



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**RECLUTAMIENTO TEMPRANO DE MONOCITOS Y GRANULOCITOS POR
ANTÍGENOS EXCRETADOS/SECRETADOS DE *Taenia crassiceps***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

GUILLERMO ALVARADO HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. YADIRA LEDESMA SOTO



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mis padres Flora y Casimiro quienes con esmero y cariño me han acompañado en la búsqueda de mi camino. Uds. me inspiran cada día a ser una mejor persona a través de su inquebrantable ejemplo.

A mis hermanos Elizabeth, Miguel y Angélica y por la paciencia y el apoyo y cariño que me han brindado.

A mis sobrinos Citlali y Edahí, por regalarme esos momentos de alegría a través de su interpretación de la vida que perciben con sus inocentes ojos.

A mí cuñado Daniel por su apoyo como un hermano.

“Las ideas se le vienen uno al escribir, durante el trabajo. Eso de tener ideas se puede conseguir con la práctica. Es, de verdad, una cuestión de entrenamiento. Quien no sabe tocar un piano se asombra de lo que es capaz un pianista. Pero el pianista tampoco lo ha sabido desde el principio, así, sin más. Se ha ejercitado muchos, muchos años. Con un escritor pasa lo mismo.”

Michael Ende

Agradecimientos

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas, por haberme dado la oportunidad de integrarme en su equipo.

Dra. Yadira Ledesma, por brindarme su apoyo, consejos y su conocimiento.

Gracias a los revisores de este trabajo por su tiempo y sus observaciones.

Amigos, muchas gracias por estar ahí en el momento indicado para escucharme y ayudarme cuando lo necesité, saben que los aprecio mucho. Sin duda han hecho de esta parte de mi vida un momento especial e inolvidable. Ha sido un placer coincidir en esta experiencia llamada vida.

“La amistad multiplica lo bueno de la vida y divide lo malo.”

Baltasar Gracián

1. CONTENIDO

1. CONTENIDO.....	1
2. ABREVIATURAS.....	3
3. RESUMEN.....	6
4. INTRODUCCIÓN.....	8
4.1. Parásitos helmintos.....	8
4.1.1. Céstodos.....	10
4.1.2. <i>Taenia crassiceps</i>	11
4.2. Respuesta inmune.....	14
4.2.1. Respuesta inmune frente a parásitos helmintos.....	16
4.2.2. Respuesta inmune e inmunomodulación por <i>Taenia crassiceps</i>	20
4.3. Células mioeloides supresoras.....	24
4.3.1. Monocitos.....	26
4.3.2. Granulocitos: neutrófilos.....	29
5. JUSTIFICACIÓN.....	31
6. HIPÓTESIS.....	32
7. OBJETIVO GENERAL.....	33
7.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
8.1. Infección de ratones o cisticercosis experimental.....	34
8.2. Obtención de producto excretado/secretado de <i>Taenia crassiceps</i> (TcES).....	34
8.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	35
8.4. Reclutamiento de células <i>in vivo</i> por TcES.....	36
8.5. Obtención de suero y líquido de ascitis.....	36
8.6. Obtención de células de exudado peritoneal.....	37
8.7. Citometría de flujo.....	37
8.8. Ensayo de proliferación.....	38
8.9. ELISA (sándwich).....	39
8.10. Purificación de células por Sorting.....	40
8.11. Análisis estadístico.....	40
9. RESULTADOS.....	41
9.1. Curva de reclutamiento celular.....	41

9.1.1.	Expresión de moléculas de supresión celular	44
9.1.2.	Monocitos y Granulocitos en torrente sanguíneo.....	47
9.1.3.	Capacidad de las MDSC en suprimir la proliferación del linfocito T.....	49
9.1.4.	Separación de las diferentes subpoblaciones de MDSC y su actividad supresora	51
9.1.5.	Producción de citocinas y quimiocinas inducidas por los TcES necesarias para el reclutamiento de monocitos.....	54
9.2.	¿El reclutamiento de las MDSC se verá afectado en ausencia de STAT-1, STAT-6 y/o IL-4R α ?	57
10.	DISCUSIÓN	62
11.	CONCLUSIONES	69
12.	PERSPECTIVAS	69
13.	LITERATURA CITADA	70

2. ABREVIATURAS

µL	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
pg	Picogramos
ng	Nanogramos
µg	Microgramos
mg	Miligramos
g	Gramo
V	Volts
mAmp	Miliampers
cpm	Cuentas por minuto
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1 o CCL2)
CCL2	Ligando de quimiocina (chemokine (C-C motif) ligand o MCP-1)
PDL-1	Ligando de muerte programada 1 (Programmed death-ligand 1)
PDL-2	Ligando de muerte programada 2 (Programmed death-ligand 2)
PD-1	Receptor de muerte programada (Programmed death receptor)
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
IFN-γ	Interferón gamma
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción (signal transducer and activator of transcription)
³ H-Timidina	Timidina tritiada

IL-4R α	Cadena alfa de receptor de interleucina 4
ASB	Albúmina de suero bovino
PBS	Amortiguador de fosfatos salino (Phosphate buffer saline)
i.p.	Intraperitoneal
TcES	Antígeno excretado secretado de <i>Taenia crassiceps</i>
PM	Peso molecular
SDS	Dodecil sulfato de sodio
α CD3	Anticuerpo anti CD3
FcR	Receptores Fracción cristalizable
SBF	Suero Bovino Fetal
TA	Temperatura ambiente
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
KO	Knock-out
MDSC	Células mieloides supresoras (Mieloid derived supressor cells)
TFH	Células T foliculares cooperadoras
TH1	T Helper 1 (células T cooperadoras tipo 1)
TH2	T Helper 2 (células T cooperadoras tipo 2)
M ϕ	Macrófago
M ϕ CA	Macrófago clásicamente activado

MφAA Macrófago alternativamente activado

CPA Células presentadoras de antígenos

CD Células dendríticas

iDC

PRR Receptores de reconocimiento de patrón

PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos

3. RESUMEN

Los helmintos son gusanos parásitos que comprenden una clase de patógenos que causan una diversidad de padecimientos en todo el mundo. La respuesta inmune de los mamíferos contra estos gusanos es compleja y puede ayudar a prevenir, limitar o erradicar la infección. Un modelo de infección por helminto es el cestodo *Taenia crassiceps*. Sus glicanos intactos o determinada fracción de los productos excretados/secretados que produce *in vitro* (TcES) han demostrado su capacidad como adyuvantes en el desarrollo de una respuesta inmune TH2, a través de la regulación de la maduración y activación de células dendríticas y macrófagos. También se ha descrito que Antígeno soluble de *Taenia crassiceps* tiene la capacidad de movilizar células inmaduras de origen mieloide con capacidad supresora (MDSCs). Las MDSC tienen un papel relevante en el enlace entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, existen pocas investigaciones en infecciones parasitarias por helmintos. En este trabajo se evaluó el reclutamiento de neutrófilos y monocitos inducidos después de la inoculación de TcES durante 48 horas. Encontramos que los neutrófilos fueron reclutados durante las primeras 6h, seguida por los monocitos los cuales fueron incrementando su reclutamiento hasta las 48h, en este tiempo los neutrófilos disminuyeron significativamente su porcentaje. De manera interesante estas poblaciones celulares expresaron de manera temprana PDL-1 y tienen la capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T estimulados con α CD3. Al separar las tres subpoblaciones identificadas, encontramos que los monocitos Ly6C^{low} resultaron ser más supresores que los monocitos Ly6C^{hi} y los neutrófilos Ly6G⁺ Ly6C⁺. Sin embargo, el mayor efecto supresor se presentó cuando las tres poblaciones actuaron de forma sinérgica. Por otro lado, demostramos que el efecto de reclutamiento de los monocitos Ly6C^{hi} es dependiente de STAT-1 e independiente de una respuesta TH2 por STAT-6 y IL-4R α . Así mismo la ausencia de STAT-1 aumenta el reclutamiento de neutrófilos al peritoneo. Concluimos que los TcES tienen la capacidad de reclutar poblaciones de celulares (monocitos y neutrófilos) e inducir en estas la expresión de moléculas supresoras como PDL1 de manera temprana y de esta manera modular la respuesta inmune suprimiendo la proliferación de

linfocitos T. Además, demostramos que la vía de señalización involucrada en el reclutamiento de monocitos y neutrófilos por los TcES fue principalmente STAT-1. Por otro lado, se demostró que la expresión de PDL1 en células CD11b⁺ fue dependiente de STAT-1 y STAT-6. Este estudio nos ayudará a entender los mecanismos por los cuales antígenos (TcES) producidos por un parásito pueden modular la respuesta inflamatoria de diferentes enfermedades.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Parásitos helmintos

Una infección parasitaria es producida por parásitos animales, tales como protozoos, helmintos y ectoparásitos, como garrapatas o ácaros. En la actualidad, estos parásitos son responsables de una morbilidad y una mortalidad, en especial en los países en vías de desarrollo (Abbas, Lichtman y Pillai, 2012).

Los parásitos, en un sentido amplio, incluyen agentes de enfermedad que afectan no solamente a humanos, sino también a animales domésticos, cosechas y a la fauna silvestre. En este contexto, los parásitos juegan un doble papel en la naturaleza. Por un lado, funcionan como agentes reguladores de las poblaciones de hospederos, contribuyendo al mantenimiento de la diversidad genética y la estructura de las comunidades de vertebrados e invertebrados. Por otro lado, representan una amenaza para la salud humana, la agricultura, los sistemas naturales, las prácticas de conservación y la economía global (Perez-Ponce de León, García-Prieto y Mendoza-Garfias, 2011). El impacto o significancia socioeconómica varía de acuerdo al patrón de distribución, biología y otras características específicas de la interface parásito-hospedero (Hoberg, 2002).

La relación parásito-hospedero produce un equilibrio de adaptación en el curso de la filogenia, es decir, a través de la evolución el parásito ha podido modelar la respuesta inmune (inmunomodulación) (Apt Baruch, Alcaíno y Arriagada, 2013). Y aunque el objetivo final de la respuesta inmunitaria sea la de eliminar al patógeno, provocar la curación total y forjar una inmunidad a nuevas infecciones (inmunidad esterilizante), en la mayoría de las parasitosis la respuesta inmune del hospedero permite la curación clínica; el hospedero es resistente a la infección, pero el parásito sobrevive en él (inmunidad concomitante o premunición) (Apt Baruch, Alcaíno y Arriagada, 2013; Becerril Flores, 2014).

De entre la diversidad de patógenos existentes encontramos una amplia gama de helmintos comúnmente llamados gusanos que son organismos multicelulares,

ampliamente distribuidos en la naturaleza, muchos de ellos viven libremente y otros se han adaptado a llevar vida parasitaria en vegetales, animales o en el hombre (Botero y Restrepo, 2012).

Los helmintos parásitos son responsables de la infección de un tercio de la población mundial, hecho que los hace uno de los agentes infecciosos más prevalentes en el mundo. Los helmintos establecen infecciones crónicas prolongadas, que genera diferentes enfermedades y síndromes debilitantes, cada uno se asocia con diferentes grados de inmunosupresión en la respuesta inmune tanto en el huésped humano como en animales (McSorley y Maizels, 2012).

La extraordinaria prevalencia de infecciones con helmintos, refleja indudablemente la habilidad que poseen para manipular el sistema inmune del hospedero, el cual probablemente ha sido desarrollado sobre eones de años de coevolución con la finalidad de suprimir respuestas que podrían resultar en su eliminación. y así sobrevivir dentro del huésped por mucho tiempo (Helmsby, 2009).

