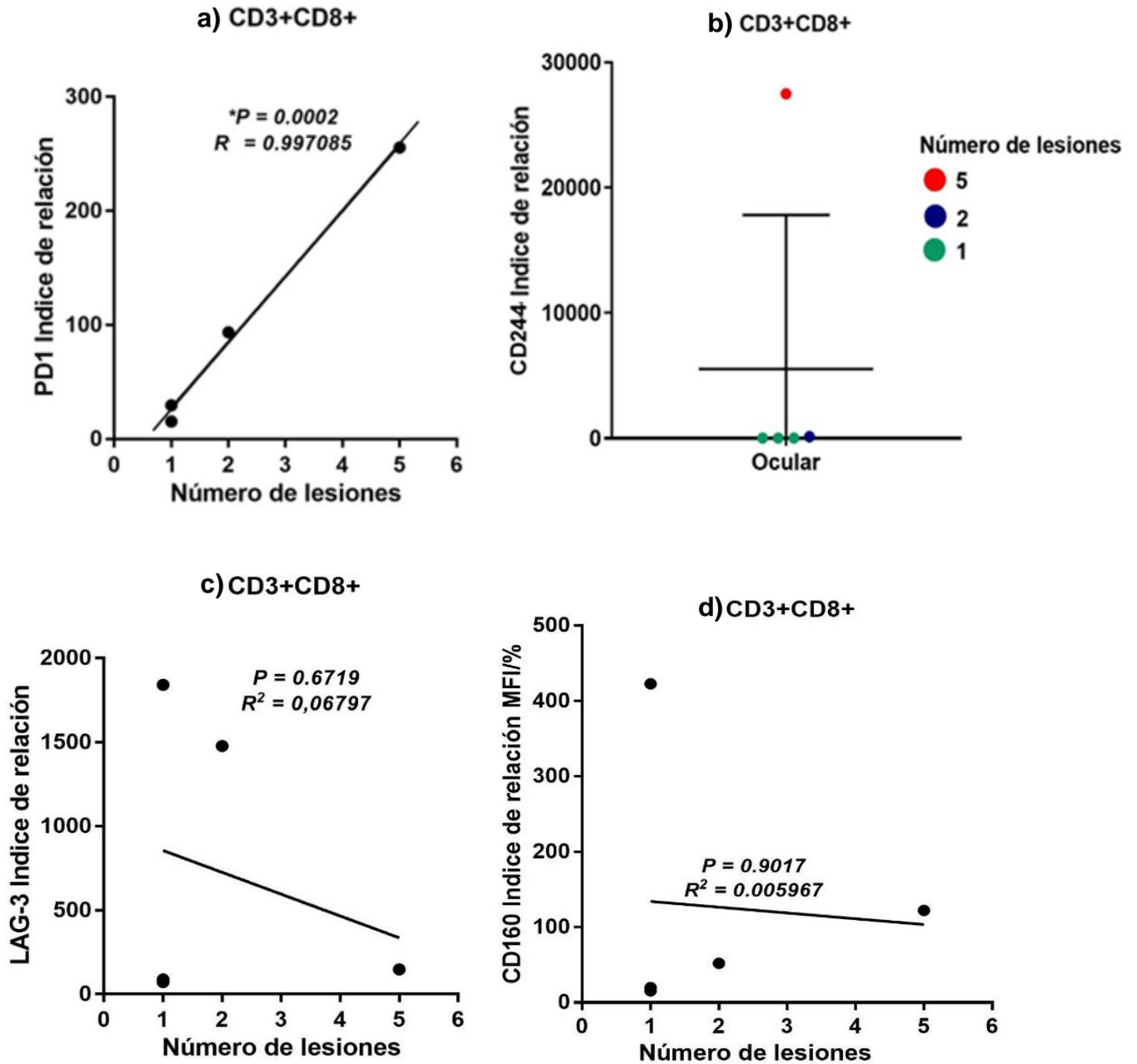
#### 5.4.5. PD1 se expresa en mayor proporción en los individuos oculares con mayor número de lesiones

Ambos grupos expresan niveles basales de estos marcadores que pueden verse alterados debido a múltiples características clínicas propias de la cronicidad de la infección. Sin embargo, los individuos oculares además de tener lesiones, característica clínica que los hace diferentes de los asintomáticos, presentaban números variados de estas. Por lo que como

segunda estrategia decidimos analizar los IR de las células T CD8+ totales respecto a esta característica clínica (número de lesiones), evaluando el coeficiente de correlación a través de la prueba de Pearson, para examinar si la fuerza y la dirección de la relación entre el índice IR (que establece la relación entre el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia) y el número de lesiones tenía un coeficiente de correlación estadísticamente significativo.

Se encontró una correlación positiva lineal fuerte entre ambas variables para el marcador PD1 ( $R= 0,99$ )  $p=0,0002$  (**Fig.13a-b**). De otro lado, CD244, LAG-3 y CD160 no presentaron dicho patrón de correlación con coeficientes R mayores de cero (**Fig.13c-d**).

Investigamos, además, si los patrones de expresión de los marcadores de agotamiento asociados al índice de relación se mantenían en las demás subpoblaciones de células T CD8+ de memoria y no encontramos correlación entre los marcadores de agotamiento evaluados (PD1, CD244, LAG-3 y CD160) y el número de las lesiones de los individuos oculares (**Anexo 12.11**).



**Figura 13.** Expresión de a) PD1, b) CD244, c) LAG-3 y d) CD160 en individuos oculares en células T CD8+. IR: Índice de relación. Las barras representan la media  $\pm$  DE para el IR en la población ocular.

## 6. DISCUSIÓN

La toxoplasmosis ocular ha sido reportada en algunos países como una de las causas más importantes de discapacidad visual siendo en Suramérica más severa que en otros continentes (1). La ausencia de un tratamiento curativo de la enfermedad hace que los pacientes con toxoplasmosis ocular presenten riesgo de desarrollar recurrencias debido a las secuelas irreversibles por reactivaciones frecuentes de quistes que permanecen en la retina después de la infección inicial aumentando la pérdida de la visión (113)(117). Los determinantes clínicos más importantes del riesgo de reactivación corresponden a la susceptibilidad del huésped y la virulencia del parásito (116). Aunque la TO es una enfermedad recurrente típica, no se sabe porque ocurren las recurrencias y como evitarlas (4).

Por otro lado, en cuanto a la fisiopatología de la toxoplasmosis, se ha reportado agotamiento de las células T CD8+ en ratones con toxoplasmosis crónica, caracterizada por el aumento en la expresión del receptor inhibitorio PD-1, la reducción del número de células efectoras, la disminución de la polifuncionalidad, el aumento de la apoptosis, la deficiencia de la respuesta inmune y la baja expansión de estas células importantes para el control de la infección.

De esta manera, la exposición a largo plazo a *T. gondii* a pesar del control inicial de la parasitemia puede provocar una disfunción de las células T CD8+ y la reactivación del parásito (11). De manera interesante, el tratamiento de ratones infectados crónicamente con el anticuerpo  $\alpha$ PD-L1 redujo la apoptosis de las células T CD8+ y aumentó la proliferación y polifuncionalidad de estas, aunque de manera parcial. Significativamente, el bloqueo de la interacción PD-1/PDL-1 no solo redujo la conversión del estadio del parásito y la parasitemia, sino que también evitó la mortalidad del huésped (11).

En general, existen pruebas sólidas en el modelo ratón de que el agotamiento de las células T CD8+, asociada principalmente a la expresión de iRs, desempeña un papel importante en la reactivación de la toxoplasmosis crónica. Sin embargo, hasta el momento no se han identificado iRs además de PD-1 durante la infección humana por *T. gondii*. Por lo tanto, en este estudio detectamos y caracterizamos los marcadores de agotamiento celular PD-1, CD244, LAG-3 y CD160 en individuos con toxoplasmosis ocular.

Inicialmente, hemos analizado la expresión basal del ARNm de PD-1, CD244 y LAG-3 en PBMCs aislados de sangre periférica de individuos sanos e infectados crónicamente (asintomáticos y sintomáticos) a través de ensayos de RT-qPCR. En general nuestros resultados indicaron que la cantidad de ARNm de estos marcadores en las células mononucleares de sangre periférica fue baja en todos los individuos analizados, siendo mucho menor en los individuos sanos.

Específicamente, la expresión de ARNm de PD1 un factor importante en la reactivación de enfermedades crónicas fue 7 veces mayor en los individuos oculares comparados con los individuos sanos (**Fig. 5**), tal como se ha descrito previamente, la expresión este marcador se regula rápidamente tras la activación de las células T (120), y puede persistir a niveles moderados en humanos sanos (121).

De manera interesante, encontramos un aumento de ARNm PD1 de hasta 10 veces en los individuos oculares respecto a los asintomáticos (**Fig. 5**). Lo que indicaría posiblemente una relación de los niveles de este receptor inhibitorio con la TO, como se ha asociado previamente en otras patologías (95,122). Concomitantemente con el aumento de PD1, encontramos que la expresión de ARNm CD244 aumentó 3,5 veces en los individuos oculares respecto a los asintomáticos (**Fig. 5**). Trabajos anteriores indican que la presencia aumentada de CD244 regula la función de las células NK y de las células T y

se correlaciona con la persistencia de VHB o VHC en humanos (123,124). Por su parte, LAG-3 otro marcador importante del estado de agotamiento de las células T, fue igual en el grupo ocular comparado con el asintomático (**Fig. 5**). Estos resultados en conjunto podrían sugerir un posible estado inmune alterado asociado a la patología clínica de la TO.

En adición a los resultados obtenidos por tiempo real, identificamos la presencia de los receptores inhibitorios expresados en la membrana celular a través de citometría de flujo. En general se ha descrito que cuanto mayor sea el número de receptores inhibitorios expresados por las células T agotadas, más severo será el agotamiento que se verá reflejado en la gravedad de la infección crónica (54). Para el caso de las células T CD8+ específicas de virus durante la infección crónica en modelos animales y humanos, se ha encontrado expresión conjunta de LAG-3, CD244 (2B4), CD160, TIM-3, CTLA-4 y muchos otros iRs (58). De hecho, la expresión de múltiples iRs es una característica fundamental del estado celular agotado (53).

Nuestros resultados sugieren que los porcentajes de linfocitos T CD8+ que expresan los marcadores PD1, CD244, LAG-3 y CD160 fueron menores en los individuos oculares respecto a los asintomáticos (**Fig. 8a**), posiblemente por la disminución del total de células que expresan estos marcadores asociados a niveles elevados de apoptosis. Como se ha descrito las células T agotadas pueden sucumbir favorablemente a la eliminación (32,125). De igual manera, algunos trabajos postulan que al interferir con el proceso apoptótico de las células T, los parásitos pueden subvertir los mecanismos de formación de la memoria y reducir el número de células T específicas disponibles para combatir el patógeno a largo plazo (126).

Se observó además, un aumento de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de todos los marcadores de agotamiento celular observados en conjunto en los individuos oculares (**Fig. 8b**), lo que indicaría posiblemente un fenotipo

de agotamiento debido principalmente a la expresión aumentada por célula de estos iRs en células T CD8+ totales, ya que tanto el nivel de expresión de los receptores individuales, y con frecuencia el número de receptores expresados, puede reflejar la gravedad de la infección crónica (54).

Mientras que muchos iRs se regulan al alza durante la activación, la expresión alta y sostenida de los receptores inhibidores es una característica canónica de las células Tex (células T agotadas: T cell exhaustion) (66), durante el establecimiento de las enfermedades crónicas. Sin embargo, las proporciones de estos receptores varían de acuerdo a la enfermedad y a los niveles de agotamiento (128).

A pesar de esto, es usual en enfermedades provocadas por protozoos parásitos encontrar agotamiento de células T asociado a la expresión elevada de PD1. Butler NS y colaboradores en 2012 observaron una disfunción de células T CD4+ de niños de Malí con malaria, y se atribuyó a la alta expresión de no solo de PD-1 sino también LAG-3 (100). Otros estudios han identificado alta expresión de MFI de los receptores inhibitorios 2B4 y LAG-3 (127) en la población de células T CD4+ específica durante la infección crónica de ratones con *T. gondii* asociado al incremento de PD-1+.

En consecuencia, PD-1 el principal marcador de agotamiento celular que se encontró en ratones con *T. gondii*, que se expresa preferentemente en células T CD8+ que las hace susceptibles a la apoptosis (12). Unido al agotamiento graduado de CD8+, los parásitos experimentan reactivación del parásito que resulta en la mortalidad del huésped infectado (13). El agotamiento de células T CD8+ involucra no solo una expresión elevada del receptor inhibitorio de muerte celular programada (PD-1) (22).

Cuando observamos los niveles individuales de cada marcador, encontramos que similar a la evaluación de todos los marcadores, los porcentajes promedios de células positivas PD1+ y CD244+ tienen una distribución mayor en los individuos asintomáticos y contrariamente menores niveles de MFI comparados con los individuos oculares (**Fig. 9a, 10a, y 11a**). Una posibilidad es que los individuos oculares tengan menos porcentaje de células positivas debido a que exhiben una apoptosis mayor antes mencionada propia del agotamiento en su compartimento de células T CD8+.

Respecto al receptor PD1, nuestro estudio observó niveles aumentados de expresión de MFI de este marcador en la TO que podrían permitir que la infección se mantenga al prevenir la eliminación de *T. gondii*, asociado a un proceso gradual de agotamiento y una respuesta débil de células T efectoras en respuesta a la reactivación del parásito en la TO humana (**Fig. 9b, 10b, y 11b**).

Como se ha descrito en otros estudios, la expresión aumentada de PD1 se ha asociado con una capacidad reducida para controlar la latencia de algunos patógenos (66). Congruente con el aumento de PD1 durante la infección por *P. falciparum* en el ser humano, la disfunción de las células T CD4+ tuvo un impacto negativo en la inducción de las respuestas protectoras de anticuerpos específicos de *Plasmodium*, y por ende la permanencia del parásito en sangre. De igual manera, en infecciones por *Plasmodium chaubudi*, las células T CD8+ y CD4+ mostraron firmas de agotamiento que dependían exclusivamente de la expresión de PD-1, lo que dio como resultado la aparición de malaria experimental persistente (101).

Identificamos la expresión de múltiples iRs principalmente ARNm de PD1 seguido de CD244 y menor proporción CD160 y LAG-3 (**Fig. 5- Figura 9a**). La expresión de este último a menudo se encuentra en células T<sub>ex</sub>, aunque su detección en sangre periférica en humanos, en comparación con el sitio de

infección, es un desafío en algunas enfermedades (74,75). Lo que posiblemente indicaría porque no identificamos expresión aumentada de este marcador ni a nivel del ARNm ni de proteína en membrana.