Estos parásitos presentan una sorprendente variedad de ciclos de vida, que a su vez son complejos desde la transmisión directa fecal-oral (como las larvas de anquilostomas en el medio ambiente) o la dependencia de vectores (como el caracol esquistosomático) (McSorley y Maizels, 2012). Así mismo estos parásitos han evolucionado para ocupar un amplio rango de nichos dentro de su hospedero (Maizels *et al.*, 2004), por lo que correspondientemente, también utilizan diferentes rutas de invasión como a través de la piel (esquistosomas o anquilostomas), por picaduras de mosquito (gusano filarial) y con mayor frecuencia, en el tracto gastrointestinal (McSorley y Maizels, 2012).

Los helmintos representan un grupo de organismos que, no constituyen un grupo monofilético, ya que bajo este término se incluyen representantes de cuatro Phyla que no están relacionados filogenéticamente: Platyhelminthes, Acanthocephala, Nematoda y Annelida; se caracterizan principalmente por ser metazoarios, macroparásitos y por su aspecto vermiforme (Pérez-Ponce de León García-Prieto y Mendoza-Garfias, 2011).

Sin embargo, los helmintos de mayor importancia médica pertenecen a los filos Nematoda (gusanos redondos) y Platyhelminthes (gusanos planos). Los primeros están divididos en Aphasmeida y Phasmeida, de acuerdo a la ausencia o presencia de fasmides, pequeñas papilas quimiorreceptoras en el extremo posterior. Los segundos se subdividen en las clases Cestoda y Digenea, este último es más conocido con el nombre de superclase Trematoda (Botero y Restrepo, 2012).

Los platelmintos se caracterizan por ser gusanos aplanados dorsoventralmente, hermafroditas, por tener simetría bilateral y por ser acelomados. Dentro de los platelmintos encontramos tanto organismos de vida libre (por ejemplo, las planarias), como parásitos, representados estos últimos por tres grandes grupos que parasitan vertebrados, incluyendo al hombre: digéneos, monogéneos y cestodos (Pérez-Ponce de León, García-Prieto y Mendoza-Garfías, 2011).

4.1.1. Céstodos

La clase Cestoda difiere de la clase Trematoda en que tiene un cuerpo en forma de cinta, sin cavidad corporal (celoma) y sin canal alimentario. El cuerpo está dividido en segmentos, cada segmento contiene uno y a veces dos conjuntos de órganos reproductores masculinos y femeninos (Taylor, M.A., Coop, R.L. and Wall, 2015). El hábitat definitivo del adulto por lo general es el intestino o la vía biliar, y los estados larvarios se alojan en diferentes tejidos de los hospederos intermediarios (Botero y Restrepo, 2012).

La familia de cestodos Taeniidae es una de las siete familias de importancia veterinaria (Apt Baruch, Alcaíno y Arriagada, 2013), y generalmente consiste de dos géneros válidos, *Taenia* y *Echinococcus*. El género *Echinococcus* es monofilético debido a su remarcable similaridad en morfología, características de desarrollo y composición genética. Por el contrario, *Taenia* es un grupo altamente diverso. Las especies cosmopolitas de *Taenia* son de importancia médica y veterinaria debido a que las Tenias adultas son responsables de infecciones intestinales (teniasis) y las larvas (metacestodos) de las infecciones sistémicas

(cisticercosis y cenurosis) en los animales domésticos y los seres humanos. Los mamíferos terrestres son esenciales para el ciclo vital de *Taenia spp.* Los miembros del orden Carnivora actúan principalmente como huéspedes definitivos, y sus presas pertenecientes a los órdenes Rodentia, Lagomorpha y Cetartiodactyla fungen como huéspedes intermediarios (Nakao *et al.*, 2013).

Todos los organismos de esta clase son parásitos de suma importancia (Apt Baruch, Alcaíno y Arriagada, 2013). Por lo que en muchos años los investigadores han estado estudiando miembros de esta clase, de importancia médica y económica. El objetivo de estos estudios ha sido proporcionar una base racional y científica para el desarrollo de medidas eficaces contra la infección y enfermedades mediadas por cestodos (Siles-Lucas y Hemphill, 2002).

Para lograr dichos objetivos, se han establecido modelos *in vivo* e *in vitro* en el laboratorio, que ha permitido el estudio y una mejor comprensión de la relación parásito-anfitrión durante las etapas del ciclo de vida, así como la fisiología del parásito. Los modelos animales *in vivo* han sido utilizados por la mayoría de los investigadores en la patogénesis y aspectos de la inmunología del hospedero después de la infección con cestodos, estos están representados por muchas especies, la mayoría de ellos incluidos en la familia Taeniidae (Siles-Lucas y Hemphill, 2002).

4.1.2. *Taenia crassiceps*

Taenia crassiceps (Zeder, 1800) es un helminto cosmopolita del hemisferio norte, incluyendo Europa, Norteamérica y Asia (Lescano y Zunt, 2013), es una especie de cestodo del orden Cyclophyllidea que en cuyo ciclo de vida natural infecta a canidos (en etapa adulta) y roedores (en su fase larval), estos representan a sus hospederos definitivos e intermediarios respectivamente (figura 1), este helminto afecta principalmente a animales salvajes, domésticos y raramente a los humanos inmunocomprometidos con VIH-SIDA o problemas del sistema inmunológico deteriorado (Terrazas, 2008; Willms y Zurabian, 2010; Hernandez, Leung y McKay, 2013; Peón, Espinoza-Jiménez y Terrazas, 2013).

En el huésped intermediario, el metacestodo, la larva de *T. crassiceps*, es responsable de causar cisticercosis (Hoberg, 2002), distribuyéndose en diferentes nichos en el organismo, pudiéndose encontrar en sitios anatómicos como el tejido subcutáneo de roedores salvajes; así como en las cavidades pleurales y peritoneales (Willms y Zurabian, 2010).

Algunas estirpes larvianas que se multiplican principalmente en roedores silvestres, se han aislado y propagado extensamente para el estudio de las propiedades biológicas tanto de las fases larvianas como adultas (Willms y Zurabian, 2010). El empleo de este metacestodo tiene la ventaja de una reproducción asexual por gemación, este fenómeno biológico ha sido muy utilizado en la generación de infecciones de larga duración en animales del laboratorio, principalmente roedores, donde los parásitos son inoculados vía intraperitoneal (Freeman, 1962) y después de algunas semanas, cientos de parásitos macroscópicos pueden ser vistos en el peritoneo (Terrazas, 2008), estas características lo posicionan como un excelente modelo de infección por helminto (Hewitson, Grainger y Maizels, 2009; Hernandez, Leung y McKay, 2013).

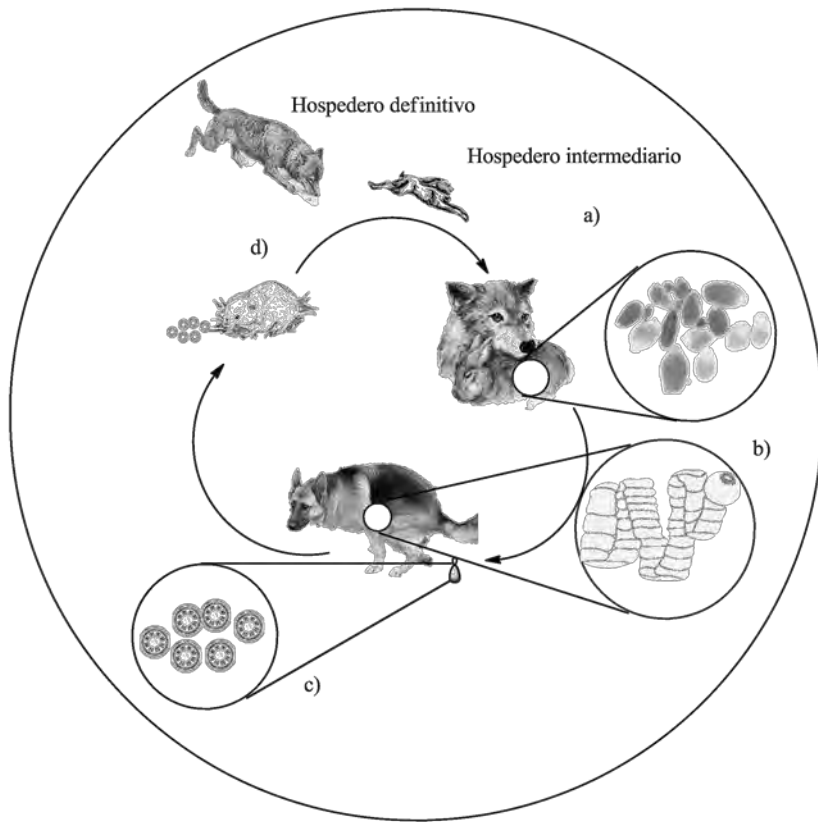


Fig. 1 Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*. Durante la vida silvestre de *T. crassiceps* la transmisión es totalmente zoonótica e incluye zorros, perros y felinos como anfitriones de la *Tenia* adulta en el intestino delgado y roedores en su fase larval (metacestodo). **a)** Hospedero definitivo; ingiere a un hospedero intermediario infectado con metacestodos de *Taenia crassiceps*. **b)** En el intestino, los cisticercos se desarrollan en un platelminto en estado adulto. **c)** Las *Tenias* adultas se adhieren al intestino delgado con su escólex y reside en el intestino delgado (duodeno). Los adultos producen proglotidos que ya maduros se convierten en grávidos, liberan huevos o se separan de la *Taenia*, migran al ano o se liberan en las heces. **d)** Tras sobrevivir en el ambiente, los huevos infecciosos son ingeridos a través de vegetación contaminada por pequeños roedores silvestres. En el intestino del huésped intermediario, los huevos eclosionan e invaden la pared intestinal, migran y se alojan en músculos estriados u otras cavidades. Se diferencian hacia la fase larvaria o cisticercos. Los metacestodos pueden ser recuperados e inoculados en la cavidad peritoneal de ratones consanguíneos, y de esa forma ser propagados indefinidamente por una inoculación en serie (Willms y Zurabian, 2010).

4.2. Respuesta inmune

El sistema inmune protege contra enfermedades, habitualmente infecciosas, por medio de moléculas, células, tejidos y órganos que, en su conjunto, generan una reacción regulada y coordinada denominada respuesta inmune (Abbas, Lichtman y Pillai, 2012).

El sistema inmunitario se divide en dos. La respuesta inmune innata y la adaptativa. La inmunidad innata, es la primera línea de defensa contra una infección. Casi todos los componentes de la inmunidad innata se encuentran antes del inicio de la infección y constituyen el grupo de mecanismos de resistencia contra la enfermedad que no son específicos de un patógeno en particular, sino que incluyen componentes celulares y moleculares que reconocen clases de moléculas peculiares a los patógenos que se encuentran con frecuencia (Kindt, Goldsby y Osborne, 2007).

Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes: 1) barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas y linfocitos citolíticos naturales (NK); 3) proteínas sanguíneas, incluidos miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y 4) unas proteínas llamadas citocinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células encargadas de la inmunidad innata (Abbas, Lichtman y Pillai, 2012).

La línea celular de defensa innata comprende una serie de células con receptores sensibles que detectan productos microbianos e instigan un contraataque. La respuesta a la invasión por un microorganismo infeccioso que supera las barreras iniciales de piel y membranas mucosas es rápida; típicamente se inicia a los pocos minutos de la invasión (Owen, Punt y Stranford, 2014).

A pesar de que el sistema inmune innato es un estrato de defensa con acción relativamente amplia, eficaz y se ocupa en gran parte de intentar destruir a los

agentes infecciosos desde el momento en que ingresan al cuerpo. No pueden distinguir ligeras diferencias entre microbios, por lo que la capacidad de reconocimiento es limitada. Razón por la que las acciones del sistema inmune innato también son responsables de alertar al siguiente nivel de defensa: el sistema inmunitario adaptativo, el cual representa las tropas de élite del sistema inmunitario y pueden lanzar un ataque que ha sido específicamente adaptado a la naturaleza del agente (Delves *et al.*, 2008).

Este sistema inmunitario adaptativo combate la infección, con especificidad, al distinguir diferentes sustancias microbianas y moléculas diferentes o estrechamente relacionadas (antígenos) con una respuesta específica a la medida del patógeno atacante al desarrollar una gran población de linfocitos B y T, principales componentes de la inmunidad adaptativa, que de manera específica reconocen al invasor (Kindt, Goldsby y Osborne, 2007).

Montar una respuesta adaptativa requiere tiempo antes de ser totalmente eficaz. Se caracteriza por el fenómeno de memoria inmunitaria, y una vez que es activada por un patógeno específico, exposiciones ulteriores a éste inducen respuestas más rápidas y a menudo más potentes. El reconocimiento de los invasores es mediado por productos de secreción de células B (anticuerpos) y receptores de células T los “sensores” de la inmunidad adaptativa. Estas características sin duda amplían y mejoran en magnitud y capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a un microbio en particular, porque es más eficiente (Kindt, Goldsby y Osborne, 2007; Abbas, Lichtman y Pillai, 2012). Además complementa los mecanismos de la inmunidad innata que los vertebrados comparten con otros animales invertebrados (Parham, 2016).

4.2.1. Respuesta inmune frente a parásitos helmintos

Durante la infección por helmintos el sistema inmune usa diferentes mecanismos efectores para controlar el tamaño de la población de parásitos y los sitios del cuerpo en que éstos residen (Parham, 2016).

La variedad de ciclos de vida de los parásitos y las estrategias de evasión de diferentes patógenos se dirigen a una completa gama de rutas inmunitarias del huésped, lo que probablemente ha impulsado la diversificación y redundancia en el sistema inmunológico para generar mecanismos alternativos y duplicar funciones clave que son esenciales para expulsar al parásito del organismo y sobrevivir a la infección (Allen y Maizels, 2011).

Sin embargo grandes patógenos extracelulares son reconocidos por su habilidad para suprimir y evadir la inmunidad del hospedero, protegiéndose a sí mismos de la eliminación y minimizando la patología severa (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003). Al inducir una respuesta inmune completamente distinta al perfil de la respuesta inmune generada por patógenos microbianos, la cual ha sido comprobada en humanos y modelos experimentales, como es el caso de los parásitos helmintos (Allen y Maizels, 2011).

La evasión inmune de los helmintos se origina cuando se induce una respuesta celular adaptativa T cooperador 2 (TH2) (Allen y Maizels, 2011), e involucra interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 y IL-13, anticuerpos de isotipo IgG1, IgG4 e IgE, factor estimulante de colonias (GM-CSF) y grandes poblaciones de eosinófilos, basófilos, mastocitos y macrófagos alternativamente activados (M ϕ AA), lo que origina una superposición de poblaciones de células reguladoras que pueden ejecutar funciones similares, guiadas por el medio estimulante (Allen y Maizels, 2011; Hernandez, Leung y McKay, 2013; Peón, Espinoza-Jiménez y Terrazas, 2013).

El sistema inmune innato no sólo anticipa e inicia la respuesta adaptativa de las células TH2, sino que, continúa proporcionando recursos para reforzarse mutuamente durante la infección. Este paralelismo refleja tanto el antiguo origen

evolutivo de la inmunidad TH2, así como la importancia de montar esta respuesta inmunitaria en diferentes circunstancias (Allen y Maizels, 2011; Makepeace *et al.*, 2012).

Las citocinas IL-4 e IL13 inducen la activación de macrófagos hacia un perfil denominado alternativo (M ϕ AA). Estas dos citocinas comparten un componente en común en su señalización el cual es compartido; la cadena alfa del receptor de IL-4 (IL-4R α) que en el momento de interaccionar con sus ligandos inicia un proceso de transducción de señal a través de la fosforilación de JAK1 y TyK2, tirocin cinasas citoplasmáticas, que fosforilan STAT6 induciendo de esta manera su dimerización de la misma, lo que resulta en su translocación hacia el núcleo y posteriormente desencadena la transcripción de genes involucrados en apoptosis, citocinas como IL-13 e IL-4 (Martinez, Helming y Gordon, 2009).

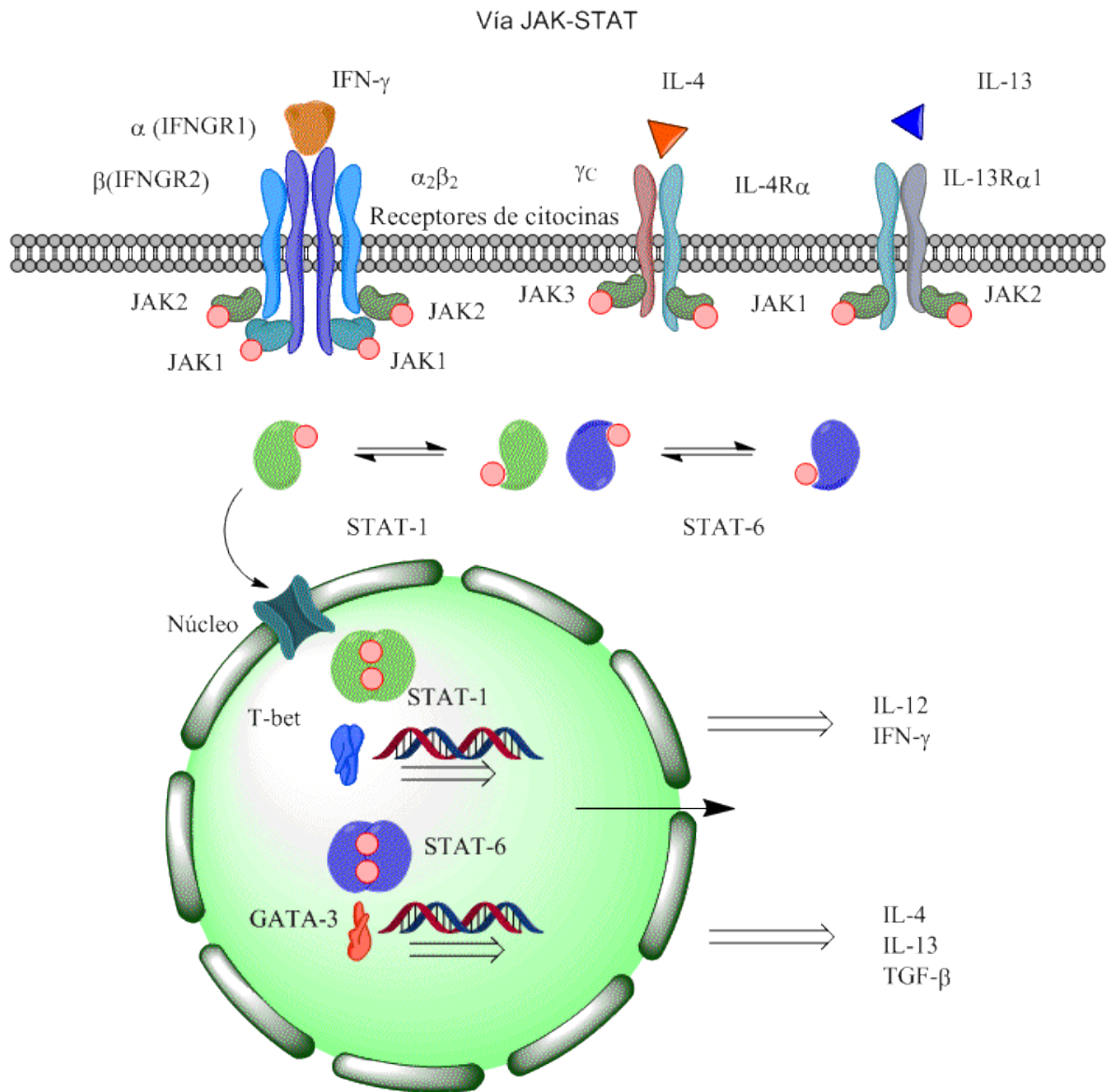


Figura 3. Vía de señalización JAK-STAT

La importancia de las células CD4⁺ TH2 radica en que cuando están ausentes durante la infección con nematodos, no se despliega una respuesta inmune protectora y se pierde la habilidad de expulsar al helminto a través del intestino. Sin embargo, la transferencia de células CD4⁺ que expresan IL-4, permiten la expulsión del gusano en ratones deficientes de células T. Además, se ha comprobado que deficiencias en moléculas clave asociadas con las células inmunes tipo 2 incrementa la susceptibilidad de ratones a la infección con helmintos, y los ratones bloqueados en la cadena alfa del receptor de IL4 (IL-4R α)

transductores de señal y activadores de transcripción 6 (STAT6) o la proteína de unión del factor de transcripción GATA 3 (GATA3) muestran una inmunidad antihelminfos altamente comprometida (Allen y Maizels, 2011).

La interfase huésped-parásito, que está predominantemente en el intestino o tejidos periféricos, es el lugar donde se desarrollan mecanismos efectores de la respuesta de tipo TH2 para la expulsión o muerte de parásitos. Un ejemplo es IL-13 en el intestino, donde promueve la hiperplasia de células caliciformes y aumenta la producción de moco, lo que contribuye a la expulsión de gusano. Para la focalización de parásitos en tejidos periféricos, la producción de anticuerpos y el reclutamiento de células efectoras que liberan moléculas citotóxicas tras la activación (por ejemplo, a través de la reticulación de los receptores Fc) eventualmente dañan el parásito, aunque si estos procesos no se controlan adecuadamente, también pueden dañar al huésped (Makepeace *et al.*, 2012).

Además de la bien descrita función efectora contra los parásitos helmintos, las respuestas TH2 son parte de las respuestas adaptativas y, por tanto, de la memoria, que también dan lugar a mecanismos de reparación tisular. Dado que la destrucción de tejidos es una manifestación común de muchas infecciones por helmintos, limitar el daño mediado por parásitos es de suma importancia para mitigar las secuelas de la enfermedad. Por ejemplo, tanto *Ascaris* como *Nippostrongylus* pueden conducir a daño del tejido pulmonar durante la migración a través del huésped. Las citocinas TH2, IL-4 e IL-13, son potentes inductores de moléculas implicadas en procesos de cicatrización de heridas, tales como la molécula- α de tipo resistina (RELM α) la arginasa la metalopeptidasa 12 de matriz (MMP12) y el receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2 (TREM-2) (Makepeace *et al.*, 2012).

En resumen, la inmunidad tipo 2 o TH2 cumple tres funciones principales: reparación de heridas, control inflamatorio y resistencia a helmintos, todos los cuales se combinan para mantener la homeostasis en el huésped infectado (Allen y Maizels, 2011).

4.2.2. Respuesta inmune e inmunomodulación por *Taenia crassiceps*

La infección experimental de ratones con la larva de *T. crassiceps* se usa en el laboratorio como un modelo sistémico para el estudio de la base bioquímica inmunológica de la relación parásito-hospedero (Spolski *et al.*, 2002), así como de factores biológicos de defensa tal como como susceptibilidad y resistencia que se presenta en la enfermedad. Por lo tanto, factores genéticos, inmunológicos y hormonales han sido relacionados a la resistencia en este modelo. Del mismo modo, algunas de esas observaciones han sido confirmadas en la naturaleza del hospedero de *Taenia solium*. Adicionalmente, antígenos con similitudes han sido establecidas entre metacestodos de *T. solium* y *T. crassiceps* (Terrazas, 2008), por lo que se ha utilizado como modelo en el desarrollo de una vacuna contra el parásito humano (Hernandez, Leung y McKay, 2013).