En conjunto nuestros resultados sugieren que posiblemente el aumento en la membrana denotado por el MFI de estos iRs, corresponda a un fenotipo de agotamiento parcial ya previamente descrito en otras infecciones crónicas (22,25). Correlacionado no solamente con el número de diferentes receptores expresados, sino también con el nivel de expresión de cada receptor individual durante infecciones en ratones y humanos (54,129). Asociado, además a la observación de una correlación positiva fuerte entre el índice de relación que une el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia MFI y el número de lesiones oculares de los individuos sintomáticos para el marcador fundamental del agotamiento celular PD1 (**Fig. 13**).

Congruente con nuestra hipótesis, el agotamiento parcial de estas células sugiere una falta de respuesta inmune completamente efectiva, que podría estar asociada al desarrollo de la toxoplasmosis ocular. Nuestros resultados muestran correlación, no necesariamente causalidad, entre el agotamiento parcial de células T CD8+ y el número de lesiones. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el eje PD-1 identificado en este trabajo ejerce su papel en la TO humana aún no se ha dilucidado y los patrones observados en este estudio deben confirmarse con cohortes más grandes.

De otro lado, las poblaciones de células T CD8+ de memoria central y periférica no presentaron patrones de expresión notablemente diferenciados de los marcadores de agotamiento evaluados en conjunto (**Anexo 12.9**) ni la expresión de los marcadores a nivel individual (**Anexo 12.10**). En general, se ha reportado que no todas las subpoblaciones celulares demuestran un fenotipo agotado igualmente rápido, las infecciones provocan respuestas de células T específicas de múltiples epítomos, pero no todas las especificidades

son igualmente propensos al agotamiento (15,16,72,130). Este silenciamiento diferencial de respuestas, incluso dentro del mismo huésped, puede ser consecuente debido a que algunos subtipos de células T que son más efectivas para erradicar los patógenos pueden ser inactivadas funcionalmente y más rápidamente eliminadas (63,72,125).

Si bien el paradigma del agotamiento de las células T CD8+ se ha explorado ampliamente en los modelos virales crónicos (22), apenas está comenzando a desarrollarse en las infecciones parasitarias. A pesar de esto se ha descrito como un fenómeno inmune común, observado en el curso de infección por *T. gondii* en ratones y otras infecciones por apicomplexos (21).

## 7. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indicaron que la cantidad de ARNm de estos marcadores en PBMCs fue baja en todos los individuos analizados, siendo mucho menor en los individuos sanos. De manera interesante, encontramos que la expresión de ARNm de PD1 fue 10 veces mayor en los individuos oculares, respecto a los asintomáticos y 7 veces mayor en los oculares respecto a los negativos. Asimismo, identificamos 3,5 veces más ARNm de CD244 en el grupo de interés respecto a los asintomáticos, y no observamos ninguna diferencia para LAG-3. Congruente con los resultados de tiempo real, los resultados de citometría indicaron un aumento en los niveles de expresión de estos marcadores por célula (MFI) en los individuos con TO en la población total de linfocitos T CD8+. De manera contraria, no se observaron diferencias en las subpoblaciones celulares de memoria central y periférica. Encontramos además una correlación positiva lineal fuerte entre el índice de relación del marcador PD1 y el número de lesiones de los individuos oculares.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que existe un fenotipo parcial de agotamiento celular en individuos con lesiones oculares asociadas con la infección por *T. gondii* en humanos, un fenómeno similar a lo reportado en ratones y en otras infecciones parasitarias. Lo que permite avanzar en el conocimiento de la respuesta inmune frente a la infección ocular en humanos.

## 9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda para los posteriores estudios inmunológicos aumentar la cantidad de sangre extraída debido a la poca frecuencia de las subpoblaciones de células T de memoria a nivel celular.
- Asociar otras características clínicas como el índice de recurrencia (altos o bajos), tiempo de infección, tamaño de la lesión, individuos con tratamiento y sin tratamiento con los niveles de los marcadores de agotamiento aquí estudiados.
- Evaluar factores de transcripción como *T-bet* y *Eomes* y factores extrínsecos como las citoquinas efectoras (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y Granzima B) y las citoquinas reguladoras (TGF $\beta$ , IL-10, VEGF) en PBMCs de individuos oculares. Asimismo, en humor acuoso identificar citoquinas relacionadas con el agotamiento como la IL-7 y la IL-15.
- Identificar los niveles de los marcadores de agotamiento celular PD1, CD244, LAG-3 y CD160 en individuos con y sin tratamiento anti-*Toxoplasma*.
- Sería interesante luego de este trabajo hacer una disección más detallada de la respuesta de las células T CD8+ frente a *Toxoplasma* usando tetrameros que identifiquen células específicas de antígeno.
- Observar los niveles de estos marcadores de agotamiento en células T CD4, esto debido a que la respuesta inmune contra *T. gondii* involucra no solo células T CD8+ sino también células T CD4+.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Randall LM, Hunter CA. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. *Eur J Microbiol Immunol*. 2011; 1 (1): 3–9.
2. Lyons RE, Mcleod R, Roberts CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite – bradyzoite interconversion. 2002; 18 (5): 198–201.
3. Holland GN, Lewis KG. An update on current practices in the management of ocular toxoplasmosis. Vol. 134, *American Journal of Ophthalmology*. 2002. p. 102–14.
4. De-La-Torre A, Rios-Cadavid AC, Cardozo-García CM, Gomez-Marín JE. Frequency and factors associated with recurrences of ocular toxoplasmosis in a referral centre in Colombia. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93 (8): 1001–4.
5. Heringer GC, Oueghlani E, Dell’Omo R, Curi ALL, Oréface F, Pavésio CE. Risk of reactivation of toxoplasmic retinitis following intraocular procedures without the use of prophylactic therapy. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(9):1218–20.
6. Denkers EY, Sher A, Section CB, Diseases I. CD8 + T-cell interactions with *Toxoplasma gondii* : implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition. 1988; 258–60.
7. Gigley JP, Bhadra R, Khan IA. CD8 T Cells and *Toxoplasma gondii* : A New Paradigm . *J Parasitol Res*. 2011; 2011: 1–9.
8. Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev*. 2011; 240 (1): 269–85.
9. Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol [Internet]*. 1992; 149 (1): 175–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1351500>

10. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* [Internet]. 2011; 12 (6): 492–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2035>
11. Bhadra R, Gigley JP, Weiss LM, Khan IA. Control of *Toxoplasma* reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108 (22): 9196–201.
12. Bhadra R, Gigley JP, Khan IA. PD-1-mediated attrition of polyfunctional memory CD8+ T cells in chronic *Toxoplasma* infection. *J Infect Dis*. 2012; 206 (1): 125–34.
13. Bhadra R, Khan IA. Redefining Chronic Toxoplasmosis — A T Cell Exhaustion Perspective. 2012; 8 (10): 8–11.
14. Splitt SD, Souza SP, Valentine KM, Castellanos BE, Curd AB, Hoyer KK, et al. PD-L1, TIM-3, and CTLA-4 Blockade Fails To Promote Resistance to Secondary Infection with Virulent Strains of *Toxoplasma gondii* . *Infect Immun*. 2018; 86 (9): e00459-18.
15. Blattman JN, Ahmed R, Suresh M, Altman JD, Zajac AJ, Sourdive DJD, et al. Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *J Exp Med*. 1998; 188 (12): 2205–13.
16. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-krishna K, Most R Van Der, Ahmed R. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. 2003; 77 (8): 4911–27.
17. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99 (19): 12293-12297.

18. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 2005; 65 (3): 1089-1096.
19. Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, Martínez GJ, Quiroga MF, Abbate E, et al. Programmed Death (PD)-1:PD-Ligand 1/PD-Ligand 2 Pathway Inhibits T Cell Effector Functions during Human Tuberculosis. 2008; 181 (1): 116-125.
20. Singh A, Mohan A, Dey AB, Mitra DK. Inhibiting the Programmed Death 1 Pathway Rescues Mycobacterium tuberculosis – Specific Interferon  $\gamma$  – Producing T Cells From Apoptosis in Patients With Pulmonary Tuberculosis. 2013; 208: 603–15.
21. Gigley JP, Bhadra R, Moretto MM, Khan IA. T cell exhaustion in protozoan disease. *Trends Parasitol* [Internet]. 2012; 28 (9): 377–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.001>
22. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity.* 2007; 27 (4): 670–684.
23. Doering TA, Crawford A, Angelosanto JM, Paley MA, Ziegler CG, Wherry EJ. Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory. *Immunity.* 2012; 37 (6): 1130–1144.
24. Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, Doering TA, Odorizzi PM, Barnett BE, et al. Molecular and Transcriptional Basis of CD4+ T Cell Dysfunction during Chronic Infection. *Immunity.* 2014; 40 (2): 289–302.
25. Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity* [Internet]. 2016; 44 (5): 1052–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.022>

26. Bhadra R, Gigley JP, Weiss LM, Khan IA. Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108 (22): 9196–201.
27. Mescher MF, Curtsinger JM, Casey KA, Hammerbeck CD. Signals required for programming effector and memory development by CD8 + T cells. 2006; 211: 81–92.
28. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev.* 2009; 229: 5–11.
29. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology.* 2012; 12: 749–761.
30. Masopust D, Schenkel JM. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology.* 2013; 13: 309–320.
31. Youngblood B, Hale JS, Kissick HT, Ahn E, Xu X, Wieland A, et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature.* 2017; 552: 404–409.
32. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011; 12: 492–499.
33. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining Chronic Viral Infection. *Cell.* 2009; 138 (1): 30–50.
34. Williams MA, Bevan MJ. Effector and Memory CTL Differentiation. *Annu Rev Immunol.* 2006; 25 (1):171–92.
35. Jameson SC, Masopust D. Diversity in T Cell Memory: An Embarrassment of Riches. *Immunity.* 2009; 31 (6): 859 – 871.
36. Youngblood B, Hale JS, Ahmed R. Memory CD8 T cell transcriptional plasticity. *F1000Prime Rep.* 2015; 7: 1–10.
37. Golubovskaya V, Wu L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2016; 8 (3): 36

38. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: Implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2: 251–262.
39. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: Defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends in Immunology*. 2014; 35 (2): 51–60.
40. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002; 8: 793–800.
41. Zhu G, Chen L, van Deursen JMA, Dong H, Tamada K, Flies DB. B7-H1 Determines Accumulation and Deletion of Intrahepatic CD8+ T Lymphocytes. *Immunity*. 2004; 20 (3): 327–36.
42. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*. 1993; 362: 758–761.
43. Fuller MJ, Zajac AJ. Ablation of CD8 and CD4 T Cell Responses by High Viral Loads. *J Immunol*. 2003; 170 (1): 477-486.
44. Shin H, Wherry EJ. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. 2007; 408–15.
45. Utzschneider DT, Legat A, Fuertes Marraco SA, Carrié L, Luescher I, Speiser DE, et al. T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. *Nat Immunol*. 2013; 14: 603–610.
46. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 2007; 27: 670–84.
47. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4: 33 –347.

48. Chemnitz JM, Parry R V., Nichols KE, June CH, Riley JL. 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.* 2004; 173 (2): 945–54.
49. Bretscher P, Cohn M. A Theory of Self-Nonself Discrimination. 1970; 169 (3950): 1042–1049.
50. Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1975; 53 (1): 27-42.
51. Cunningham AJ, Lafferty KJ. A Simple, Conservative Explanation of the H-2 Restriction of Interactions Between Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology.* 1977; 6 (1-2): 1-6.
52. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007; 8 (3): 239–45.
53. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol [Internet].* 2015; 15 (8): 486–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3862>
54. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 2009; 10 (1): 29–37.
55. Leibson PJ. The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16 (3): 328–36.
56. Watts TH. Tnf/Tnfr Family Members in Costimulation of T Cell Responses. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23 (1): 23–68.

57. Vigan S, Perreau M, Pantaleo G, Harari A. Positive and negative regulation of cellular immune responses in physiologic conditions and diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 1-11.
58. Krummel BMF, Allison J. CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T cells to Stimulation. 1995; 182 (2): 459-65.
59. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-sogawa K, Zeng H, Hashimoto-tane A, et al. Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Negative Regulation of T Cell Activation. *Immunity*. 2010; 33 (3): 326–39.
60. Cai G, Anumanthan A, Brown JA, Greenfield EA, Zhu B, Freeman GJ. CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol*. 2008; 9 (2): 176–85.
61. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8 + T cell survival in HIV infection. 2006; 203 (10): 2281–92.
62. Petrovas C, Price DA, Mattapallil J, Ambrozak DR, Geldmacher C, Cecchinato V, et al. SIV-specific CD8 2 T cells express high levels of PD1 and cytokines but have impaired proliferative capacity in acute and chronic SIVmac251 infection. 2007; 110 (3): 928–37.
63. Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105 (39): 15016-21.
64. Workman CJ, Cauley LS, Kim I, Blackman A, Woodland DL, Vignali DAA. Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates the Size of the Expanding T Cell Population Following Antigen Activation In Vivo. 2004; 172 (9): 5450-5455.

65. Jin HT, Jeong YH, Park HJ, Ha SJ. Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. *BMB Rep.* 2011; 44 (4): 217–31.
66. Barber DL, Zhu B, Wherry EJ, Allison JP, Freeman GJ, Ahmed R, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006; 439 (7077): 682–7.
67. Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, Johnnidis JB, Dolfi D V., Barnett BE, et al. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* (80- ). 2012; 338 (6111): 1220–5.
68. Wei F, Zhong S, Ma Z, Kong H, Medvec A, Ahmed R, et al. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. *Proc Natl Acad Sci.* 2013; 110 (27): E2480-9.
69. Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, Duraiswamy J, Akondy RS, West EE, et al. Chronic Virus Infection Enforces Demethylation of the Locus that Encodes PD-1 in Antigen-Specific CD8+ T Cells. *Immunity.* 2011; 35 (3): 400-12.
70. Youngblood B, Noto A, Porichis F, Akondy RS, Ndhlovu ZM, Austin JW, et al. Cutting Edge: Prolonged Exposure to HIV Reinforces a Poised Epigenetic Program for PD-1 Expression in Virus-Specific CD8 T Cells. *J Immunol.* 2013; 191(2): 540-4.
71. 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. *Nature Immunology.* 2013; 14 (12): 1212-8.
72. Fuller MJ, Khanolkar A, Tebo AE, Zajac AJ. Maintenance, Loss, and Resurgence of T Cell Responses During Acute, Protracted, and Chronic Viral Infections. *J Immunol.* 2004; 172 (7): 4204-14

73. Richter K, Agnellini P, Oxenius A. On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int Immunol*. 2009; 22 (1): 13–23.
74. Kennedy PTF, Sandalova E, Jo J, Gill U, Ushiolumb I, Tan AT, et al. Preserved T-cell function in children and young adults with immune-tolerant chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2012; 143 (3): 637-645.
75. Kroy DC, Ciuffreda D, Cooperrider JH, Tomlinson M, Hauck GD, Aneja J, et al. Liver environment and HCV replication affect human T-cell phenotype and expression of inhibitory receptors. *Gastroenterology*. 2014; 146 (2): 550-61.
76. Valiante NM, Trinchieri G. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J Exp Med*. 1993; 178(4): 1397–1406.
77. B A Garni-Wagner, A Purohit, P A Mathew, M Bennett VK. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol*. 1993; 151 (1): 60-70.
78. Nakajima H, Cella M, Langen H, Friedlein A, Colonna M. Activating interactions in human NK cell recognition: The role of 2B4-CD48. *Eur J Immunol*. 1999; 29 (5): 1676-83.
79. Tangye SG, Cherwinski H, Lanier LL, Phillips JH. 2B4-mediated activation of human natural killer cells. *Mol Immunol*. 2000; 37 (9): 493-501.
80. Stepp SE, Schatzle JD, Bennett M, Kumar V, Mathew PA. Gene structure of the murine NK cell receptor 2B4: Presence of two alternatively spliced isoforms with distinct cytoplasmic domains. *Eur J Immunol*. 1999; 29 (8): 2392-9.