La infección de ratones con larvas (metacestodos) de *T. crassiceps* vía intraperitoneal induce un modelo de cisticercosis experimental (Spolski *et al.*, 2000) que ha revelado una rápida y transitoria respuesta inmune de tipo TH1 en una infección aguda, en este punto se identificó altos niveles de IFN- γ NO e IgG2a que dura un tiempo aproximado de dos o tres semanas, pero a medida que el tiempo de infección avanza, se vuelve crónica, y la respuesta eventualmente cambió a una de tipo Th 2, con altas concentraciones de las citocinas IL4 e IL-13, así como anticuerpos IgG1 y IgE, la típica respuesta inmune de infección con *T. crassiceps* que dura al menos dos meses (figura 4) (Terrazas *et al.*, 1998).

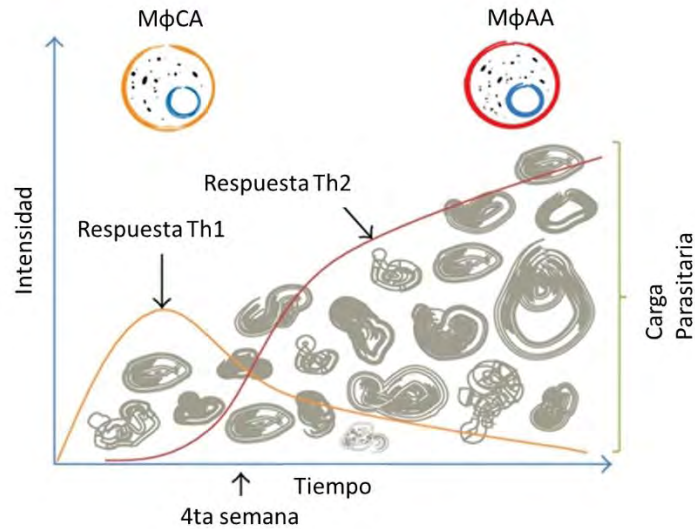


Fig. 4 La respuesta TH1 inicial a *T. crassiceps* es rápidamente reemplazada por una respuesta TH2 por la tercera o cuarta semana después de la infección. Este cambio se acompaña de un cambio de fenotipo de macrófagos clásicamente activados (MφCA) temprana se sustituye por una población dominante de macrófagos alternativamente activados (MφAA). Además se puede observar un aumento en la carga parasitaria cuando se establece la población de MφAA y la respuesta de Th2 dominante (Peón, Espinoza-Jiménez y Terrazas, 2013).

Experimentos desarrollados con ratones KO mostraron que la susceptibilidad del estado larval de *T. crassiceps* es dependiente de la señalización del transductor de señal y activador de transcripción 6 (STAT6), un factor de transcripción clave involucrado en la diferenciación de linfocitos TH2 y macrófagos alternativamente activados (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002). Por otro lado, la resistencia a este parásito fue evaluado en ratones resistentes, donde se comprobó que este fenómeno es dependiente de la citocina IL-12 y la molécula STAT4 a través de una inmunidad sostenida de tipo TH1 (Rodríguez-Sosa *et al.* 2004). Por lo tanto, una respuesta de tipo TH2 está asociada con la susceptibilidad a la infección, mientras que una respuesta de tipo TH1 fue claramente involucrado en la protección contra *T. crassiceps* (Peón, Espinoza-Jiménez y Terrazas, 2013).

La reacción inmune hacia el platelminto se genera por la asociación con antígenos de la superficie del parásito (McSorley, Hewitson y Maizels, 2013). No obstante, también se ha demostrado que los productos excretados o secretados de los helmintos también pueden dirigir la inmunidad TH2, y que el efecto puede ser

ejercido directamente en células del sistema inmune del hospedero o indirectamente mediante mecanismos reguladores del propio sistema inmune, incluso en presencia de inductores de TH1. Por ejemplo, cuando se estimula con antígeno soluble de huevo de *Schistosoma mansoni* (SEA), las células dendríticas son capaces de inducir una respuesta TH2 en presencia de un estímulo bacteriano (Allen y Maizels, 2011; McSorley, Hewitson y Maizels, 2013).

Estas moléculas han llamado la atención por sus efectos benéficos en la prevención o supresión de enfermedades inmunes y son reportados como posibles tratamientos de autoinmunidad y alergias. Generalmente se asume que tales moléculas se liberan de los parásitos vivos y se pueden colectar como productos excretados/secretados (ES) de cultivos *in vitro* (Hewitson, Grainger y Maizels, 2009).

Recientes estudios experimentales han demostrado que productos excretados/secretados (glicoproteínas y glicolípidos) de algunos helmintos como *Caenorhabditis elegans*, *Brugia malayi* y *Taenia crassiceps* pueden ejercer un papel como adyuvantes de la respuesta inmune tipo TH2 y así modular la homeostasis del hospedero (Hewitson, Grainger y Maizels, 2009). Del mismo modo se ha determinado que sus efectos son determinados por su conformación química, y que alguna alteración en su estructura de los carbohidratos altera significativamente su capacidad de inducir una óptima respuesta TH2 (Gómez-García *et al.*, 2006).

Se ha comprobado que antígenos solubles de *T. crassiceps*, tienen la capacidad de generar poblaciones celulares características de la infección, como lo son linfocitos T CD4+ efectoros caracterizados por secretar altos niveles de citocinas TH2, después de varias inoculaciones (Gómez-García *et al.*, 2006), además de inducir una población heterogénea de células mieloides precursores y progenitores de macrófagos, células dendríticas, granulocitos y monocitos que se van acumulando gradualmente en el peritoneo (Van Ginderachter *et al.*, 2010), que pueden ser precursoras de células dendríticas y macrófagos activados

alternativamente MφAA) los cuales suprimen la proliferación de células T CD4+ vírgenes a través el complejo PD-1/PD-L's (Terrazas *et al.*, 2005).

Otros estudios reportan que una fracción de los antígenos excretados/secretados de *T. crassiceps* (TcES) pueden regular la activación y maduración de las células dendríticas (DC) (Terrazas, Gómez-García y Terrazas, 2010), produciendo un perfil inmaduro en las células dendríticas (iDC) y tolerantes a LPS (Terrazas *et al.*, 2011). Se sabe que los antígenos solubles de *T. crassiceps* pueden reclutar células mieloides supresoras (CD11b+ Gr-1+ F4/80+) 18 horas después su inoculación en ratones, y que es independiente del transductor de señal y activador de transcripción (STAT6) y del receptor tipo toll 4 (TLR4) (Gómez-García *et al.*, 2005).

Sin embargo, se desconoce si el TcES puede reclutar estas poblaciones en tiempos cortos y, cómo es la dinámica de reclutamiento de los subgrupos de monocitos, CD11b⁺Ly6C^{hi}CCR2⁺ (inflamatorios) y CD11b⁺ Ly6C^{low}CCR2⁻ (antiinflamatorias), así como de granulocitos.

Experimentos con moléculas involucradas en la quimiotaxis, señalan que el reclutamiento de monocitos depende de MCP1 (ligando de quimiocinas CCL2) o fractalquina (o CX3CL1) y que el reclutamiento de los subgrupos difiere respecto al tipo de estímulo (Shi y Pamer, 2011). Sin embargo, se desconoce cómo una alteración en el eje de comunicación intracelular crucial, que permite la generación de un microambiente inflamatorio y el consecuente desarrollo de una respuesta inmune TH1 a través de STAT1 o bien en contra parte la ausencia de un receptor determinante en la activación de STAT6 cómo la cadena alfa del receptor de interleucina 4 (IL-4Rα), puede afectar en el reclutamiento de las MDSCs.

4.3. Células mieloides supresoras

Las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC por sus siglas en inglés), como su nombre lo indica tienen un origen mieloides, constituyen una población heterogénea de células más o menos inmadura cuya presencia se ha visto en algunas enfermedades autoinmunes, infecciones (tanto agudas como crónicas), cáncer y diferentes tipos de estrés. Así mismo poseen la remarcable habilidad de suprimir la respuesta celular T (Gabrilovich y Nagaraj, 2009; Gimeno y Barquinero, 2011). Además del efecto supresor en la respuesta inmune adaptativa, las MDSCs también han sido reportados como reguladores de la respuesta inmune innata por medio de la modulación de la producción de citocinas de macrófagos, por lo que han sido intensamente estudiados (Pastuła y Marcinkiewicz 2011).

Morfológicamente, dos poblaciones celulares han sido descritas en las MDSC: granulocítica con núcleo pseudosegmentado o anillado (PMN-MDSC), mientras que la subpoblación monocítica es mononuclear (M-MDSC) (Gimeno y Barquinero, 2011).

La caracterización inmunofenotípica de las células mieloides supresoras, inicialmente se realizaba analizando la expresión de los marcadores CD11b y Gr-1 (Bronte *et al.*, 2016), lo que permitió diferenciar a las células CD11b⁺ Gr-1^{hi}, granulocitos en diferentes estados de desarrollo y células CD11b⁺ Gr-1^{low/int}, monocitos y otras células mieloides inmaduras (Gimeno y Barquinero, 2011).

El marcador CD11b identifica a la subunidad α de la integrina $\beta 2$ de Mac-1 se expresa en granulocitos, células dendríticas (DC), monocitos y macrófagos donde regula su adhesión además de la migración. Por otro lado, el antígeno Gr-1 es identificado por el anticuerpo RB6-8C5, el cual se une con diferente especificidad a dos glicoproteínas de superficie celular ancladas a fosfatidil inositol: Ly6G y Ly6C. Y aunque los antígenos Ly6C y Ly6G son predominantemente expresados en la superficie de monocitos y granulocitos, también se pueden detectar en células endoteliales, linfocitos T y NK entre otros tipos de células (Gimeno y Barquinero, 2011).

El hecho de que los marcadores empleados para la identificación de MDSC se adhieran a diferentes células inmaduras significa que se unen a progenitores mieloides tempranos y células mieloides inmaduras en diferentes estados de diferenciación que después pueden madurar en macrófagos, granulocitos y células dendríticas (Pastuła y Marcinkiewicz 2011).

Aunque inicialmente fue útil la identificación de MDSC, el uso de este criterio original por medio de los marcadores CD11b y Gr-1, en la actualidad ya no es suficiente, ya que se han desarrollado nuevos anticuerpos para la identificación de los antígenos Ly6C y Ly6G, con los que se ha demostrado que existen subpoblaciones PMN-MDSC (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}) y M-MDSC (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}) (Gabrilovich y Nagaraj, 2009; Bronte *et al.*, 2016).

Las funciones de las MDSC están asociadas a varios factores extracelulares tales como el lipopolisacárido (LPS), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), factor de células madre (SCF), interleucina(IL)-6, interferón gamma (IFN- γ) IL-1 β factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Hsp72, IL-13, C5a, y prostaglandina E2 (PGE2) puede inducir la diferenciación de las células mieloides supresoras, mientras la IL-4 y todos los ácidos trans-retinoicos pueden inhibir este proceso. Por las señales intracelulares, miembros de la familia de transductores de señal y activadores de transcripción (STATs) C/EBP β y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) promueven la función MDSC, mientras que el factor regulador de interferón-8 (IRF-8) y Smad3 disminuyen su actividad MDSC. La función inmunosupresora de las MDSC es mediada a través de varias moléculas, moléculas relacionadas con el metabolismo celular primario tales como el óxido nítrico (NO), arginasa, especies reactivas de oxígeno (ROS), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) IL-10, indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), hemo oxigenasa-1 (HO-1), monóxido de carbono (CO) y PGE2 (Zhao *et al.*, 2016).

4.3.1. Monocitos

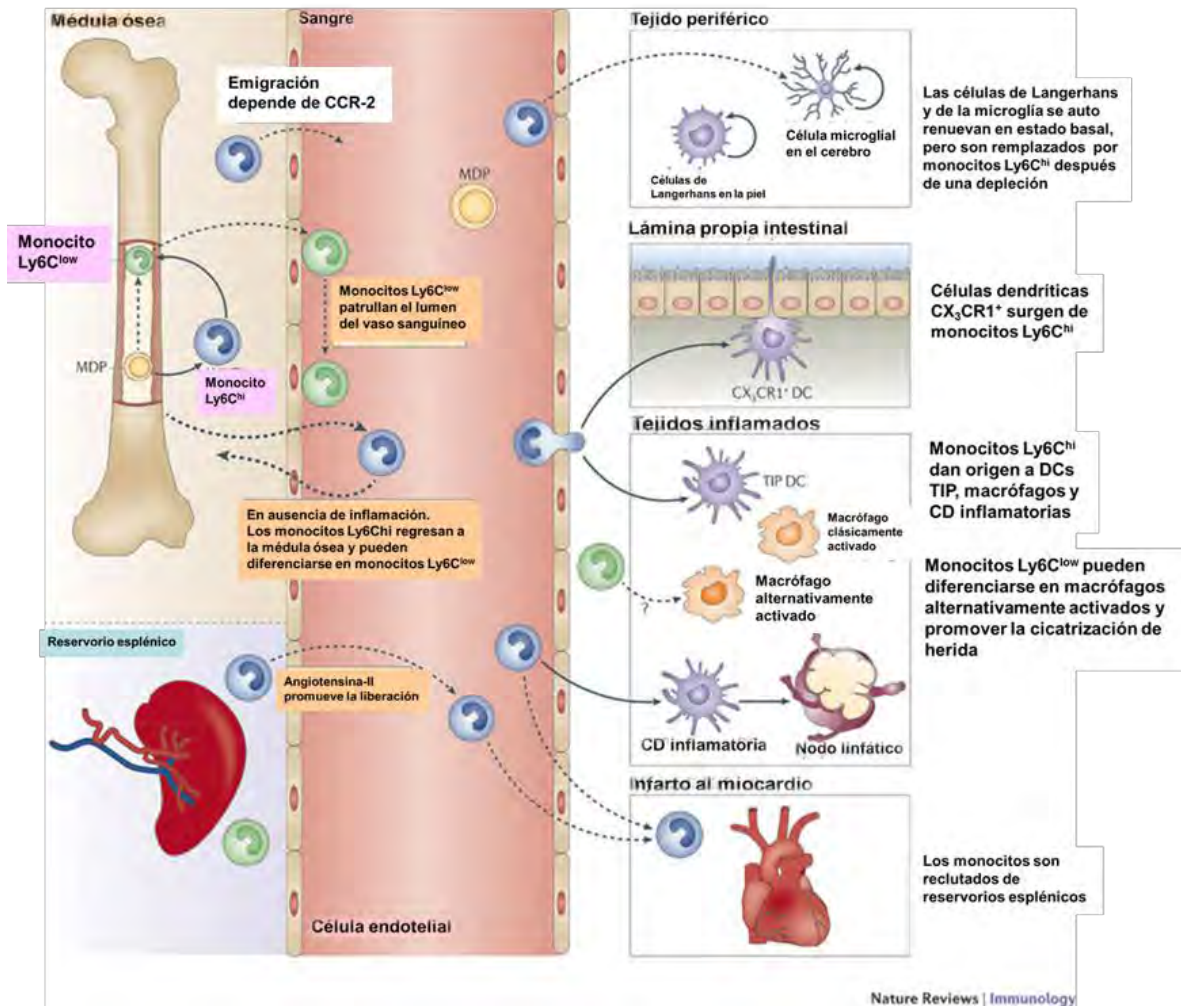
Los monocitos son un subgrupo de células blancas sanguíneas circulantes que pueden diferenciarse en células dendríticas y macrófagos de tejido. Históricamente han sido categorizados como parte del sistema fagocítico mononuclear (Abbas, Lichtman y Pillai, 2012), que incluye células dendríticas y macrófagos con base a características fenotípicas y funcionales, que a menudo se sobreponen (Guilliams *et al.*, 2014).

Estudios de monocitos en diferentes enfermedades han revelado una remarcable característica de multipotencialidad en diferentes ambientes inflamatorios. La capacidad de los monocitos para desplazarse y transitar hacia donde son necesarios es crucial para sus funciones en la promoción de la defensa inmune durante la infección y en el control de enfermedades inflamatorias (Shi y Pamer, 2011).

En ratones, los monocitos pueden ser divididos en dos subgrupos primarios basados en el fenotipo y función. Los monocitos inflamatorios expresan CCR2 y Ly6C. Son rápidamente reclutados a sitios de infección o daño, donde ellos dan origen a macrófagos y células dendríticas proinflamatorias. Los monocitos inflamatorios son críticos en el control de un número de patógenos, incluyendo bacterias como *Listeria*, *Mycobacterium*, hongos incluyendo *Cryptococcus* y *Candida*, parásitos como *Toxoplasma* y virus incluyendo Herpes simplex el virus de la hepatitis murina. Sin embargo, estas células contribuyen a la inmunopatología y autoinmunidad en modelos de arteroesclerosis e infarto cardiaco, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias intestinales, apoplejía y encefalitis. Los monocitos Ly6C^{low}, identificados por la alta expresión del receptor de quimiocina CX3CR1 y baja expresión de CCR2, patrullan los vasos sanguíneos y median las respuestas tempranas en una afrenta. Esas células también han mostrado promover la cicatrización de heridas y angiogénesis en modelos de arterosclerosis e infartos cardiacos (Terry y Miller, 2014).

Los monocitos que son referidos como inflamatorios o Ly6C^{hi} representan aproximadamente 2-5% de células sanguíneas blancas en un ratón no infectado y son rápidamente reclutadas a sitios de infección o inflamación. La deficiencia en CCR2 reduce marcadamente el desplazamiento de los monocitos Ly6C^{hi} a sitios de inflamación, indicando un papel crucial para el receptor de quimiocinas en el desplazamiento de esos monocitos, CCR2 también es expresado por células madre hematopoyéticas (HSCs) y un subgrupo de células natural killer (NK), y el reclutamiento mediado por CCR2 de las HSCs contribuye a la generación de poblaciones de monocitos inflamatorios durante la peritonitis y la hepatitis inducida por acetaminofén (Shi y Pamer, 2011).

A pesar de que ha habido esfuerzos significativos para definir las relaciones entre los monocitos Ly6C^{low} y Ly6C^{hi}, aún existen diferentes dificultades en el análisis de controles moleculares, por ejemplo, factores de transcripción, factores de crecimiento y quimiocinas y citosinas de señalización en esos subgrupos fenotípica y funcionalmente distintos (Terry y Miller, 2014).



Nature Reviews | Immunology

Figura 2. Trafico de subgrupo de monocitos circulantes. Los precursores de células dendríticas y macrófagos (MDP), en la médula ósea dan origen a monocitos Ly6C^{hi}, que pueden servir como un intermediario para la generación de monocitos Ly6C^{low}. Los monocitos Ly6C^{hi} salen de la médula ósea de una manera dependiente del receptor de quimiocina CC2 (CCR2) y son reclutados a tejidos inflamados. Aquí pueden diferenciarse en células dendríticas productoras de TNF e iNOS, macrófagos inflamatorios o células dendríticas inflamatorias, algunos subsecuentemente pueden migrar para drenar a nodos linfáticos. Los monocitos Ly6C^{low} patrullan el lumen de los vasos sanguíneos por asociación con el endotelio vascular. Los monocitos Ly6C^{low} también son reclutados a sitios de inflamación y posiblemente contribuyen a la cicatrización de heridas por diferenciación en macrófagos alternativamente activados. Bajo ciertas condiciones experimentales, los monocitos Ly6C^{hi} dan origen a células de Langerhans en la piel, microglia en el sistema nervioso central, y fagocitos mononucleares CX₃CR1 en la lámina propia intestinal, donde pueden muestrear el lumen intestinal extendiendo las dendritas entre las células epiteliales intestinales. En ausencia de inflamación, algunos monocitos Ly6C^{hi} circulantes regresan a la médula ósea. Las funciones del bazo como un reservorio para monocitos fuera de la médula ósea. Tras un infarto de miocardio, los monocitos son liberados del reservorio esplénico, y los monocitos Ly6C^{hi} son selectivamente reclutados al corazón lesionado (Shi y Pamer, 2011).

4.3.2. Granulocitos: neutrófilos

Los neutrófilos son parte de la familia de granulocitos que incluyen eosinófilos y basófilos. Ellos son denominados granulocitos porque en el citoplasma se encuentran pequeños paquetes (en apariencia granulares) con proteínas preformadas que ayudan a definir su morfología histológica. En los neutrófilos existen diferentes tipos gránulos: primarios, secundarios y terciarios. En los gránulos existen más de 300 proteínas que están involucradas en los procesos de los neutrófilos incluyendo: adhesión, migración y actividad antibacteriana. Las vesículas secretoras son de origen endocítico y son los primeros en ser movilizados para facilitar el reclutamiento y migración de neutrófilos. Ellos contienen un reservorio de proteínas de membrana que están incorporadas dentro de la membrana exterior de los neutrófilos después de liberar las vesículas para promover la respuesta inflamatoria. Concentraciones significativas de proteína de unión de heparina (HBP) pueden encontrarse después de la activación de vesículas secretoras y se piensa que actúa como quimioatrayente de monocitos y que tiene importantes implicaciones para la resolución de la respuesta inflamatoria (Makepeace *et al.*, 2012).

Los neutrófilos son las células más abundantes del sistema inmune innato y son los principales jugadores en la batalla contra la infección del cuerpo. Los neutrófilos liberan un coctel citotóxico y proteolítico que permite eliminar efectivamente a los microorganismos invasores (Delves *et al.*, 2008).

Los neutrófilos y su armamento contribuyen significativamente a la respuesta inflamatoria en la fisiología normal y existen importantes mecanismos reguladores que permiten la limitación y resolución de dicha respuesta. La apoptosis, una muerte celular programada que ocurre para conservar el contenido tóxico de los neutrófilos es uno de los mecanismos. La célula apoptótica experimenta muchas alteraciones características, incluyendo la alteración de marcadores de superficie (ej. el incremento de la expresión de fosfatidil serina), que ayuda a los fagocitos, tal como los macrófagos, para eliminarlos (Pillay *et al.*, 2013).

La apoptosis y la posterior fagocitosis de células apoptóticas es fundamental para la resolución exitosa de inflamación y hay interés de investigación significativo en la orientación de la apoptosis como un medio para tratar enfermedades inflamatorias donde los neutrófilos son dominantes (Fox *et al.*, 2010).

También es evidente que en la enfermedad inflamatoria hay varias maneras en las que este mecanismo de regulación puede estar comprometida, también cada vez es mayor la evidencia de que los neutrófilos pueden contribuir significativamente en los procesos de inflamación a través de la expresión y liberación de factores que influyen en el comportamiento de otros tipos celulares, particularmente aquellos involucrados en la promoción de resolución de inflamación. Los neutrófilos apoptóticos y los procesos de muerte celular ejercen efectos antiinflamatorios que han mostrado un valor terapéutico en modelos de enfermedades inflamatorias. Además, para la manipulación farmacológica de la vía apoptótica (por ejemplo, mediante el uso de inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) la adición sistémica de neutrófilos apoptóticos (hecho de apoptosis *ex vivo*) también ha mejorado la supervivencia en modelos animales de sepsis como resultado de la capacidad de unión LPS de neutrófilos apoptóticos y la eliminación subsecuente de esas células por macrófagos (Fox *et al.*, 2010).