81. Schatzle JD, Sheu S, Stepp SE, Mathew PA, Bennett M, Kumar V. Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96(7): 3870–3875.
82. Bensussan A, Gluckman E, el Marsafy S, Schiavon V, Mansur IG, Dausset J, et al. BY55 monoclonal antibody delineates within human cord blood and bone marrow lymphocytes distinct cell subsets mediating cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91(19): 9136–9140.
83. Maiza H. A novel 80-kD cell surface structure identifies human circulating lymphocytes with natural killer activity. *J Exp Med.* 2004; 178 (3): 1121–6.
84. Maeda M, Carpenito C, Russell RC, Dasanjh J, Veinotte LL, Ohta H, et al. Murine CD160, Ig-Like Receptor on NK Cells and NKT Cells, Recognizes Classical and Nonclassical MHC Class I and Regulates NK Cell Activation. *J Immunol.* 2005; 175 (7): 4426-32.
85. Agrawal S, Marquet J, Freeman GJ, Tawab A, Bouteiller PL, Roth P, et al. Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J Immunol.* 1999; 162 (3): 1223-6.
86. Le Bouteiller P, Barakonyi A, Giustiniani J, Lenfant F, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, et al. Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99 (26): 16963-8.
87. Viganò S, Banga R, Bellanger F, Pellaton C, Farina A, Comte D, et al. CD160-Associated CD8 T-Cell Functional Impairment Is Independent of PD-1 Expression. *PLoS Pathog.* 2014; 10 (9): e1004380.
88. See J, Chandramathi S, Abdulla MA, Vadivelu J, Shankar EM. Persistent infection due to a small-colony variant of *Burkholderia pseudomallei* leads to PD-1 upregulation on circulating immune cells and mononuclear infiltration in

viscera of experimental BALB / c mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(8): e0005702.

89. Saeidi A, Tien Tien VL, Al-Batran R, Al-Darraji HA, Tan HY, Yong YK, et al. Attrition of TCR V $\alpha$ 7.2+ CD161++ MAIT cells in HIV-tuberculosis co-infection is associated with elevated levels of PD-1 expression. *PLoS One*. 2015; 10 (4): 1–14.

90. Saeidi A, Chong YK, Yong YK, Tan HY, Barathan M, Rajarajeswaran J, et al. Concurrent loss of co-stimulatory molecules and functional cytokine secretion attributes leads to proliferative senescence of CD8 + T cells in. *Cell Immunol*. 2015; 297 (1): 19–32.

91. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Lai L, Vanderford TH, et al. Enhancing SIV-Specific Immunity In Vivo by PD-1 Blockade. *Nature*. 2009; 458 (7235): 206–10.

92. Barathan M, Gopal K, Mohamed R, Ellega R, Saeidi A, Vadivelu J, et al. Chronic hepatitis C virus infection triggers spontaneous differential expression of biosignatures associated with T cell exhaustion and apoptosis signaling in peripheral blood mononucleocytes. *Apoptosis*. 2015; 20 (4): 466-80.

93. Yong YK, Saeidi A, Tan HY, Rosmawati M, Enström PF, Batran R Al, et al. Hyper-expression of PD-1 is associated with the levels of exhausted and dysfunctional phenotypes of circulating CD161 ++ TCR iV $\alpha$ 7.2 + Mucosal-associated invariant T cells in chronic hepatitis B virus infection. *Front Immunol*. 2018; 9: 472.

94. Lukens JR, Cruise MW, Lassen MG, Hahn YS. Blockade of PD-1/B7-H1 Interaction Restores Effector CD8+ T Cell Responses in a Hepatitis C Virus Core Murine Model. *J Immunol*. 2008; 180 (7): 4875–84.

95. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8 + T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006; 12 (10): 1198–202.
96. Seung E, Dudek TE, Allen TM, Freeman GJ, Luster AD, Tager AM. PD-1 Blockade in Chronically HIV-1-Infected Humanized Mice Suppresses Viral Loads. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e77780.
97. Costa PAC, Leoratti FMS, Figueiredo MM, Tada MS, Pereira DB, Junqueira C, et al. Induction of Inhibitory Receptors on T Cells During *Plasmodium vivax* Malaria Impairs Cytokine Production. *J Infect Dis.* 2015; 212: 1999–2010.
98. Chandele A, Das G, Virander S. Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD 8 and CD 4 T cells during blood-stage infection with *Plasmodium yoelii*. *Immunology.* 2011; 132(2): 273–286.
99. Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Ogobara K, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nat Immunol.* 2011; 13 (2): 188-95.
100. Shankar EM, Vignesh R, Dash AP. Recent advances on T-cell exhaustion in malaria infection. *Medical Microbiology and Immunology.* 2018; 207 (3-4): 167-174
101. Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Christine A. PD-1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol.* 2013; 191 (11): 5542–50.
102. Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: The latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4 (11): e871.

103. Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2014; 209 (2): 290-9.
104. Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Sta S. B7-H1 Blockade Increases Survival of Dysfunctional CD8 + T Cells and Confers Protection against *Leishmania donovani* Infections. *PLoS Pathog.* 2009; 5 (5): e1000431.
105. Suzuki Y, Remington JS. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2 + and Lyt-1 +, L3T4 + T cells in mice. *J Immunol.* 1988; 140 (11): 3943-6.
106. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon- $\gamma$ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* (80- ). *Science.* 1988; 240 (4851): 516-8.
107. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004; 363 (9425): 1965-76.
108. Długowska H, Grzybowski MM. Functional exhaustion of T lymphocytes in chronic toxoplasmosis. *Ann Parasitol.* 2013; 59 (3): 109-12.
109. Bhadra R, Gigley JP, Khan IA. Cutting Edge: CD40-CD40 Ligand Pathway Plays a Critical CD8-Intrinsic and -Extrinsic Role during Rescue of Exhausted CD8 T Cells. *J Immunol.* 2011; 187 (9): 4421–5.
110. Długońska H, Grzybowski MM. Review articles Functional exhaustion of T lymphocytes in chronic. *Ann Parasitol.* 2013; 59 (3): 109–12.
111. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: A global reassessment. Part I: Epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol.* 2003; 136 (6): 973-88.
112. de-la-Torre A, González-López G, Montoya-Gutiérrez JM, Marín-Arango V, Gómez-Marín JE. Quality of Life Assessment in Ocular Toxoplasmosis in a Colombian Population. *Ocul Immunol Inflamm.* 2011; 19 (4): 262–6.

113. Holland GN, Crespi CM, ten Dam-van Loon N, Charonis AC, Yu F, Bosch-Driessen LH, et al. Analysis of Recurrence Patterns Associated with Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Am J Ophthalmol*. 2008; 145 (6): 1007-1013.
114. Facio Lince, León Andrés; López de Mesa, Clara; de-la-Torre A. Toxoplasmosis ocular en Colombia: 10 años de aportes investigativos. *Rev SCO*. 2018; 51 (1): 16-28.
115. Darde ML. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite*. 2008; 15 (3): 366-71.
116. Reich M, Ruppenstein M, Becker MD, Mackensen F. Time patterns of recurrences and factors predisposing for a higher risk of recurrence of ocular toxoplasmosis. *Retina*. 2015; 35 (4): 809–19.
117. Garweg JG, Candolfi E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: Facts and clues. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (2): 211–20.
118. Gaddi PJ, Yap GS. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85 (2): 155–9.
119. Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition*. *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition*. 2013. 1–1085 p.
120. Araki K, Youngblood B, Ahmed R. Programmed cell death 1-directed immunotherapy for enhancing T-cell function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2013; 78: 239-47.
121. Dolfi D V., Mansfield KD, Polley AM, Doyle SA, Freeman GJ, Pircher H, et al. Increased T-bet is associated with senescence of influenza virus-specific CD8 T cells in aged humans. *J Leukoc Biol*. 2013; 93 (6): 825–836.

122. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 2006; 443 (7109): 350-4.

123. Sun C, Fu B, Gao Y, Liao X, Sun R, Tian Z, et al. TGF- $\beta$ 1 down-regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP expression on human NK cells contributes to HBV persistence. *PLoS Pathog*. 2012; 8 (3): e1002594.

124. Schlaphoff V, Lunemann S, Suneetha PV, Jaroszewicz J, Grabowski J, Dietz J, et al. Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8+ T cells. *PLoS Pathog*. 2011; 7 (5): e1002045.

125. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, et al. Liver-Infiltrating Lymphocytes in Chronic Human Hepatitis C Virus Infection Display an Exhausted Phenotype with High Levels of PD-1 and Low Levels of CD127 Expression. *J Virol*. 2007; 81 (6): 2545-53.

126. Gavrilescu LC, Denkers EY. Apoptosis and the Balance of Homeostatic and Pathologic Responses to Protozoan Infection. *Infection and Immunity*. 2003. 71 (11): 6109–6115.

127. Hwang S, Cobb DA, Bhadra R, Youngblood B, Khan IA. Blimp-1–mediated CD4 T cell exhaustion causes CD8 T cell dysfunction during chronic toxoplasmosis. *J Exp Med*. 2016; 213 (9): 1799-818.

128. Long SA, Thorpe J, DeBerg HA, Gersuk V, Eddy JA, Harris KM, et al. Partial exhaustion of CD8 T cells and clinical response to teplizumab in new-onset type 1 diabetes. *Sci Immunol*. 2016; 1(5). pii: eaai7793.

129. Harty JT, Traore B, Moebius J, Doumbo OK, Tygrett LT, Pewe LL, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nat Immunol*. 2011; 13 (2): 188–95.

130. Zhou S, Ou R, Huang L, Price GE, Moskophidis D. Differential tissue-specific regulation of antiviral CD8+ T-cell immune responses during chronic viral infection. *J Virol.* 2004; 78 (7): 3578–3600.

131. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3 (6): 1101-8.

## **8. ASPECTOS BIOÉTICOS**

### **8.1 Investigación en seres humanos**

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud Acta 04 del 30 de agosto de 2017.

Para realizar este proyecto de investigación se tuvo en cuenta la legislación del ministerio de salud (Resolución N° 008430 DE 1993), por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Debido a que en este proyecto se utilizaron muestras de sangre humana, se tuvieron en cuenta los aspectos estipulados en los siguientes artículos: *Artículo 6* que define los criterios de la investigación para una buena ciencia, *Artículo 8* que refiere a la privacidad de la información, *Artículo 11b* que define la investigación de riesgo mínimo del cual hace parte esta investigación y *Artículos 14 y 15* que incluyen las pautas para la elaboración y aplicación del consentimiento informado.

### **8.2 Bioseguridad**

#### **8.2.1 Ruta Bioética**

El estudio se realizó partir de personas que acudían al Centro de Salud de la Universidad del Quindío para consulta por toxoplasmosis. El médico tratante nos informaba que personas cumplían con los criterios de inclusión. Posteriormente, estas personas fueron contactadas por la investigadora vía telefónica debido a que en el historial del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío (CIBM) se registró dicha información al momento del examen serológico de toxoplasma. Aquellas personas que cumplían con los criterios de inclusión y aceptaron voluntariamente ser parte del proyecto a través del consentimiento informado se les explicó el proyecto, sus objetivos y procedimientos, las molestias o riesgos, así como los

beneficios indirectos que podían obtenerse. Asimismo, durante la firma del consentimiento se respondieron las preguntas de los participantes. Posteriormente las muestras se llevaron al segundo piso del CIBM donde se realizó la extracción de PBMCs, de ARN, y los ensayos de tiempo real. Por su parte, los ensayos de citometría de flujo se realizaron en la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) en el laboratorio de medicina regenerativa con apoyo del grupo de investigación en inmunidad de esta misma Universidad.

Para este trabajo se incluyeron 5 individuos seronegativos (IgG- IgM-), 5 individuos con toxoplasmosis crónica asintomática (IgG+ IgM-) y 5 con toxoplasmosis ocular (IgG+ IgM-), las cuales se dirigieron al laboratorio clínico del Centro de Salud, donde un profesional en el área fue el encargado de la toma de las muestras. Todos los procedimientos realizados durante el desarrollo del proyecto de investigación se realizaron teniendo en cuenta las normas de bioseguridad establecidas en el CIBM y en el laboratorio de medicina regenerativa de la Universidad Tecnológica de Pereira UTP.

### **8.2.2 Posibles efectos negativos**

Debido a que utilizamos muestras de sangre, el manejo de las muestras estuvo a cargo de una persona con certificación en bioseguridad debido al riesgo biológico y potencialmente infeccioso.

De igual manera, tanto los investigadores como los participantes declararon no tener conflicto de intereses. A todos los individuos participantes se les aclaró que acceder al estudio era algo voluntario y, por tanto, no recibirán ningún tipo de beneficio económico ni el tratamiento inmediato de la infección.

### **8.2.3 Manejo de la Información y divulgación**

Debido a que en el proyecto se utilizaron muestras de individuos con toxoplasmosis ocular y que en el Centro de salud del CIBM se encontraban documentadas las historias clínicas de cada uno de los individuos participantes, en este proyecto se manejó la información de manera confidencial como se estipuló en el consentimiento informado (**Anexo 3**).

Además, el diseño metodológico y los resultados de este proyecto fueron divulgados en eventos científicos especializados en el área de inmunología y parasitología (ejemplo: IV Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática, VIII Conferencia Iberoamericana de Bioinformática, Simposio de Tecnologías OMICas para la investigación en enfermedades infecciosas, Encuentro Nacional de Enfermedades Infecciosas ACIN, Reunión de microbiología eje cafetero CoReMM, II Encuentro de estudiantes de posgrado en inmunología ACOI) y Congreso Internacional de Toxoplasmosis (Toxo XV).

De igual manera, todos los experimentos, protocolos y resultados fueron documentados en la libreta o bitácora de laboratorio que es de uso exclusivo de los investigadores del proyecto, pero que estará disponible para los participantes e investigadores que requieran consultarla con autorización previa del grupo de investigación.

## 12. ANEXOS

### Anexo 12.1. Consentimiento informado

**Título del proyecto:** “Evaluación de marcadores de agotamiento celular en toxoplasmosis ocular”

**Investigadores responsables:**

Laura Lorena García López B Sc.