5. JUSTIFICACIÓN

Los helmintos han generado mecanismos que modifican la activación de las diferentes células inmunes de sus hospederos y por ende su funcionalidad. De esta manera generan repuestas de tipo T cooperador 2 (TH2) (Allen y Maizels, 2011).

La habilidad de adaptabilidad de los mecanismos efectores para limitar o terminar la infección en el hospedero, depende en gran medida, de las señales recibidas de la respuesta inmune innata (Prasanphanich *et al.*, 2013). Por lo que es importante estudiar los fenotipos de las células que participan en esta primera línea de defensa, y analizar cómo son afectadas por moléculas secretadas por parásitos como los helmintos.

La respuesta inmune contra *T. crassiceps* ha dado origen a estudiar células que inician las reacciones inmunitarias como las células presentadoras de antígenos y fagocitos de origen mieloide (Reyes *et al.*, 2009), ya que parecen ser afectados consistentemente durante este tipo de infección (Becerra-Díaz y Terrazas, 2014).

Sin embargo, también es posible que las moléculas derivadas de helmintos afecten diferentes poblaciones celulares y ejerzan distintos efectos, que aún quedan por describir. Por ejemplo, el papel de los macrófagos en la modulación de la actividad de neutrófilos durante las infecciones por helmintos es poco conocida. Los neutrófilos son una población muy importante en enfermedades inflamatorias y el control de su actividad puede ser otro objetivo útil para los productos derivados de helmintos (Becerra-Díaz y Terrazas, 2014).

Del mismo modo se ha descrito el rápido reclutamiento de células mieloides supresoras *in vivo*, así como su activación 18h después de la inoculación de antígenos solubles intactos de *T. crassiceps* (iTcAg) en ratones silvestres de la cepa BALB/c (Gómez-García *et al.*, 2005).

Las MDSC tienen un papel relevante en el enlace entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Han sido estudiadas principalmente en enfermedades como

el cáncer, diversas enfermedades estériles e infecciosas. La funcionalidad de las MDSC en cada patología es variable, ya que pueden agravar las patologías o ayudar a resolverlas (Condamine y Gabrilovich, 2011; Gimeno y Barquinero, 2011).

Sin embargo, las MDSCs han sido poco evaluadas en el campo de infecciones por helmintos, por lo que observar la dinámica de las subpoblaciones que las conforman y la probable función que desempeñan desde tiempos cortos, aportarían datos relevantes para un mejor entendimiento de su biología, ya que son puntos clave donde se comienza a dar la inmunomodulación en el hospedero.

6. HIPÓTESIS

Los productos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* (TcES) reclutarán poblaciones de monocitos y neutrófilos con capacidad supresora y su reclutamiento se verá afectado por la ausencia de STAT-1 y no de STAT6 y/o IL-4R α .

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el reclutamiento y la actividad de monocitos y granulocitos en respuesta a la administración de TcES en ratones silvestres, STAT1^{-/-}, STAT6^{-/-} e IL4R α ^{-/-}.

7.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Monitorear el proceso de reclutamiento de monocitos y neutrófilos y la expresión PDL-1 durante las primeras 48h posteriores a la administración de TcES en ratones silvestres mediante citometría de flujo.
- Evaluar la capacidad supresora de monocitos (CD11b⁺Ly6C^{hi} y CD11b⁺Ly6C^{low}) y neutrófilos (CD11b⁺ Ly6C⁺Ly-6G⁺) en respuesta a la administración de TcES por ensayos de proliferación celular.
- Determinar las diferencias en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en dependencia de STAT1^{-/-}, STAT6^{-/-} e IL4R α ^{-/-} por citometría de flujo.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Infección de ratones o cisticercosis experimental

Se indujo cisticercosis experimental en ratones silvestres hembras de 5-7 semanas con 20 metacestodos de *Taenia crassiceps* (de la cepa ORF) de menos de tres milímetros y sin gemación. La inoculación se realizó vía i. p. en 0.5 mL de solución salina con jeringas de 1 mL. Los cisticercos fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones de ocho semanas de infección.

Después de la infección los ratones se alojaron en condiciones libres de patógenos durante ocho semanas en el bioterio de la FES Iztacala de acuerdo con las normas institucionales y nacionales (norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio), hasta el día del sacrificio.

8.2. Obtención de producto excretado/secretado de *Taenia crassiceps* (TcES)

Las moléculas fueron obtenidas de parásitos procedentes de ratones hembras BALB/c silvestres de 8 semanas de infección, los cuales fueron recuperados de la cavidad peritoneal de los organismos, se lavaron cuatro veces con solución salina estéril y posteriormente se sembraron en botellas de cultivo con filtro en PBS o solución fisiológica estéril en una proporción 1:2.

Los cultivos de metacestodos se mantuvieron en un periodo de 24 horas en una incubadora a 37°C con 5 % CO₂ y posteriormente se recuperó el sobrenadante, se centrifugó 10 min a 2500 rpm, se recató el sobrenadante y se descartaron los detritos.

Después se concentró y fraccionó las moléculas presentes en el sobrenadante con tubos Amicon Ultra Filter Millipore con una membrana de corte de 50 kDa, se centrifugó 30 minutos a 4500 rpm, a continuación, se recuperó la fracción >50kDa y se desechó la porción restante.

Finalmente, el TcES se diluyó con solución salina en una proporción 1:2, se adicionó 10 µL de inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich) el producto se pasó por un filtro de 0.20 µm y se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 1.5 mL para almacenarse a -70°C hasta su posterior uso.

8.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se cuantificó la concentración de proteínas del TcES por el método de Bradford (Sigma Aldrich), se colocó en una placa de 96 pozos una curva estándar de BSA de 100 µg/mL, haciendo diluciones seriadas 1:2 hasta una concentración de 1.56 µg/mL, las muestras problema se diluyeron a partir de una dilución 1:10 hasta 1:80 por duplicado. Se adicionó 100 µL de reactivo de Bradford a cada pozo, se mezcló, se determinó la absorbancia a 570nm en un lector de ELISAS (Termo Labsystem, Multiscan Ascent), se obtuvo la curva de regresión lineal y se calculó la concentración de muestras problema.

Para determinar el peso molecular (PM) y la integridad de los antígenos excretados secretados de *Taenia crassiceps* (TcES), se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS), en condiciones reductoras y no reductoras. Se colocaron 30 µg de la proteína y las muestras fueron previamente mezcladas con buffer de carga y hervidas durante cinco minutos. Finalmente se corre el gel con una carga de 90 v, 150 mA durante 90 minutos.

Se hizo una tinción de proteínas con azul de Coomassie durante 30 minutos en agitación y se elimina el colorante con solución desteñidora para poder visualizar las bandas del TcES.

8.4. Reclutamiento de células *in vivo* por TcES

8.4.1. Curva de reclutamiento celular *in vivo*

En este experimento se emplearon ratones silvestres de la cepa BALB/c, hembras de ocho semanas de edad, se formaron seis grupos experimentales. A cada grupo, excepto al grupo control se le administró 50 µg de TcES vía intraperitoneal, y se sacrificaron en diferentes tiempos post-inoculación como se muestra a continuación: ctrl, 3h, 6h, 18h, 24h, y 48h.

8.4.2. Reclutamiento de células en diferentes líneas de ratones

Se utilizaron ratones hembras de siete a ocho semanas de edad de cuatro diferentes líneas, el grupo de referencia fue la cepa silvestre BALB/c, además de ratones STAT1^{-/-}, STAT6^{-/-} UCT70 IL4Rα^{-/-}) de fondo genético BALB/c, se consideraron dos grupos experimentales por cepa: control (sin TcES) y TcES.

Se administró 50 µg de TcES vía i.p a las líneas de ratones a ser evaluados y se esperó 18 horas para tomar muestras de suero y sangre.

8.5. Obtención de suero y líquido de ascitis

Después de haber transcurrido el tiempo programado de la inoculación de TcES se tomaron muestras de sangre de los ratones a través de una incisión caudal, la cual se recuperó en tubos eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se recuperaron los sueros sanguíneos en tubos nuevos, y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso. A continuación los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂, acto seguido y en condiciones asépticas, se inyectó 1 mL de solución salina en el peritoneo, se masajeó suavemente y el mismo líquido se recuperó con ayuda de una jeringa de 1 mL, posteriormente se depositó en tubos eppendorf de 1.5 mL y se procedió a centrifugar a 2 000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se colocó en tubos eppendorf nuevos y se almacenaron a -20° C hasta su posterior uso, la pastilla restante se colectó junto con las células de exudado peritoneal.

8.6. Obtención de células de exudado peritoneal

Se introdujo 10 mL de solución fisiológica vía i.p. (Pisa), después se recuperó con una jeringa de 10 mL y se colocó en tubos de plástico estériles de 15 mL. Las células se concentraron por centrifugación a 2000 rpm durante diez minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón con un mL de medio RPMI 1650 suplementado con 10% suero bovino fetal (SFB, Gibco BRL), penicilina/estreptomicina 1X, 2 mM de glutamina y 1mM de piruvato de sodio (Biowest), se contaron las células en una cámara de Neubauer empleando la prueba de viabilidad por el método de exclusión azul Tripano.

Se ajustó el volumen y la concentración a 1×10^6 de células por mL para las pruebas correspondientes.

8.7. Citometría de flujo

Se colocaron 1×10^6 de células en tubos para análisis de citometría (BD Falcon), se centrifugaron a 2000 rpm durante diez minutos, se decantó el exceso de medio de cultivo, se resuspendió la pastilla con 50 μ L de amortiguador de FACS, enseguida se bloquearon los receptores Fc (FcR) con α CD16/32 BioLegend San Diego CA USA) y se incubaron 15 minutos a 4°C, posteriormente se agregó el conjugado de anticuerpos en un volumen de 50 μ L de amortiguador FACS (1% SBF y 0.5% azida de sodio en PBS), se homogeneizaron las muestras, se cubrieron de la luz con papel aluminio, y se incubó por 30 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo se procedió a lavar las células por lo que se agregó 1 mL de buffer de FACS, se resuspendieron las muestras y se centrifugaron 10 minutos a 2000 rpm, se decantó el sobrenadante y se volvió a resuspender, el proceso de lavado se repitió dos veces más para eliminar el exceso de anticuerpos, finalmente se fijaron las muestras con paraformaldehído al 4%, se homogenizó la muestra y se mezcló con 300 μ L de Buffer de FACS, se cubrieron con papel aluminio y se leyeron en un clitómetro de flujo Attune (Thermo Fisher Scientific). Los resultados se analizaron con el software FlowJo v. 10.

Las combinaciones de anticuerpos utilizadas en estos experimentos fueron de la marca Biolegend los siguientes:

Tinción 1: CD11b PerCP, Ly6C FITC, Ly6G PE-Cy7, CCR2 APC/Alexa, PDL1 PE.

Tinción 2: CD11b PerCP, Ly6C FITC, Ly6G PE-Cy7, TIM-3 PE, PDL1 APC.

Tinción 3: F4/80 FITC, TIM-3 PE, GAL9 APC, CD11c PE-Cy5.

8.8. Ensayo de proliferación

En un ambiente estéril se procedió a sensibilizar dos placas de 96 pozos de fondo plano con 100 μ L de α CD3 (2 μ g/mL en PBS pH 7.4 estéril), se cubrieron con parafilm y se incubaron a 4°C toda la noche. Dos horas antes de colocarse los cultivos se extrajo el bazo de ratones vírgenes hembras silvestres, se perfundieron con solución salina fisiológica en cajas Petri estériles, se recuperaron las células en tubos estériles de 15 mL y fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min., se decantó el sobrenadante y se lisaron los eritrocitos con solución hemolizante durante 10 min. a TA, después se detuvo la reacción con 7 mL de solución salina y se centrifugaron las células por 10 min. a 1500 rpm, se verificó la viabilidad por medio del método de exclusión con azul Tripano y se contaron en una cámara de Neubauer, se ajustaron a 1×10^6 células/ mL, se agregaron 1×10^5 esplenocitos por pozo en 100 μ L de medio de cultivo, se consideraron tres replicas para cada variable o condición y se esperó de 2 a 3 horas para que se activaran. Transcurrido el tiempo se vertieron las células del exudado peritoneal en tres proporciones 1:1, 2:1 y 4:1. Posteriormente los cultivos fueron incubados a 37°C con 5% de CO₂ y después de 54h aproximadamente se agregó 0.5 μ Ci/ pozo de timidina tritiada (³H-Timidina) con 20 μ L de medio de cultivo como vehículo y se volvió a incubar 18 horas más. Transcurrido la etapa de incubación de 72 horas una placa sin timidina fue congelada a -20°C para recuperar sobrenadantes y posteriormente determinar citocinas por el método de ELISA. La placa con ³H-Timidina se colocó en un cosechador de células y se recuperaron en filtros porosos, los cuales se secaron dos veces en el horno de microondas por 30 segundos, se adicionó 5 mL de líquido de centelleo. Se colocó en un cassette con

los correspondientes códigos del protocolo de lectura para timidina y se leyó en un contador de emisiones beta. Los resultados fueron obtenidos en cuentas por minuto (cpm) y fueron analizados en un software estadístico.

8.9. ELISA (sándwich)

Por medio de la técnica de ELISA-sándwich se cuantificó la concentración de las citocinas IL-10, interferón gamma (IFN- γ) y MCP-1 o CCL2 en suero, líquido de ascitis o sobrenadante de cultivo, dependiendo de las necesidades. Las citocinas detectadas se realizaron con ayuda de kits específicos para cada una, los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Pharmigen, Preprotech, BioLegend).

Placas MaxiSorp de 96 pozos fueron sensibilizadas con una solución de pegado que contenía el anticuerpo de captura en una dilución 1:200, se cubrió con una película de parafilm y se incubó toda la noche a 4°C, se lavó la placa cuatro veces con 300 μ L de buffer de lavado (0.05% de Tween 20 en PBS), para evitar la unión inespecífica y el ruido de fondo se procedió a bloquear la placa con 200 μ L de BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se lavaron las placas cuatro veces con PBS-Tween y se procedió a colocar la curva patrón de la proteína recombinante en cuestión (20 000 pg/mL) por duplicado, así como las muestras a evaluar. Las placas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente en agitación, a continuación, las placas se lavaron cuatro veces con PBS-Tween. Después se agregó 100 μ L de solución con el anticuerpo de detección en cada pozo, se incubó 1 hora a TA en agitación. Se lavó cuatro veces con buffer de lavado, se añadió 100 μ L de solución de Avidina-HRP a cada pocillo, se cubrió la placa y se incubó 30 minutos a TA en agitación. Enseguida se lavó cinco veces, para esta última etapa de lavado en cada lavado se agitó levemente de 30 a 60 segundos. Se agregó 100 μ L del sustrato TMB por pozo. Se incubó en la oscuridad de 15-30 minutos hasta que el color se comenzó a hacer evidente. Para finalizar se adicionó 100 μ L de solución de stop para detener la reacción y se procedió a leer la absorbancia, para lo cual se seleccionó el filtro 405 nm en el lector de microplacas (Multiskan Ascent Thermo Scientific).

Los resultados obtenidos fueron procesados en una hoja de cálculo en Excel, donde se realizó una gráfica concentración vs D.O. de la curva patrón, los datos obtenidos se interpolaron para poder saber la concentración en pg/mL de cada muestra problema, o solo se hizo la comparación de las densidades ópticas.

8.10. Purificación de células por Sorting

Se inocularon de cinco a ocho ratones silvestres con 50 µg de TcES vía i. p., 24 horas después fueron sacrificados, se obtuvieron las células del exudado peritoneal como se describió anteriormente y se verificó la viabilidad (azul Tripano) y se cuantificaron con un hemocitómetro. Después se ajustaron las células a 2×10^6 /mL y se procedió a realizar la tinción en buffer de separación que contenía 0.5% de BSA en PBS, los marcadores utilizados fueron CD11b, Ly-6C, Ly-6G, se consideraron los mismos tiempos de incubación empleados en una tinción de citometría normal, así como el número de lavados el cual fue realizado con el buffer de separación. La densidad de células se ajustó a 2×10^6 /mL y se procesaron en un Cell sorting FACS Aria Fusion para obtener tres poblaciones celulares; $CD11b^+Ly6C^{low}Ly-6G^+$, $CD11b^+Ly-6C^{hi}Ly6G^-$, $CD11b^+Ly-6C^{low}Ly6G^-$. Posteriormente las células fueron empleadas en un ensayo de proliferación celular, donde fueron cocultivadas con esplenocitos preactivados 2-3 horas antes con $\alpha CD3$. Las células fueron incubadas durante 72 horas. La determinación de la proliferación celular se midió a través del ensayo de incorporación de timidina tritiada.

8.11. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del software Graph Pad 6, donde se desarrolló un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con su respectiva prueba de comparaciones múltiples, la prueba de Tukey. Se consideró estadísticamente significativos valores con $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1. Curva de reclutamiento celular.

¿Qué patrón de reclutamiento celular generan los antígenos de *Taenia crassiceps*?

La inoculación de los productos excretados secretados de *T. crassiceps*, nos permitió distinguir las células que gradualmente fueron reclutadas por el estímulo de los mismos en diferentes tiempos post-inoculación y mediante la técnica de citometría de flujo se identificaron inmunofenotipos de monocitos y neutrófilos, obteniendo de esta manera una curva de reclutamiento celular como se describe a continuación.

Se pudo observar parte de la dinámica de células involucradas en este proceso de reclutamiento celular en el peritoneo de ratones inoculados con solución salina o TcES, en primer lugar se procedió a analizar la población de monocitos CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C^{low}, donde se encontró que el grupo de ratones inoculados con solución fisiológica presentó una media de \bar{x} = 7.22%, mientras que a los animales que se les suministró TcES descendió ligeramente, suceso que se mantuvo en un lapso de 24 horas post-inoculación, como se observa en los siguientes valores obtenidos; 3h \bar{x} = 3.16, 6h \bar{x} = 2.31, 18h \bar{x} = 6.89 y 24h \bar{x} = 5.46, las comparaciones realizadas entre este primer conjunto de datos no indicaron cambios significativos hasta la hora 48 cuando la media fue de \bar{x} = 32.85% (figura 5 a y b).

Por otro lado, en la subpoblación de monocitos CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C^{hi} sucedió algo similar a los monocitos Ly6C^{low} debido a que el reclutamiento fue casi imperceptible en un lapso de 24 horas, por lo que dentro de esta etapa no existieron cambios significativos sino hasta el último tiempo de monitoreo, cuando llegó a un punto máximo de \bar{x} = 10.05% en la hora 48 (figura 5 a y c).

Finalmente, la población de neutrófilos CD11b⁺ Ly-6G⁺ Ly-6C⁺ muestran datos con diferencias significativas respecto al control a partir de las tres horas post-inoculación, con una media aproximada al \bar{x} = 63.66%, porcentaje que disminuyó

ligeramente a las 6h \bar{x} = 60.55% y después comenzó un descenso gradual en los subsecuentes tiempos; 18h (\bar{x} = 26.7%), 24h (\bar{x} = 24.53%) y 48h (\bar{x} = 14.84%). Los cambios detectados en esta población de células nos indicaron diferencias estadísticas significativas cuando se comparó el grupo control con los porcentajes a las tres y seis horas, mientras que en el periodo de 16 a 24 horas hubo una ligera diferencia que a las 48 horas no existe, ya que esta población pareció regresar a su estado inicial (figura 5 c).

Estos resultados nos indican que el reclutamiento de los monocitos es pausado, debido a que se notaron las diferencias hasta el último momento de monitoreo, sin embargo, el reclutamiento de los neutrófilos se produce de forma temprana y presenta un descenso gradual.

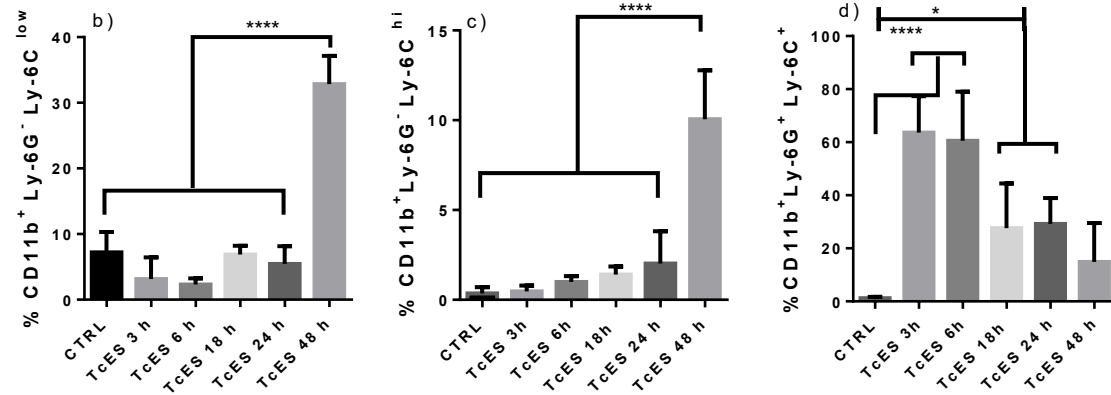
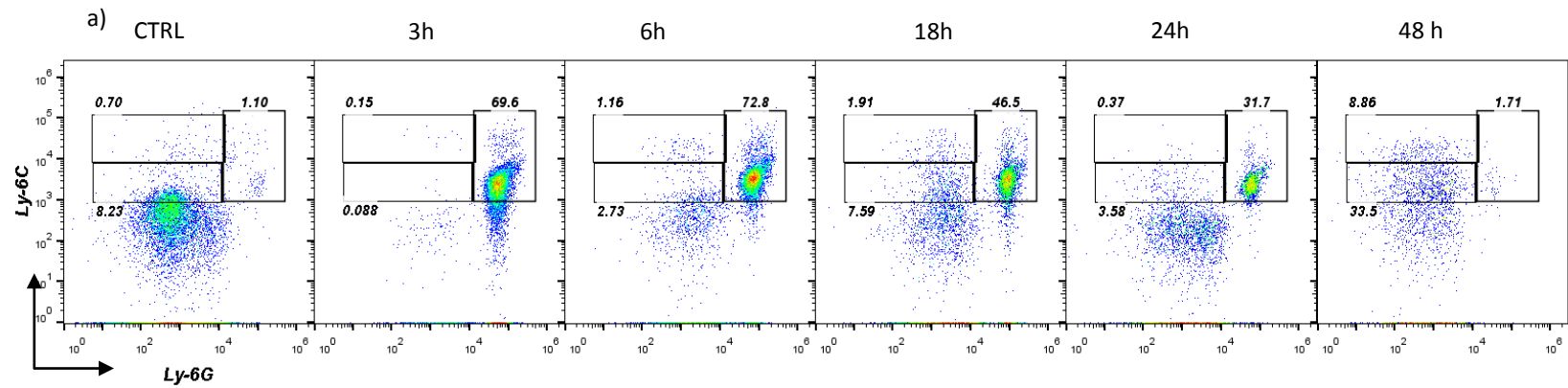


Figura 5. Dot plots representativos de monitoreo una curva de reclutamiento celular en el peritoneo a través del tiempo después de una inyección i. p. de TcES en ratones silvestres. En las imágenes se contraponen Ly6G vs Ly6C y se distinguen tres subpoblaciones celulares (a). Gráficas de medias porcentaje de células del exudado peritoneal CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C^{low} (b), CD11b⁺ Ly-6G⁻ Ly-6C^{hi} (c) y CD11b⁺ Ly-6G⁺ Ly-6C⁺ (d).