Néstor Iván Cardona PhD.

Juan Felipe Osorio PhD.

Alejandro Hernández M.Sc

**Invitación a participar:**

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario de consentimiento, que tiene como propósito orientarlo en su decisión. Si tiene alguna duda o no entiende pregúntele al investigador que está en la obligación de responderle.

**Lo invitamos para que participe en el proyecto de investigación:**

“Evaluación de marcadores de agotamiento celular en toxoplasmosis ocular”, el cual será llevado a cabo por el Grupo de Investigación en Parasitología Molecular (GEPAMOL) de la Universidad del Quindío en el centro de Investigaciones Biomédicas.

**Aspectos a tener en cuenta durante el desarrollo de la investigación:**

- Los estudios de investigación en ciencias biomédicas buscan obtener información científica que puede ser útil al sector salud u otras personas en el futuro.

- Su participación es voluntaria. Usted puede rehusarse a participar, o puede retirar su consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo.
- Si usted quiere participar en este estudio es necesario firmar este consentimiento. El cual se realizará por duplicado para que usted reciba una copia de él.
  
- Usted puede preguntarle al investigador principal de este proyecto de investigación, Alejandro Hernández de los Ríos o a cualquier otro miembro del grupo de investigadores todas las dudas que tenga acerca de este estudio y puede realizarlo en cualquier momento de su ejecución. Podrá comunicarse directamente al siguiente teléfono al: 3206730037 o mediante correo electrónico [gepamol2@uniquindio.edu.co](mailto:gepamol2@uniquindio.edu.co)

### **¿Para qué se está realizando este estudio?**

Esta investigación tiene como objetivo identificar las moléculas del sistema inmune asociadas a casos de toxoplasmosis ocular. Los resultados obtenidos a partir del estudio aportarán conocimientos básicos sobre el posible desarrollo o factores asociados a la enfermedad y son la base para la búsqueda de nuevas alternativas de tratamientos mejor enfocados.

### **Procedimiento del estudio:**

En este estudio tomarán muestras de sangre de 20 mL a través de punción venosa, lo cual será realizado por la auxiliar del laboratorio clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, el riesgo del procedimiento se cataloga como mínimo. A partir de la sangre se separarán las células del sistema inmune que están encargadas de defender al cuerpo contra las enfermedades. Luego las células separadas de la sangre se les

medirán los niveles de 4 marcadores asociados al agotamiento celular: PD-1, CD244, LAG-3 y CD160 a través de diferentes técnicas de inmunología y biología molecular. Del mismo modo se le realizarán pruebas serológicas para el diagnóstico de toxoplasmosis, cuyos resultados serán enviados al médico pertinente, quien determinará si debe iniciar o modificar algún tipo de tratamiento.

**¿Cuánto tiempo dura su participación?**

Su participación inicia desde el momento en que se realiza la toma de la muestra y durante los 12 meses de vigencia del proyecto.

**¿Cuáles son los posibles beneficios para usted y la sociedad derivados de esta investigación?**

Su participación voluntaria en el estudio no le proporcionará ningún beneficio directo. Sin embargo, los resultados del estudio contribuirán entendimiento de los factores inmunológicos asociados a las recurrencias de toxoplasmosis ocular, de esta manera, a largo plazo usted estaría aportando al conocimiento científico de la población en general. Los resultados de la investigación y el análisis de la misma se publicarán en un formato de artículo científico, al cual tendrá acceso en el momento en que lo desee, una vez se entregue el informe final del proyecto.

**¿Usted presentará alguna afectación negativa por participar en el estudio?**

La participación en el estudio no afectará en ninguna medida su integridad personal, todos los procedimientos serán realizados por personal experto en el área y estas actividades presentan un nivel de riesgo mínimo.

**Sus derechos como participante:**

Si usted decide participar en este estudio y luego cambia de opinión, tiene el derecho a retirarse del estudio en cualquier momento sin ninguna consecuencia desfavorable. Así mismo puede hacer las preguntas que considere importantes.

**Confidencialidad de sus datos:**

Si acepta participar en el presente estudio, los resultados obtenidos serán confidencialmente manejados por el grupo de investigación GEPAMOL y archivo del Centro de Investigaciones Biomédicas.

**¿Qué debe hacer si decide terminar su participación en el estudio?**

Su participación en el estudio es voluntaria y usted puede negarse a participar, o retirarse del estudio en cualquier momento. Si usted decide suspender su participación en el estudio, puede llamar al teléfono 3014007800 o mediante correo electrónico [gepamol2@uniquindio.edu.co](mailto:gepamol2@uniquindio.edu.co).

**¿Qué debe hacer si tiene preguntas acerca de este estudio?**

Usted tiene la oportunidad de preguntar y obtener todas las respuestas a sus preguntas sobre esta investigación antes de firmar el consentimiento. Si usted posteriormente tiene otras preguntas relacionadas con la investigación, puede llamar al investigador Alejandro Hernández de los Ríos al teléfono 3014007800 o mediante correo electrónico [gepamol2@uniquindio.edu.co](mailto:gepamol2@uniquindio.edu.co).

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PERSONAL

Me han explicado verbalmente y he leído la información proporcionada previamente. Yo \_\_\_\_\_ con cédula de ciudadanía No. \_\_\_\_\_ voluntariamente acepto participar en este estudio. En constancia, firmo este documento de Consentimiento informado, en presencia del investigador y dos testigos, en la ciudad de Armenia el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

Nombre completo, firma y documento de identidad de la persona que acepta participar en el estudio.

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía #: \_\_\_\_\_ de: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo uno: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía #: \_\_\_\_\_ de: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo dos: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Cédula de Ciudadanía #: \_\_\_\_\_ de: \_\_\_\_\_

## **Anexo 12.2. Optimización del protocolo de extracción de PBMCs de un individuo seronegativo**

Este protocolo sirve para la extracción de células mononucleares de sangre periférica PBMCs (siglas en inglés) y se modificó para aumentar la cantidad de sangre por muestra a procesar. La modificación más importante fue la relación de sangre e Histopaque®-1077 (número de catálogo 10771), además de los tiempos de centrifugación respecto al protocolo base.

1. Disponer el Ficoll y PBS a 20 °C (temperatura ambiente).
2. Obtener muestras de sangre total recolectadas en tubos de recolección de heparina sódica (tubo violeta) y registrar la información del sujeto y la fecha de recepción.
3. Colocar 15 ml de Ficoll en un tubo cónico de 50 mL. Cubrir con hasta 30 mL de sangre, agregándola muy lentamente para asegurarse de que la sangre no se mezcle con la capa de Ficoll. Esperar 3 minutos antes de centrifugar.
4. Centrifugar a 700 g por 30 min a temperatura ambiente (aceleración lenta, desaceleración para asegurar que no se interrumpa el gradiente de densidad).
5. (Primer lavado) Utilizando una pipeta de transferencia estéril, aspirar la capa leucocítica (PBMC de células periféricas de sangre periférica) en un nuevo tubo cónico de 50 mL. (Evita aspirar el Ficoll). Agregar 30 mL de volumen de RPMI, invirtiendo hacia arriba y hacia abajo para mezclar.
6. Centrifugar a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente (aceleración y desaceleración máximas).
7. (Segundo lavado) Aspirar y desechar el sobrenadante. Resuspender el sedimento celular primero tocando el tubo hasta que no se vean grumos, luego agregar 15 ml de RPMI.
8. Centrifugar a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente (aceleración y desaceleración máximas).

9. Aspirar y desechar el sobrenadante. Resuspender el sedimento celular en 1 ml de RPMI. Resuspender el sedimento celular tocando el tubo hasta que no se vean grumos.

10. (Conteo en hemocitómetro automático) Adicionar 50  $\mu$ l de las células más 50  $\mu$ l de PBS en un tubo eppendorf de 2 mL y contar utilizando el contador de células automatizado.

### **Anexo 12.3. Protocolo de aislamiento de ARN en columna y digestión de ADN genómico**

Este protocolo sirve para el aislamiento de ARN y se modificó para optimizar la pureza del ARN. La modificación más importante fue la eliminación del ADN genómico luego de haber extraído el ARN y los tiempos de incubación con DNasa respecto al protocolo base.

#### **Preparación del tampón:**

- Preparar un tampón de lisis nuevo que contenga 2% de mercaptoetanol, para esto agregar 10  $\mu$ L de mercaptoetanol por cada 1 mL de tampón de lisis.

#### **Lisis y homogeneización:**

- De acuerdo con el número de células de las cuales quiera extraer ARN, tener en cuenta la siguiente tabla para mirar la proporción de buffer lysis que debe utilizar en cada caso.

#### **Para $\leq 5 \times 10^6$ de células en suspensión**

1. Transferir las células a un tubo libre de ARNasa y centrifugar a 2,000x g durante 5 minutos a 4 °C para formar un sedimento. Desechar el medio de crecimiento.
2. Agregar 0,6 mL de tampón de lisis con 2-mercaptoetanol a la muestra.
3. Agitar en vórtex hasta que el sedimento celular se dispersa y las células aparezcan lisadas.
4. Continuar con la homogeneización a continuación.

### **3. Homogeneización:**

Proceder con una de las siguientes opciones de homogeneización a temperatura ambiente:

1. Transferir el lisado a un tubo de homogeneización limpio y realizar una homogeneización manual. Centrifugar el homogenizado a  $12,000 \times g$  durante 2 minutos.
2. Pasar el lisado de 5 a 10 veces a través de una aguja de jeringa de calibre 18 a 21 ó transferir el lisado a un tubo limpio y homogenizar utilizando un homogeneizador de rotor-estator a la velocidad máxima durante  $\geq 45$  s.
4. Centrifugar el homogeneizado a  $26,000 \times g$  durante 5 minutos, luego transferir el sobrenadante a un tubo limpio sin ARNasa.

### **4. Purificación de ARN: Unión, lavado y elución de ARN**

1. Agregar un volumen de etanol al 70% a cada volumen de homogeneizado celular.
2. Agitar en el vórtex para mezclar bien y dispersar cualquier precipitado visible que pueda formarse después de agregar el etanol.
3. Transferir hasta 700  $\mu\text{L}$  de la muestra (incluido el precipitado restante) a la columna de centrifugado (con el tubo de recolección).
4. Centrifugar a  $12,000 \times g$  durante 15 segundos a temperatura ambiente. Desechar el flujo continuo y volver a insertar la columna en el mismo tubo de recolección.
5. Repetir los pasos 3 a 4 hasta que toda la muestra haya sido procesada.
6. Agregar 700  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado I a la columna de centrifugado.

- 7.** Centrifugar a 12,000 × g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Desechar el tubo de recolección. Colocar la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recolección.
- 8.** Agregar 500 µL de tampón de lavado II con etanol a la columna de centrifugado.
- 9.** Centrifugar a 12,000 × g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Desechar el flujo continuo colectado en el tubo de recolección.
- 10.** Repetir los pasos 8–9 una vez.
- 11.** Centrifugar la columna a 12,000 × g durante 1-2 minutos para secar la membrana con el ARN unido. Desechar el tubo de recolección e insertar la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recolección.
- 12.** Agregar 30–100 µL de agua libre de RNasa al centro de la columna de centrifugado.
- 13.** Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 14.** Centrifugar la columna de centrifugado durante 2 minutos a  $\geq 12,000 \times g$  a temperatura ambiente para eluir el ARN de la membrana al tubo de recolección. NOTA: Si el rendimiento de ARN esperado es  $> 100 \mu\text{g}$ , realizar 3 eluciones secuenciales de 100 µL cada una. Recoger los eluidos en un solo tubo.
- 15.** Almacenar el ARN purificado o proceder a una aplicación posterior. NOTA: Eluir 70 µL de la muestra de ARN en agua (para la primera elución). Para la segunda elución, agregar nuevamente 70 µL de agua en la columna y centrifugar una vez más durante 2 minutos a  $\geq 12,000 \times g$  a temperatura ambiente.

## 5. Digestión de ADNg fuera de la columna

### Preparación de la solución de digestión para una solución final de 10 $\mu$ L.

**Añadir:** 1  $\mu$ L Buffer DNase I

2  $\mu$ l de agua

1  $\mu$ L DNasa I

6  $\mu$ L de ARN

1. Luego de añadir la mezcla de digestión a la muestra de ARN purificada, incubar a temperatura ambiente durante 40 minutos.
2. Inactivar la DNasa I con EDTA 25 mM (1  $\mu$ L de EDTA 25 mM para una solución final de 10  $\mu$ L).
3. Incubar a 65 °C durante 10 minutos.
4. Cuantificar el ARN por absorbancia UV a 260 nm (utilizar 5  $\mu$ L para la lectura en el Eppoch).
5. Almacenar y para esto dividir en alícuotas el ARN (cada alícuota con 30  $\mu$ L de ARN) y marcar los tubos con la siguiente información: Fecha, Código de muestra (iniciales del nombre de la persona), escribir si la alícuota corresponde a la primera o segunda elución, y cantidad de alícuotas.

#### **Anexo 12.4. Estrategia experimental para las perlas de compensación**

Las perlas AbC™ Total Antibody Compensation Bead Kit, incluyen dos poblaciones de perlas, las positivas y las negativas. Después de la incubación con un anticuerpo conjugado con fluorocromo, los dos componentes del kit (componente A y componente B), proporcionan distintas poblaciones positivas y negativas de perlas que se puede usar para hacer la compensación. Debido a la naturaleza consistente de la dispersión de las perlas y la alta capacidad de unión de anticuerpos en la superficie, estas perlas permiten establecer una compensación más constante y precisa para cualquier combinación de anticuerpos marcados con fluorocromos.

1. Resuspender completamente las perlas de captura (perlas positivas: Componente A) y las perlas negativas (perlas negativas: Componente B), de manera separada hacer vórtex.
2. Agregar 2 gotas de perlas de captura (Componente A) más 550  $\mu$ L del Cell Staining buffer y hacer vórtex.
3. Agregar 1 gota de perlas negativas (Componente B) más 200  $\mu$ L del Cell Staining buffer y hacer vórtex.
4. Etiquetar un tubo de muestra para cada anticuerpo conjugado con fluorocromo que esté utilizando y posteriormente agregar 50  $\mu$ L de la solución del paso 2 a cada tubo (tubo 2-7). Se agregarán los anticuerpos 1:50, es decir 1  $\mu$ L para una gota. Para el tubo 1, agregar 50  $\mu$ L de la solución del paso 3.

Para los singles disponer los tubos previamente marcados de la siguiente manera:

Tubo 1. Beads sin marcar negativo (perlas negativas)

Tubo 2. Beads CD3-FITC

Tubo 3. Beads CD8- APC/Cy7

Tubo 4. Beads CD45RA- PE/Cy5

Tubo 5. Beads CCR7- PE/Cy7

Tubo 6. Beads PD1- APC

Tubo 7. Beads LAG-3- PE

5. Agregar una cantidad pre-titulada de cada conjugado de anticuerpo a la suspensión de perlas de captura de AbC Total Compensation en el tubo designado (tubo 2-7) y mezclar bien. Asegurarse de depositar el anticuerpo directamente en la suspensión de perlas.
6. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
7. Adicionar a cada uno de los tubos 150  $\mu$ L del Cell Staining buffer y hacer vórtex de los tubos antes de analizar con citometría de flujo.
8. Agregar las soluciones de “beads singles” a una caja de 96 pozos.
9. Adquisición: Normalmente los voltajes se ajustan con la muestra de interés (beads). Posteriormente hacer las adquisiciones. 600 segundos por 10 minutos. Observar primero las beads sin marcar, para ver el perfil de FSC y SSC, luego seleccionar la población, y las fluorescencias negativas y empezar a adquirir las beads y hacer la compensación con los controles de “singles” y de FMO.

## **Anexo 12.5. Estrategia experimental para la tinción superficial de las células**

El objetivo es determinar si existen diferencias en la frecuencia de células positivas para 4 marcadores de agotamiento celular en linfocitos provenientes de PBMCs aislados de pacientes con diferentes cuadros clínicos de toxoplasmosis. Las subpoblaciones de PBMCs se distinguirán usando los siguientes marcadores:

1. CD3: Marcador de linfocitos.
2. CD8: Marcador de linfocitos citotóxicos.
3. CD45RA: Linfocitos efectores de memoria (marcaje negativo).
4. CCR7 (CD197): Linfocitos periféricos (marcaje negativo).

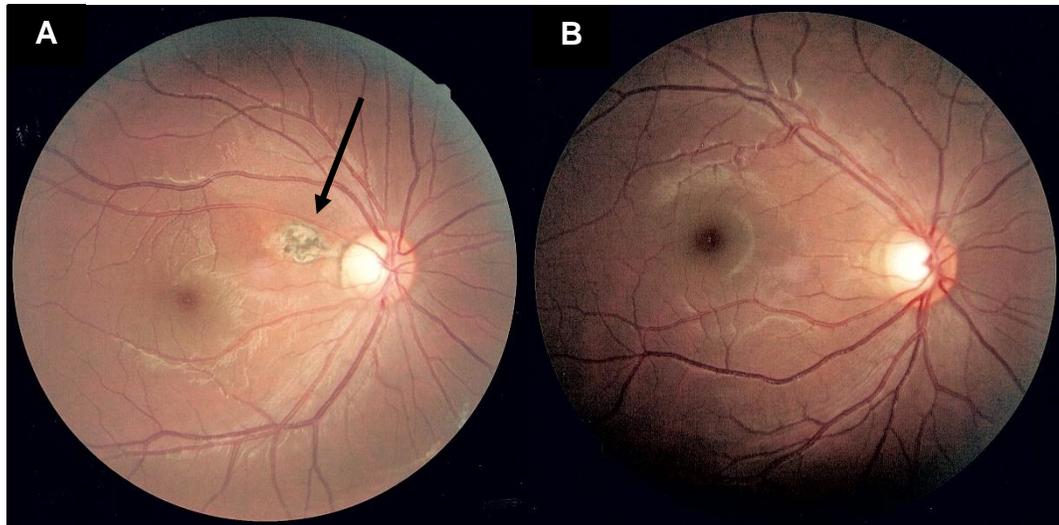
El fenotipo que nos interesa es el siguiente: Positivos para CD3 y CD8 (linfocitos citotóxicos), y negativos para CD45RA y CCR7 (linfocitos periféricos citotóxicos efectores de memoria). En esta subpoblación se cuantificará la frecuencia de células positivas para los siguientes marcadores de agotamiento celular: PD-1, CD244, LAG-3, CD160. Todo el protocolo de titulación de los anticuerpos se realizó en un individuo seronegativo.

1. Tomar 4 tubos con EDTA de 4 mL de sangre.
2. Aislar PBMCs de una persona negativa para *T. gondii* usando Histopaque®-1077 (número de catálogo 10771) siguiendo las recomendaciones del fabricante.
3. Resuspender los PBMCs en medio RPMI-1644 en un tubo de 15 mL y realizar el conteo de células usando tripán en una dilución 1:100 (10 µL de las células y 90 µL del colorante azul de tripán), tomar 10 µL de la mezcla

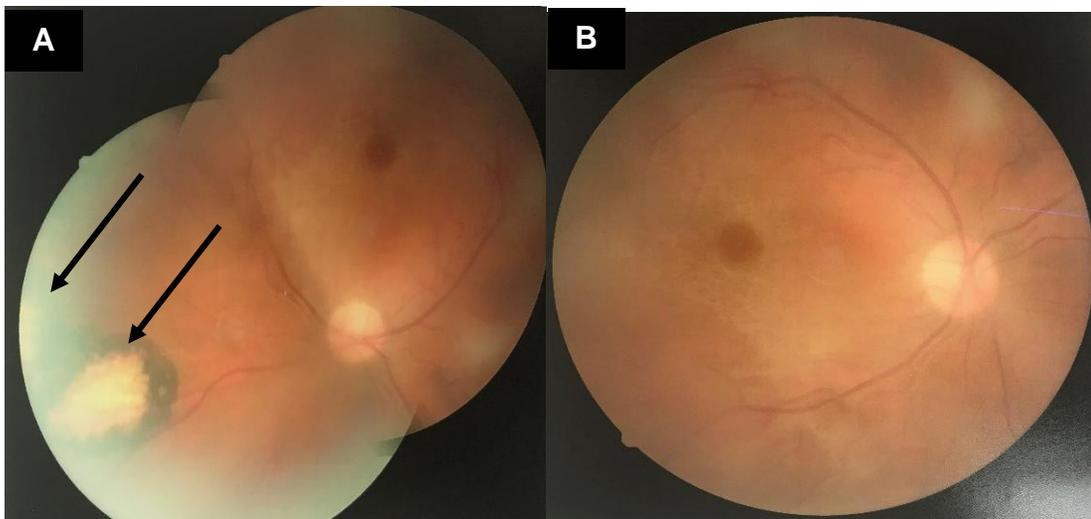
y se colocan en una cámara de Neubauer para contar el número de linfocitos. Nota: Las células se transportaron a la UTP en hielo y al llegar se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 566  $\mu$ L de Cell Staining Buffer, de acuerdo a la cantidad de células que se necesitaron para el total de pozos que se montaron. Tomando un millón de células por pozo en un volumen de 50  $\mu$ L.

4. Agregar 50  $\mu$ L por pozo en tubos de 1,5 mL.
5. Adicionar 5  $\mu$ L del bloqueador de receptores Fc (Human TruStain FcXTM, Biolegend) e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Incubar 1 hora en oscuridad a 4 °C.
7. Adicionar 100  $\mu$ L de Cell Staining Buffer. Centrifugar a 1800 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Adicionar de nuevo 100  $\mu$ L de Cell Staining Buffer. Centrifugar a 1800 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Finalmente, adquirir 200.000 eventos por muestra, primero para las células sin marcar y luego para cada uno de los pozos.

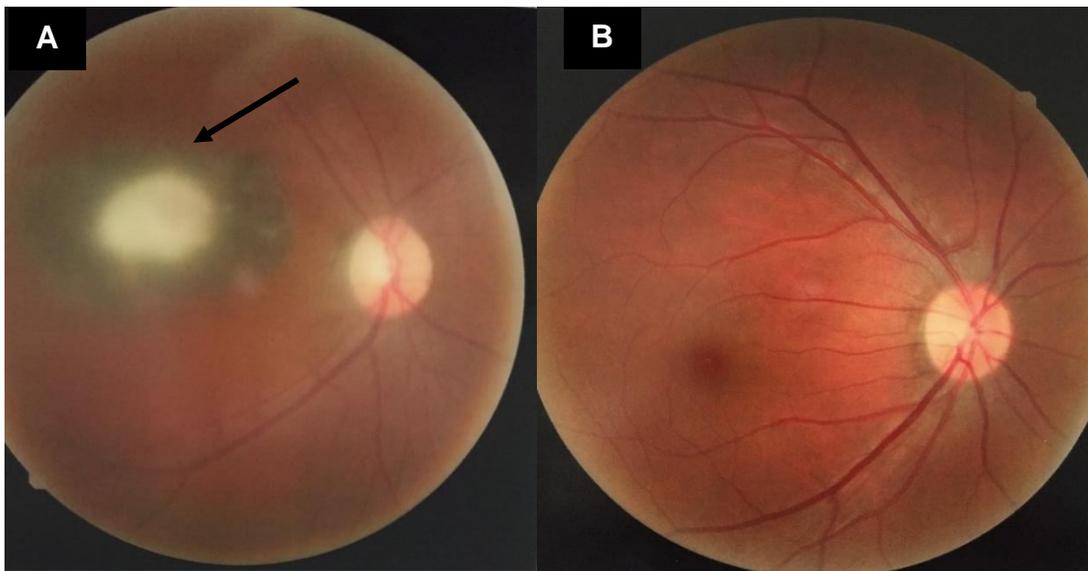
**Anexo 12.6. Fotografías de fondo de ojo de los individuos incluidos en el estudio**



**Anexo 12.6.1.** Fotografías de fondo. **(A)** Fotografía de fondo de ojo derecho. **(B)**. Fotografía de fondo de ojo izquierdo. Las fotografías corresponden al individuo con código PO105. Foto realizada el 20 de marzo de 2013. Cicatriz de polo posterior de menos de un diámetro de disco. Las flechas indican la localización de la lesión.



**Anexo 12.6.2.** Fotografías de fondo. **(A)** Fotografía de fondo de ojo derecho. **(B)**. Fotografía de fondo de ojo izquierdo. Las fotografías corresponden al individuo con código PO103. Foto realizada el 06 de agosto de 2018. Dos lesiones, una de ellas extensa de aproximadamente dos diámetros de disco periférica. Las flechas indican la localización de la lesión.



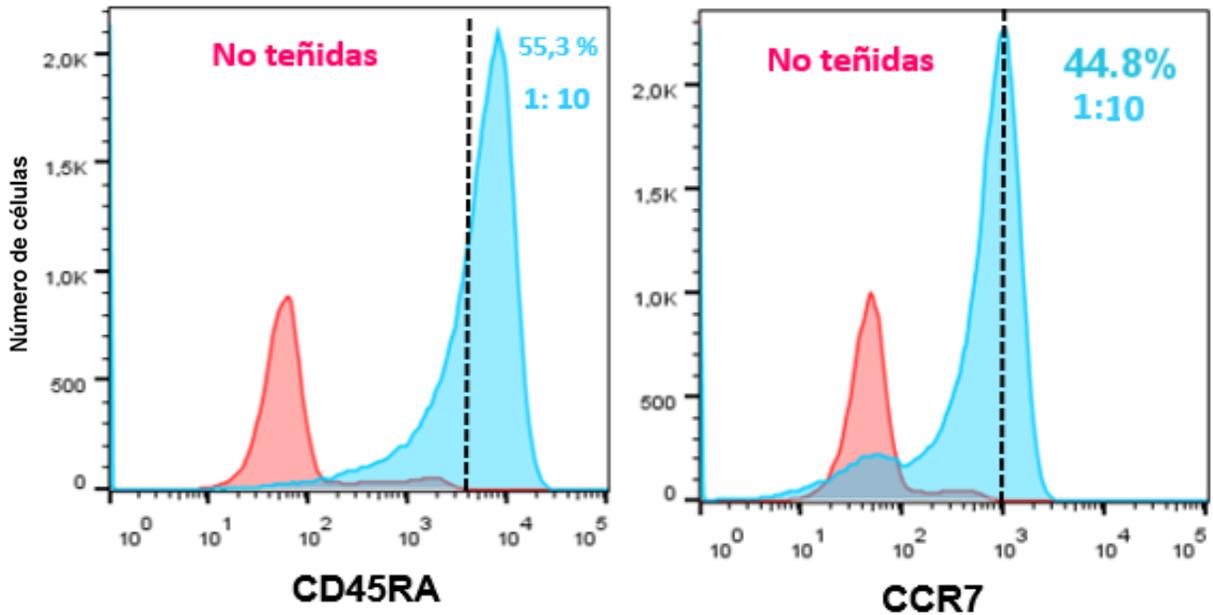
**Anexo 12.6.3.** Fotografías de fondo. **(A)** Fotografía de fondo de ojo derecho. **(B)**. Fotografía de fondo de ojo izquierdo. En el ojo izquierdo se evidencia cicatriz macular. Las flechas indican la localización de la lesión.



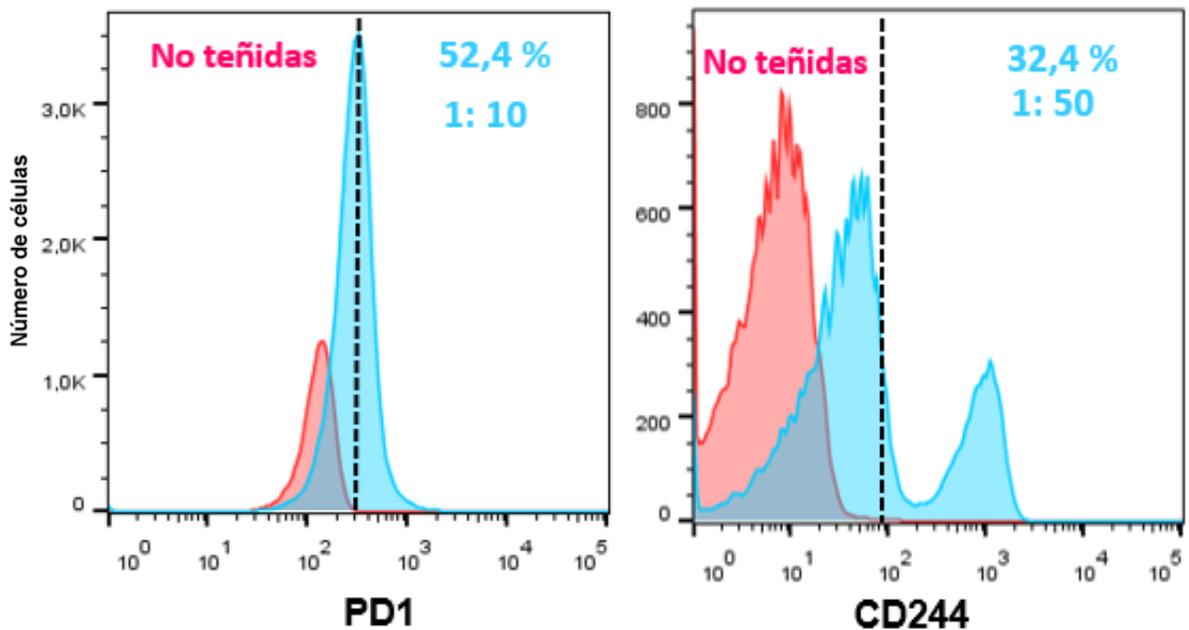
## Anexo 12.7. Valores de CT de los marcadores de agotamiento amplificados por tiempo real (RT-qPCR)

CONDICIÓN CLÍNICA	CÓDIGO DEL INDIVIDUO	GAPDH	PD1	CD244	LAG-3
Ocular	PO101	21,81169319	35,9557705	36,2472134	35,6111069
Ocular	PO102	27,58181572	29,6641054	34,9015312	32,2826042
Ocular	PO103	20,47106457	34,4743195	31,1723585	0
Ocular	PO104	25,13961601	27,5352335	33,474741	35,1109047
Ocular	PO105	27,02503014	30,3421173	36,4299088	37,1347771
<b>PROMEDIO</b>		<b>24,40584393</b>	<b>31,5943092</b>	<b>34,4451506</b>	<b>28,0278786</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>		<b>3,150296071</b>	<b>3,50309044</b>	<b>2,18219163</b>	<b>15,7660623</b>
CONDICIÓN CLÍNICA	CÓDIGO DEL INDIVIDUO	GAPDH	PD1	CD244	LAG-3
Asintomático	PA106	21,67604637	33,3090515	33,8718758	37,0225353
Asintomático	PA107	20,21842289	35,0307751	30,4082232	0
Asintomático	PA108	24,16625977	28,6116486	34,3458748	34,6777382
Asintomático	PA109	24,00086975	35,6711082	35,0938015	0
Asintomático	PA110	21,94509029	29,6611242	32,1071959	26,6214542
<b>PROMEDIO</b>		<b>22,40133781</b>	<b>32,4567415</b>	<b>33,1653942</b>	<b>19,6643456</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>		<b>1,671285355</b>	<b>3,17350163</b>	<b>1,89295941</b>	<b>18,3608486</b>
CONDICIÓN CLÍNICA	CÓDIGO	GAPDH	PD1	CD244	LAG-3
Seronegativo	PN111	28,77509212	33,7124767	34,6558552	34,6715546
Seronegativo	PN112	27,82326889	34,7756977	34,1672153	33,2315521
Seronegativo	PN113	25,89778233	32,3957396	31,2444468	32,3474598
Seronegativo	PN114	27,31426144	35,0117054	30,7393284	0
Seronegativo	PN115	23,3480196	29,1839771	36,3448658	0
<b>PROMEDIO</b>		<b>26,63168488</b>	<b>33,0159193</b>	<b>33,4303423</b>	<b>20,0501133</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>		<b>2,109564437</b>	<b>2,37873802</b>	<b>2,37481611</b>	<b>18,3219519</b>

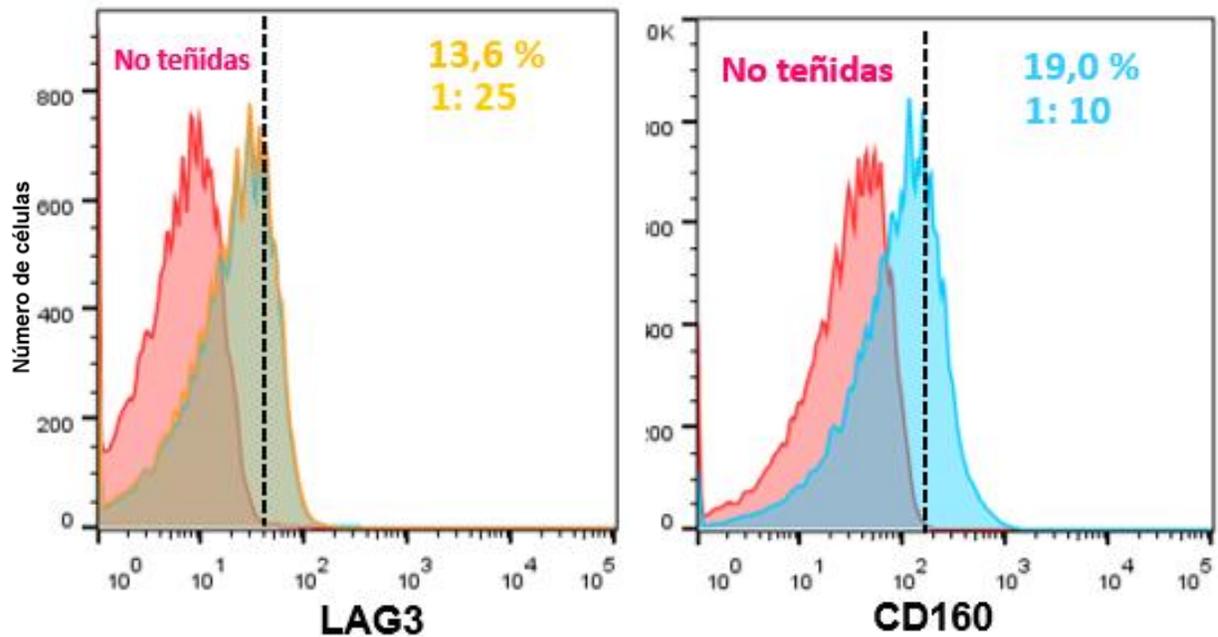
Anexo 12.8. Titulaciones de los anticuerpos



Titulación de anticuerpos anti- CD45RA, anti-CCR7 de linfocitos T en PBMCs. Los histogramas muestran intensidades de fluorescencia de las células negativas (rojas) y positivas (azul). La dilución seleccionada fue 1:10 para ambos anticuerpos.

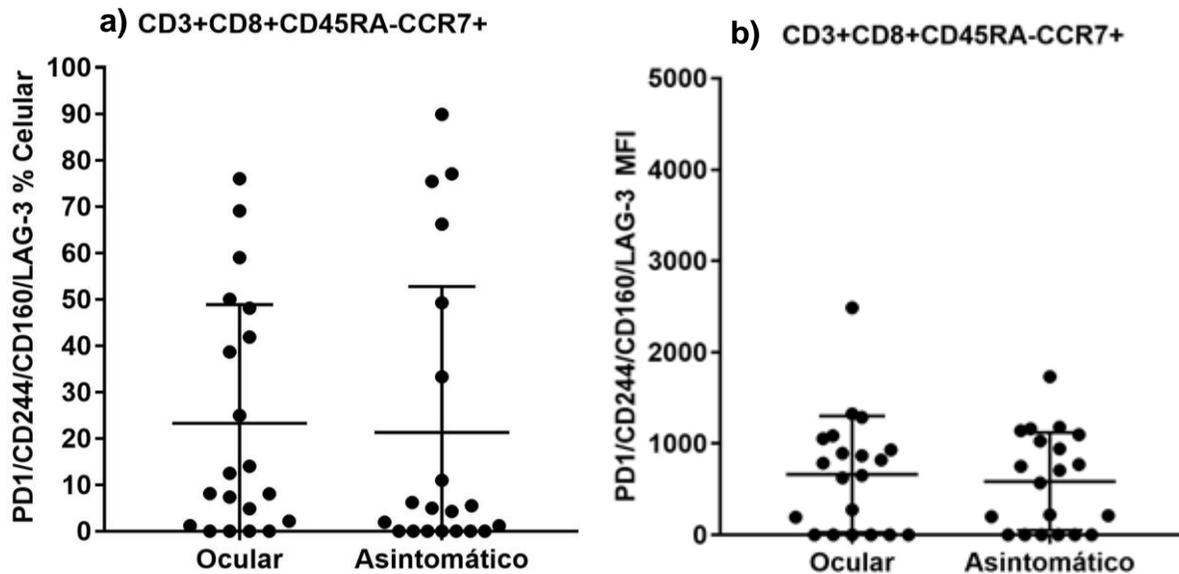


**Titulación de anticuerpos anti-PD1 y anti-CD244 de linfocitos T en PBMCs.** Los histogramas muestran intensidades de fluorescencia de las células negativas (rojas) y positivas (azul). Las diluciones seleccionadas para los marcadores de agotamiento fueron para PD1 1:10 y para CD244 1:50.

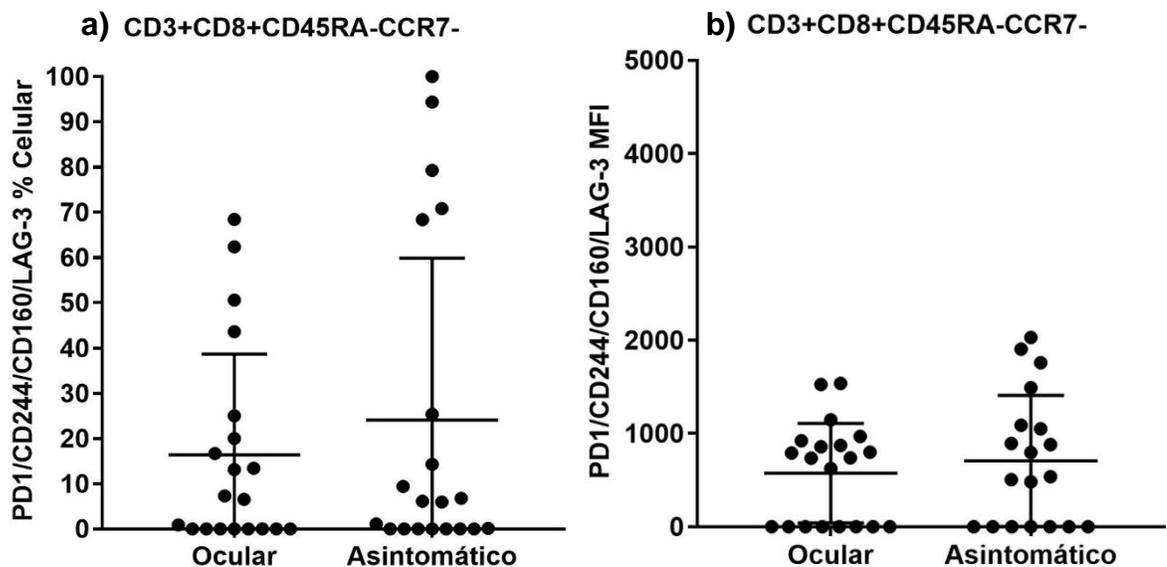


**Titulación de anticuerpos anti-LAG-3 y anti-CD160 de linfocitos T en PBMCs.** Los histogramas muestran intensidades de fluorescencia de las células negativas (rojas) y positivas (azul). Las diluciones seleccionadas para los marcadores de agotamiento fueron para LAG-3 1:25 y para CD160 1:10.

**Anexo 12.9. Niveles de expresión de los marcadores de agotamiento en subconjuntos de células T CD8+**



**Perfil de agotamiento celular. Expresión de los cuatro marcadores de agotamiento celular PD1, CD244, LAG-3 y CD160 en células de memoria central. a) Porcentaje de células positivas. b) Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE (N=5 para cada grupo) para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.**



**Perfil de agotamiento celular. Expresión de los cuatro marcadores de agotamiento celular PD1, CD244, LAG-3 y CD160 en células efectoras de memoria.** a) Porcentaje de células positivas. b) Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE (N=5 para cada grupo) para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.

#### **Anexo 12.10. Niveles de expresión de PD1, CD244, LAG-3 y CD160 en subconjuntos de células T CD8+**

Porcentaje de células positivas e intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada marcador evaluado en los individuos oculares y asintomáticos en las diferentes subpoblaciones celulares de memoria seleccionadas.

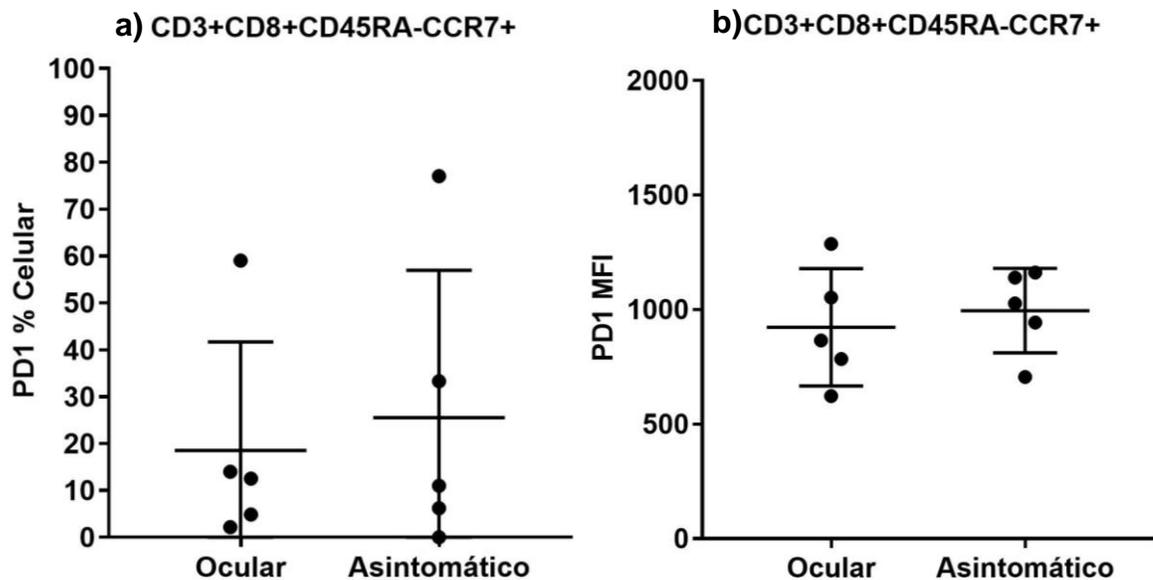
**PD1:** Respecto a las diferentes subpoblaciones celulares, la expresión promedio de PD1 fue ligeramente mayor en el grupo asintomático 25,5% (0%-77%) respecto a los oculares 18,5% (2,1%-59,0%) en células de memoria central CD45RA-CCR7+. Las intensidades medias de fluorescencia no cambiaron entre grupos posiblemente por la baja cantidad de este subtipo celular. Por otro lado, para la población de células efectoras de memoria CD45RA-CCR7- el porcentaje promedio de células positivas fue ligeramente mayor en el grupo ocular 22,5% (0% a 62,3%) respecto a los asintomáticos 18,9% (0% a 79,2%). Los datos del MFI indicaron que ambos grupos tenían frecuencias de PD1 por célula similares.

**CD244:** De otro lado, para los linfocitos de memoria central CD45RA-CCR7+ los porcentajes promedios de células fueron similares para el grupo ocular con 50% (24%-76%) respecto a 42,9% (0%-89,8%) del grupo asintomático. De igual manera, la mayoría de los individuos presentaron clusters de MFIs cercanos a la media. No se observaron diferencias notables del promedio del

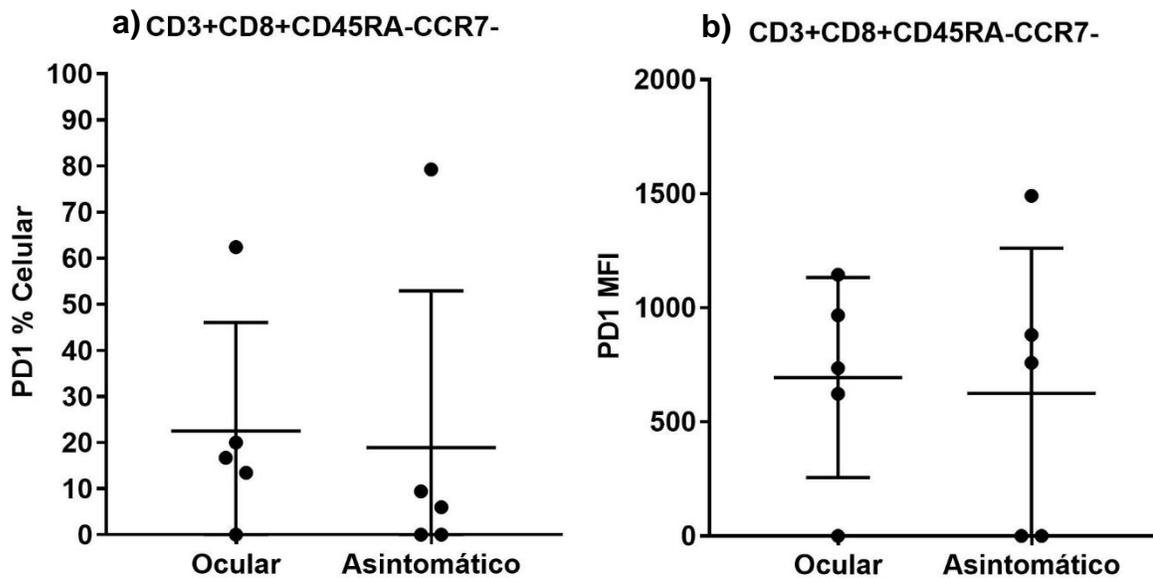
porcentaje de células positivas ni del MFI en los linfocitos de memoria efectora CD45RA-CCR7- en ambos grupos 27,4% (0% a 68%) en oculares y 37,6% (0% a 94%) en asintomáticos.

**LAG-3:** Para las células T CD8+ de memoria central el promedio de células LAG-3+ fue muy bajo de 1,8% en oculares (0% a 8,1%) y 1,4% en asintomáticos (0% a 4,3%). Sin embargo, para las células efectoras de memoria fue ligeramente mayor en los asintomáticos 4,4 (0% a 21%) comparados con los oculares 1,6% (0% a 7,3%). No se observaron diferencias en las intensidades de fluorescencia para ninguna población celular.

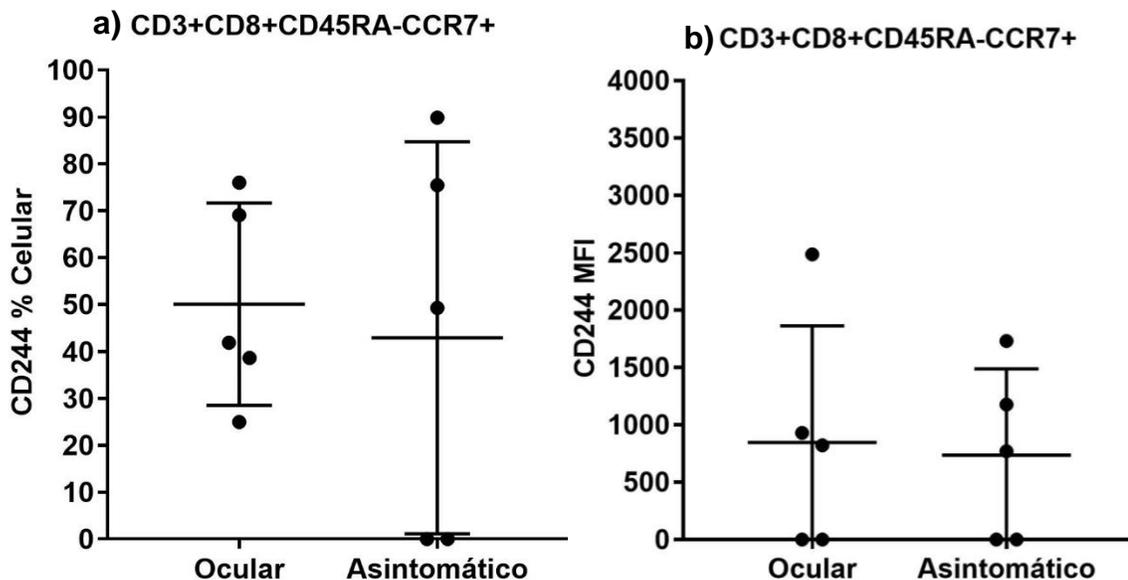
**CD160:** En contraste, para la población CD45RA-CCR7+ de memoria central los promedios de células positivas fueron ligeramente mayores en los oculares 22,7% (0% a 50%) así como los datos de MFI comparados con los asintomáticos 15,3% (0% a 66,2%). Sin embargo, para la población celular de memoria efectora CD45RA-CCR7- hay una tendencia de niveles ligeramente mayores de MFI y de porcentaje de células positivas en los individuos asintomáticos 19,6% (0% a 70,8%) respecto a los oculares 14% (0% a 50,5%) oculares.



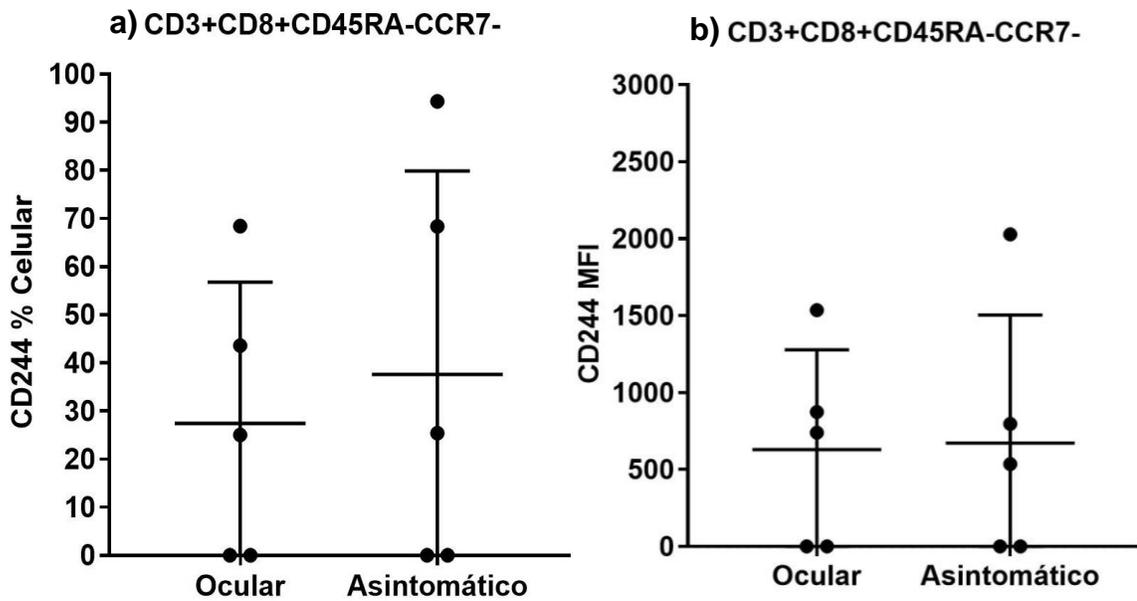
**Expresión de PD1 en células T de memoria central.** a) Porcentaje de células positivas. b) Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.



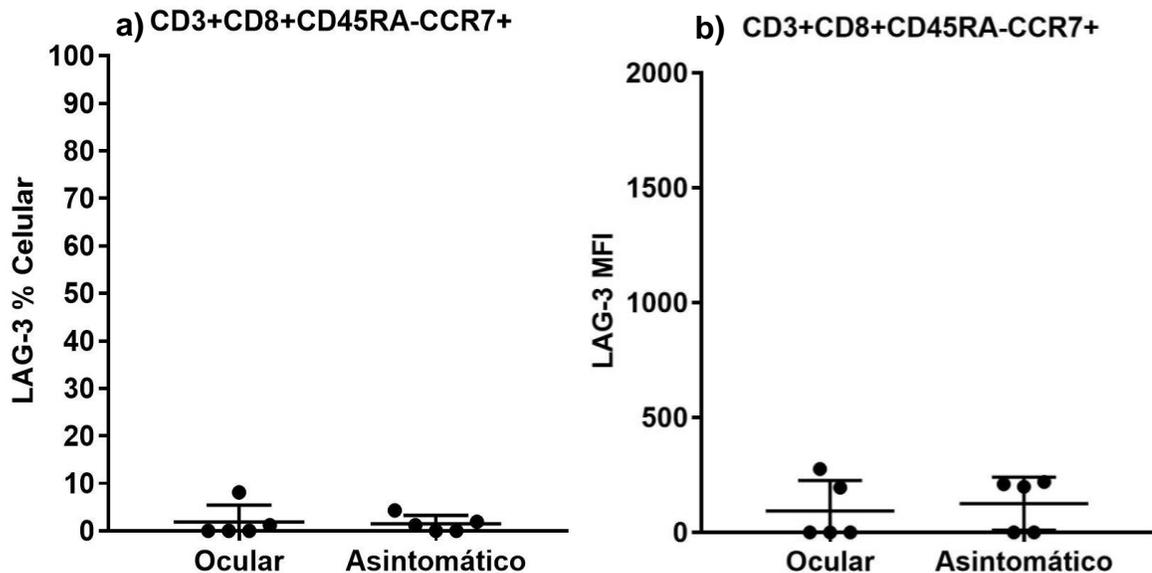
**Expresión de PD1 en células T de memoria efectora.** a) Porcentaje de células positivas. b) Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.



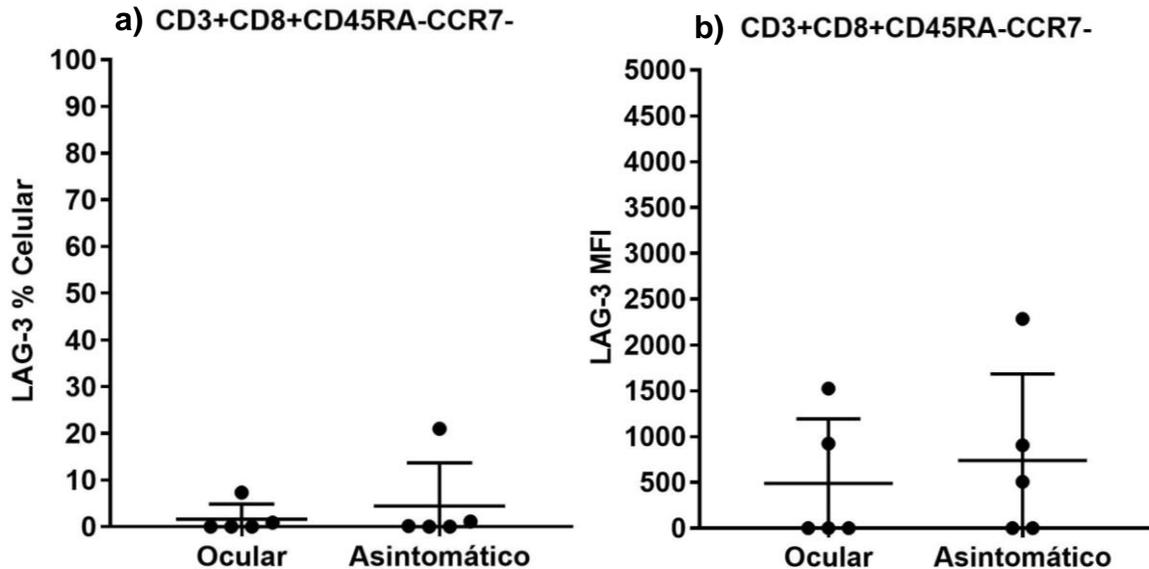
**Expresión de CD244 en células T de memoria central.** a) Porcentaje de células positivas. b) Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.



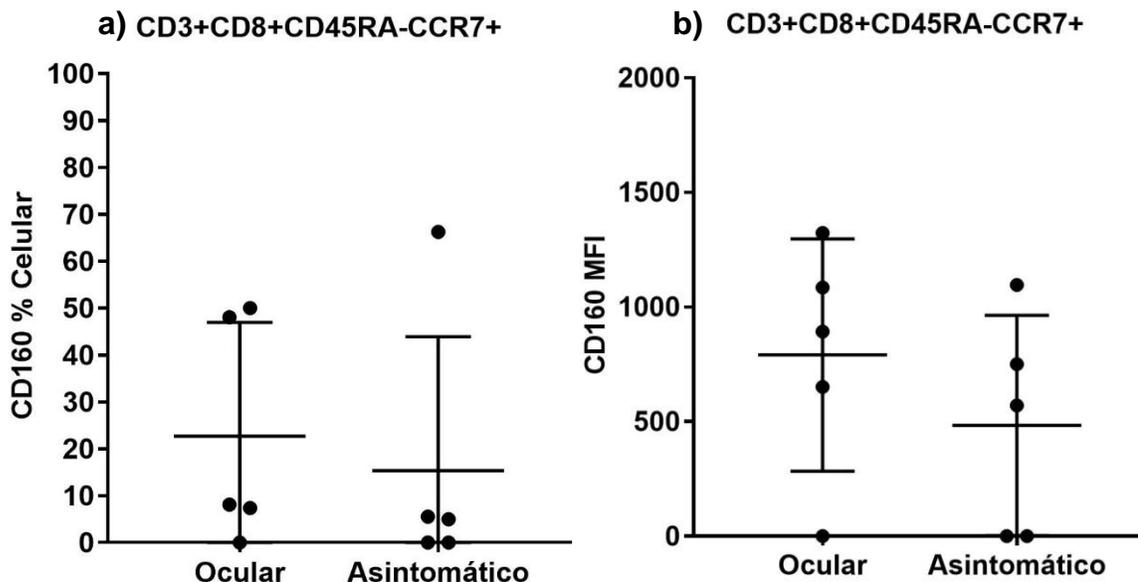
**Expresión de CD244 en células T de memoria efectora.** a) Porcentaje de células positivas. b) Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.



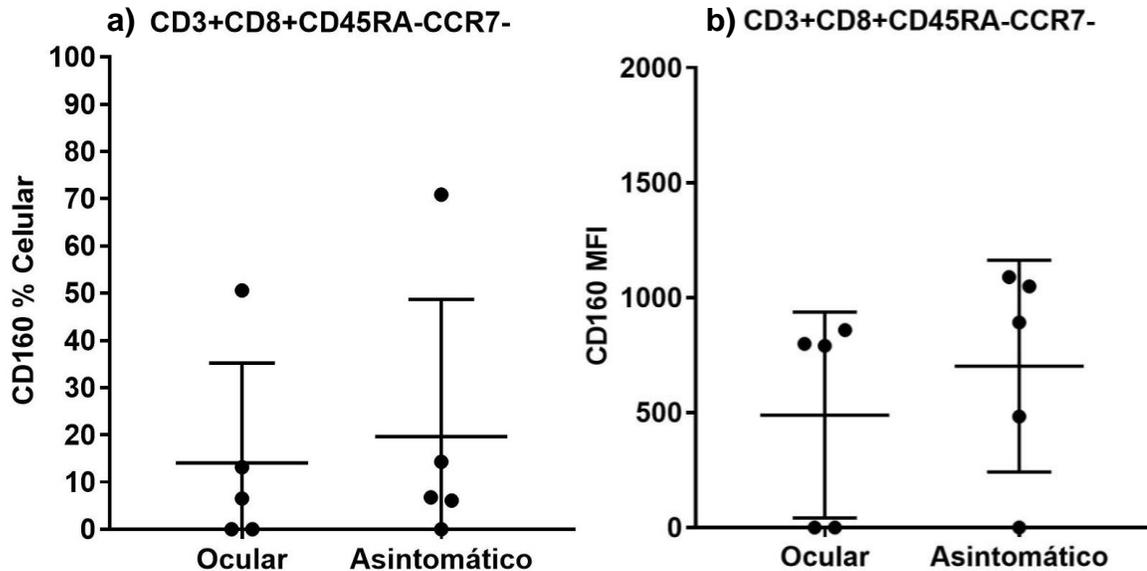
**Expresión de LAG-3 en células T de memoria central.** a) Porcentaje de células positivas. b) Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.



**Expresión de LAG-3 en células T de memoria efectora.** a) Porcentaje de células positivas. b) Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.

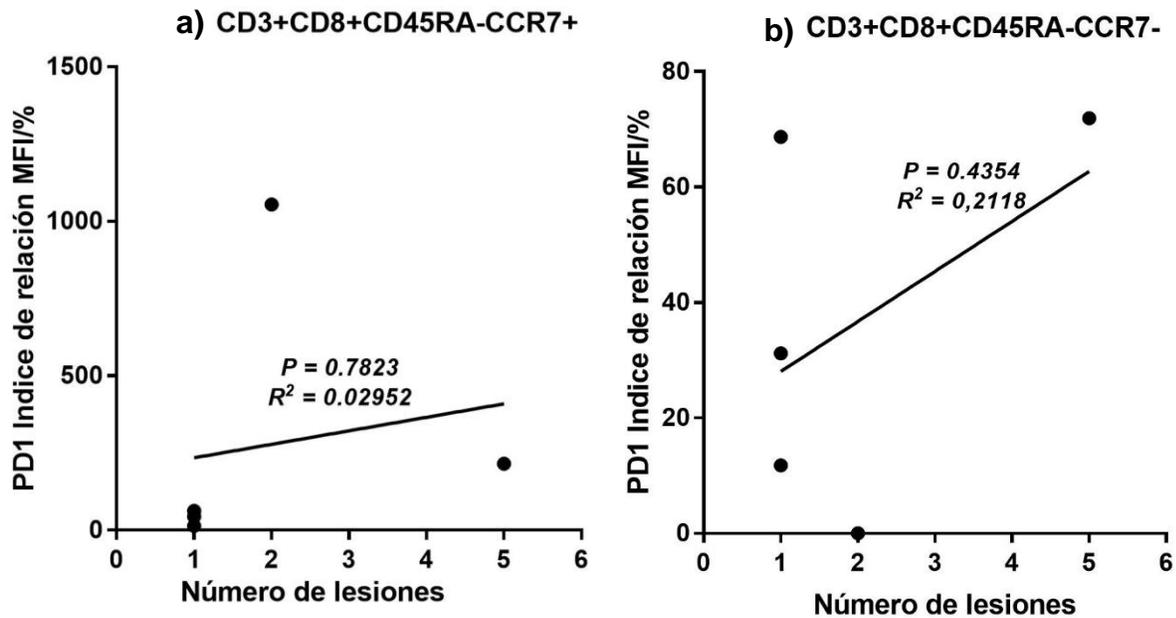


**Expresión de CD160 en células T de memoria central. a)** Porcentaje de células positivas. **b)** Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.



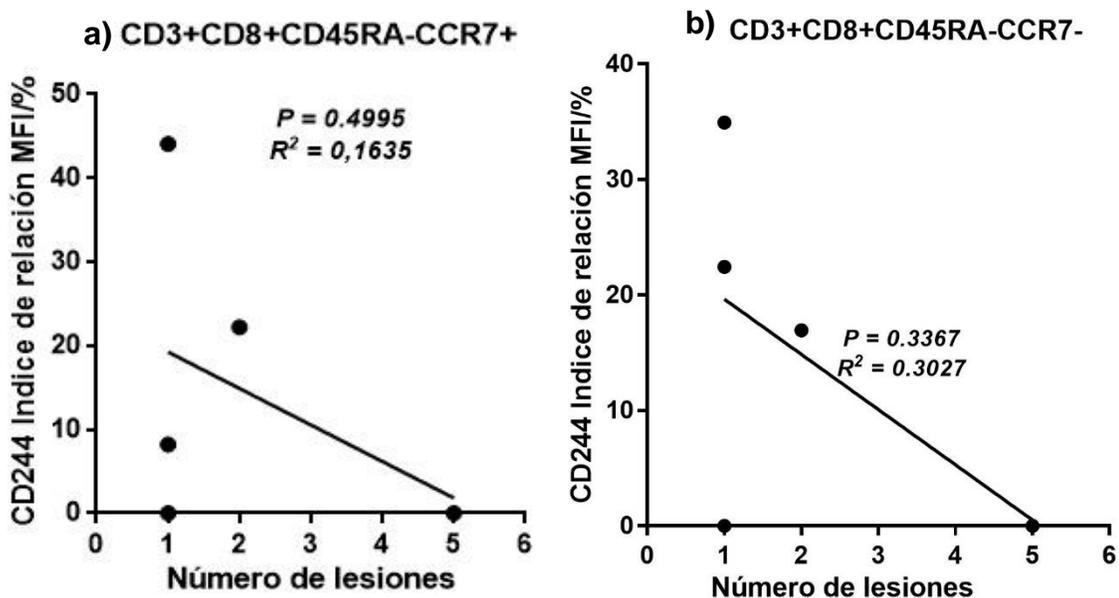
**Expresión de CD160 en células T de memoria efectora. a)** Porcentaje de células positivas. **b)** Intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras representan la media  $\pm$  DE para el porcentaje de células positivas y la media  $\pm$  DE para el MFI por grupo en las dos poblaciones de interés.

Anexo 12.11. Índice de relación

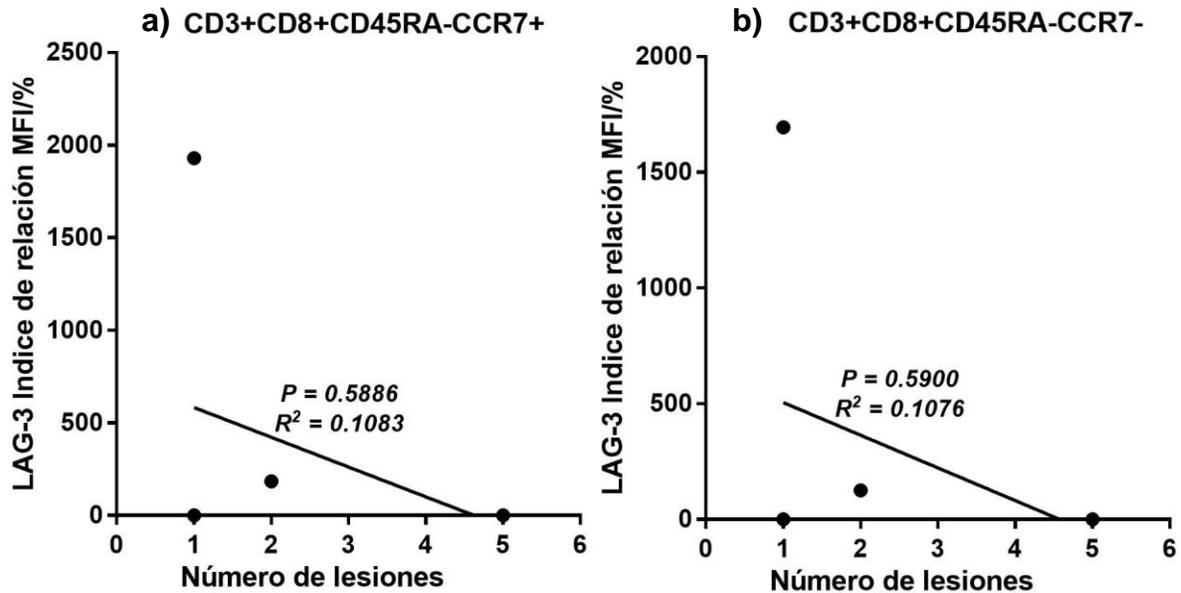


Expresión de PD1 en individuos oculares en células T de memoria central

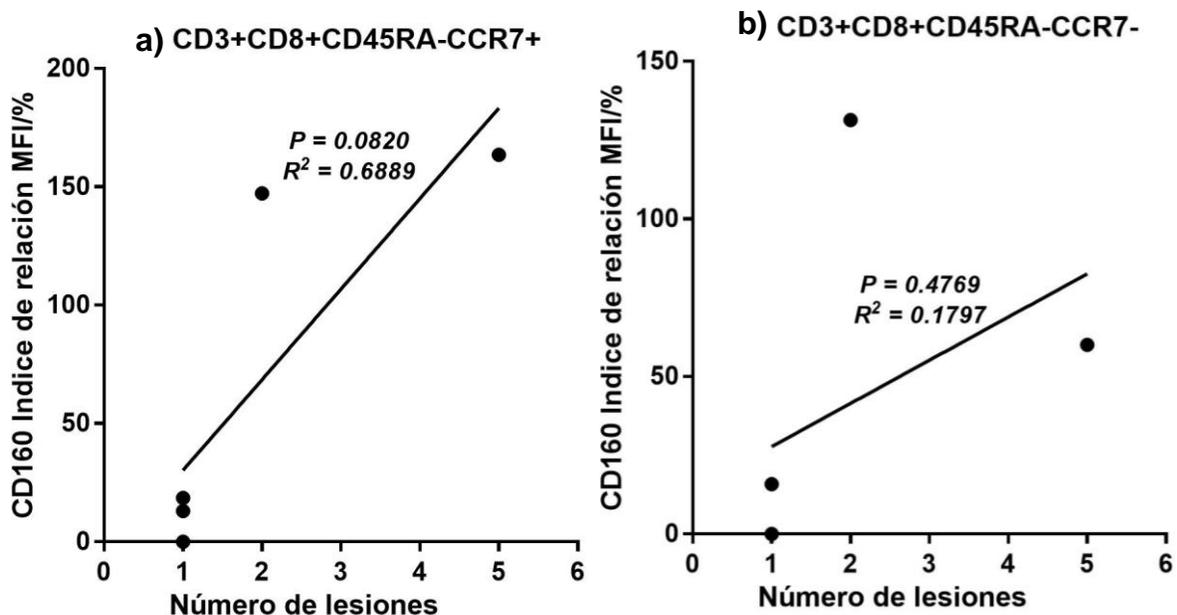
a) *CD45RA-CCR7+* y efectoras de memoria b) *CD45RA-CCR7-* y. IR: Índice de relación MFI/%. Las barras representan la media  $\pm$  DE para IR por cada grupo (N=5 para cada grupo).



Expresión de CD244 en individuos oculares en células T de memoria central a) *CD45RA-CCR7+* y efectoras de memoria b) *CD45RA-CCR7-*. IR: Índice de relación MFI/%. Las barras representan la media  $\pm$  DE (N=5 para cada grupo) para IR por cada grupo.



Expresión de LAG-3 en individuos oculares en células T de memoria central a) *CD45RA-CCR7+* y efectoras de memoria b) *CD45RA-CCR7-*. IR: Índice de relación MFI/%. Las barras representan la media  $\pm$  DE (N=5 para cada grupo) para IR por cada grupo.



**Expresión de CD160 en individuos oculares en células T de memoria central a) *CD45RA-CCR7+* y efectoras de memoria b) *CD45RA-CCR7-* y.**  
IR: Índice de relación MFI/%. Las barras representan la media  $\pm$  DE (N=5 para cada grupo) para IR por cada grupo.

## 10. APROPIACIÓN SOCIAL DEL CONOCIMIENTO

- Presentación de Poster **IV Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática. VIII Conferencia Iberoamericana de Bioinformática.** Septiembre 13, 14 y 15 de 2017. Cali. Trabajo: “Proteínas homologas a PD1-L1 y PD1-L2 humanas en *Toxoplasma gondii*”.



- Presentación de Poster en el Simposio “**OMIC Technologies for Research on Infectious Diseases**”. Septiembre 6 y 7 de 2017. Cali. Trabajo: “Proteínas homologas a PD1-L1 y PD1-L2 humanas en *Toxoplasma gondii*”.



Santiago de Cali, septiembre 12 de 2017

Laura Lorena Garcia  
Universidad del Quindío  
Armenia

Asunto: Participación en Simposio "Omic Technologies for Research on Infectious Diseases"

Estimada Laura,

Fue muy grato para nosotros contar con su participación en el I Simposio: "Omic Technologies for Research on Infectious Diseases", el cual tuvo lugar el pasado 6 y 7 de septiembre de 2017 en el Hotel Spiwak en Cali.

También, agradecemos la presentación realizada en modalidad poster del trabajo "Proteínas homologas a PD1-L1 y PD1-L2 humanas en *Toxoplasma gondii*" durante el segundo día del Simposio, estamos seguros fue de interés de los asistentes.

Esperamos que este Simposio haya sido una oportunidad para ampliar su conocimiento en las tecnologías ómicas aplicadas a las enfermedades infecciosas, conocer lo que se está haciendo en el país en este ámbito y relacionarse con otros investigadores.

Atentamente,

Luis Enrique Vacaflor  
Gerente de Proyecto  
CIDEIM

María Adelaida Gómez PhD  
Coordinadora Unidad de Bioquímica y Biología  
Molecular  
CIDEIM

- Presentación Oral en el **Encuentro Nacional de Enfermedades Infecciosas ACIN**. 02 al 04 de agosto 2018. Trabajo: "Estandarización de una prueba de RT-qPCR para los genes GADPH y PD1".



- Presentación Oral en el **Coffee Region Microbial meeting CoReMM**. Centro de Convenciones 22 de noviembre 2018. Trabajo: “Memoria y agotamiento de células T”



- Presentación Oral en el **II ENCUENTRO ACOI DE ESTUDIANTES DE POSGRADO EN INMUNOLOGÍA**- 10 de diciembre 2018. Trabajo: “Identificación de factores de agotamiento celular asociados a casos de recurrencias en toxoplasmosis ocular”



- Presentación de Poster titulado “**Expression of inhibitory receptors on CD8+ T cells from toxoplasmosis ocular patients**” en el Congreso Internacional de *Toxoplasma* (ToxoXV). Junio 19 al 22. Quindío Colombia.