9.1.1. Expresión de moléculas de supresión celular

Previamente ha sido descrito que las células mieloides supresoras (MDSC) tienen la capacidad de suprimir diferentes células, aunque su blanco principal son los linfocitos T. Se desconoce si los TcES pueden inducir la expresión de moléculas supresoras como son los PDL's, por lo que se analizó la expresión de PDL1 en las poblaciones de monocitos y granulocitos, por medio de citometría de flujo.

Para la obtención de los siguientes datos se siguió una estrategia de análisis en el software flowjo v X: en el plot principal, fsc (tamaño) contra ssc (complejidad), se realizó una región que abarcó a monocitos y granulocitos, a partir de la cual se derivó un segundo plot donde se representó en el gráfico CD11b contra complejidad, se seleccionó las células CD11b⁺ y se graficó PDL-1 contra complejidad, se eligieron las células PDL-1⁺ y finalmente se representó en los plots la expresión de Ly6G vs Ly6C (figura 6). El análisis desarrollado involucró la proporción de células que expresaron Ly6C sin hacer distinción entre las subpoblaciones Ly6C^{low} y Ly6C^{hi} anteriormente identificadas.

Los resultados obtenidos nos indicaron diferencias en cada una de las poblaciones de células.

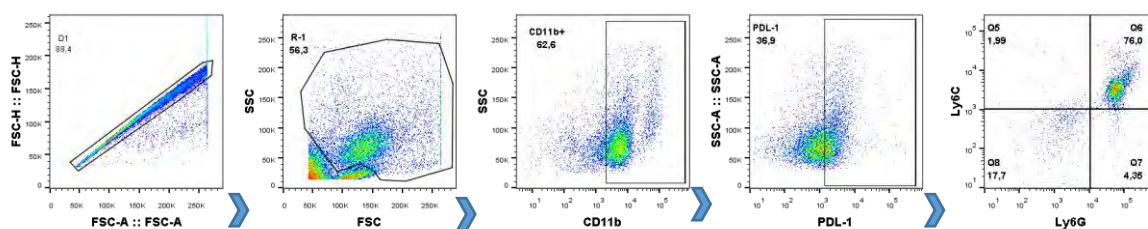


Figura 6. Estrategia empleada en el análisis de las lecturas obtenidas del citómetro de flujo para la detección de PDL-1 en monocitos y granulocitos en células peritoneales.

En las células CD11b⁺PDL-1⁺Ly6C⁺Ly6G⁻ hubo ligeros cambios durante las primeras 24 horas post inoculación. Se pudo observar que a las tres y seis horas post-inoculación hubo un ligero descenso respecto al grupo control (Control \bar{x} =6.5, 3h \bar{x} =1.24 y 6h \bar{x} =3.25), posteriormente a las 18 y 24h post-inoculación esta

población celular se restablece (18h \bar{x} =8.34 y 24h \bar{x} =7.98). No obstante, a las 48 horas post inoculación (48h \bar{x} =45.72) se pudo observar un evidente y marcado incremento de esta población celular lo que indicó diferencias estadísticas significativas respecto a los demás grupos experimentales (figura 7 b).

La proporción de la población de células correspondiente a los marcadores CD11b⁺ PDL-1⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁺ presentó diferencias significativas desde las primeras tres horas respecto al grupo control, y se mantuvo durante un período de 24 horas (Control \bar{x} =1.06, 3h \bar{x} =70.95, 6h \bar{x} =70.83, 18h \bar{x} =47.5, 24h \bar{x} =28.3%). Así mismo se observó un patrón de descenso gradual en este grupo de células que concluyó a las 48h cuando se presentó un porcentaje de \bar{x} =1.3%, valor similar al reportado en el grupo control (figura 7 c).

En las células con marcadores CD11b⁺ PDL-1⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁻, se encontró solo una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (\bar{x} =2.13%) y correspondió al grupo de ratones monitoreado tras las primeras tres horas post-inoculación de los productos TcES \bar{x} =41.3%. La diferencia significativa se mantuvo cuando se comparó con las medias de los demás grupos ya que los porcentajes resultantes fueron los siguientes: 6h \bar{x} =7.61%, 18h \bar{x} =13.15%, 24h \bar{x} =6.54% y 48h \bar{x} =1.86% (figura 7 d).

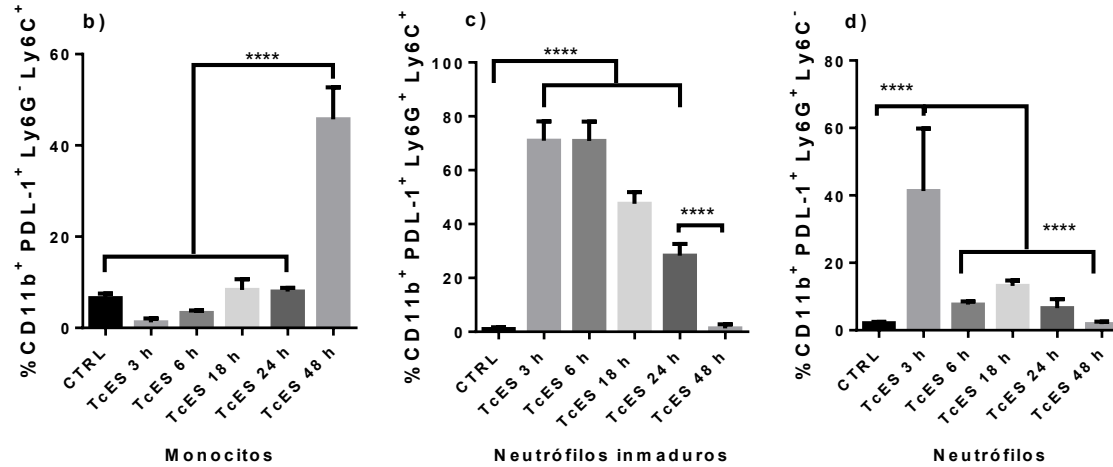
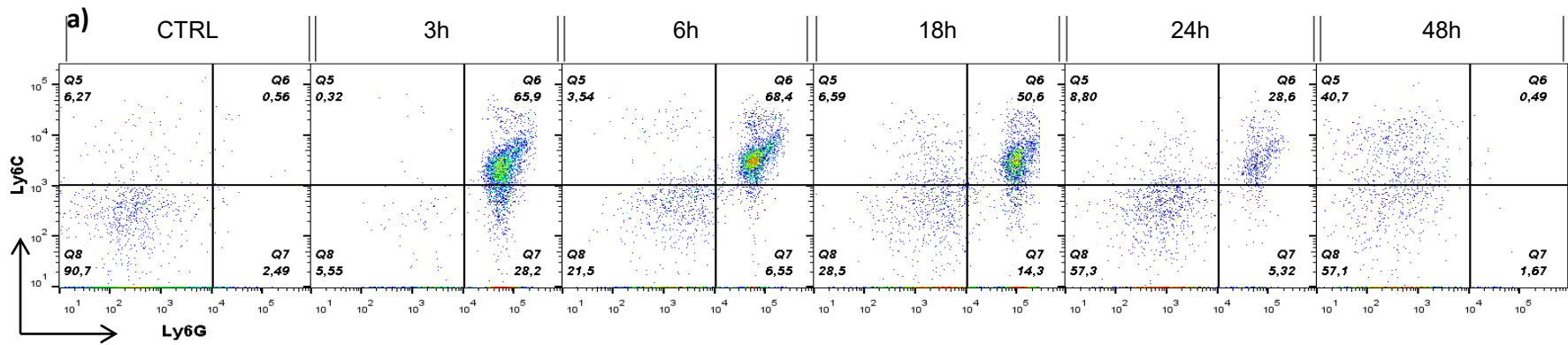


Figura 7. Dot plots representativo de un análisis de citometría de flujo estos datos corresponden a una curva de reclutamiento de monocitos y granulocitos. Los plots fueron resultado de la selección de una región que incluyó monocitos y granulocitos en el plot principal de tamaño vs granularidad, de la cual se derivó un plot secundario (granularidad vs CD11b) donde se seleccionaron las células CD11b⁺, se prosiguió con la selección de las células PDL-1⁺ del plot granularidad vs PDL-1, del que finalmente se derivó el plot a) Ly6G vs Ly6C. Se graficaron las medias porcentuales de tres poblaciones celulares identificadas a partir de la expresión de Ly6G y Ly6C. b) Media porcentual de células CD11b⁺PDL-1⁺Ly-6G⁻Ly6C⁺, c) CD11b⁺PDL-1⁺Ly-6G⁺Ly6C⁺ y d) CD11b⁺PDL-1⁺Ly-6G⁺Ly6C⁻.

9.1.2. Monocitos y Granulocitos en torrente sanguíneo

Se sabe que en el torrente sanguíneo se encuentran diferentes poblaciones de leucocitos, que pueden extravasar y migrar hacia algún sitio de infección o daño. Para evaluar si las células presentes en el peritoneo eran reclutadas del torrente sanguíneo, se evaluó en circulación las diferentes poblaciones de MDSC.

Al realizar el análisis de la citometría en células sanguíneas, se observó que en condiciones basales la población $CD11b^+ Ly6G^- Ly-6C^{low}$ represento una proporción de $\bar{x}= 8.83\%$, la cual disminuye drásticamente dentro de las primeras 18h post-inoculación como se muestra a continuación 3h $\bar{x}= 1.23\%$, 6h $\bar{x}= 1.83\%$ y 18h $\bar{x}= 2.77\%$, eventualmente se incrementa el porcentaje a las 24h $\bar{x}= 7.9\%$, que a las 48 h desciende ligeramente $\bar{x}= 4.64 \%$, de tal forma que se distinguen diferencias significativas al comparar el grupo control vs (3h, 6h y 18h) y 24h vs (3h, 6h y 18h) (figura 8 a y b).

En cuanto a los monocitos $CD11b^+ Ly6G^- Ly-6C^{hi}$ se observaron diferencias que duraron poco tiempo, y estas se hicieron evidentes en las primeras tres horas post-inoculación, al incrementar la población, tal y como lo vemos al comparar los valores del grupo ctrl $\bar{x}= 1.64\%$ vs 3h $\bar{x}= 7.62\%$, posteriormente hay un descenso en los grupos 6h $\bar{x}= 1.89$ y 18h $\bar{x}= 1.98$, valores que podrían indicarnos que las células regresan a su estado basal si no se hubiesen registrado cambios a las 24h $\bar{x}= 7.22$ y 48h $\bar{x}= 5.47$ ver figura 8 a y c.

Los neutrófilos constituyeron la población más abundante en el torrente sanguíneo ya que en el grupo control hubo una media aproximada de $\bar{x}= 78.3 \%$, la cual se incrementó después de la inyección de TcES a un $\bar{x}= 90$ y $\bar{x}= 92.11\%$ a las 3 y 6 h respectivamente, más tarde, a las 18 horas la densidad de células regreso a la normalidad al registrarse una media de $\bar{x}= 76.33\%$, punto a partir del cual se registraron cambios discretos y sin diferencias significativas (24 $\bar{x}=82.34$, 48h $\bar{x}= 82.07$) (figura 8. d).

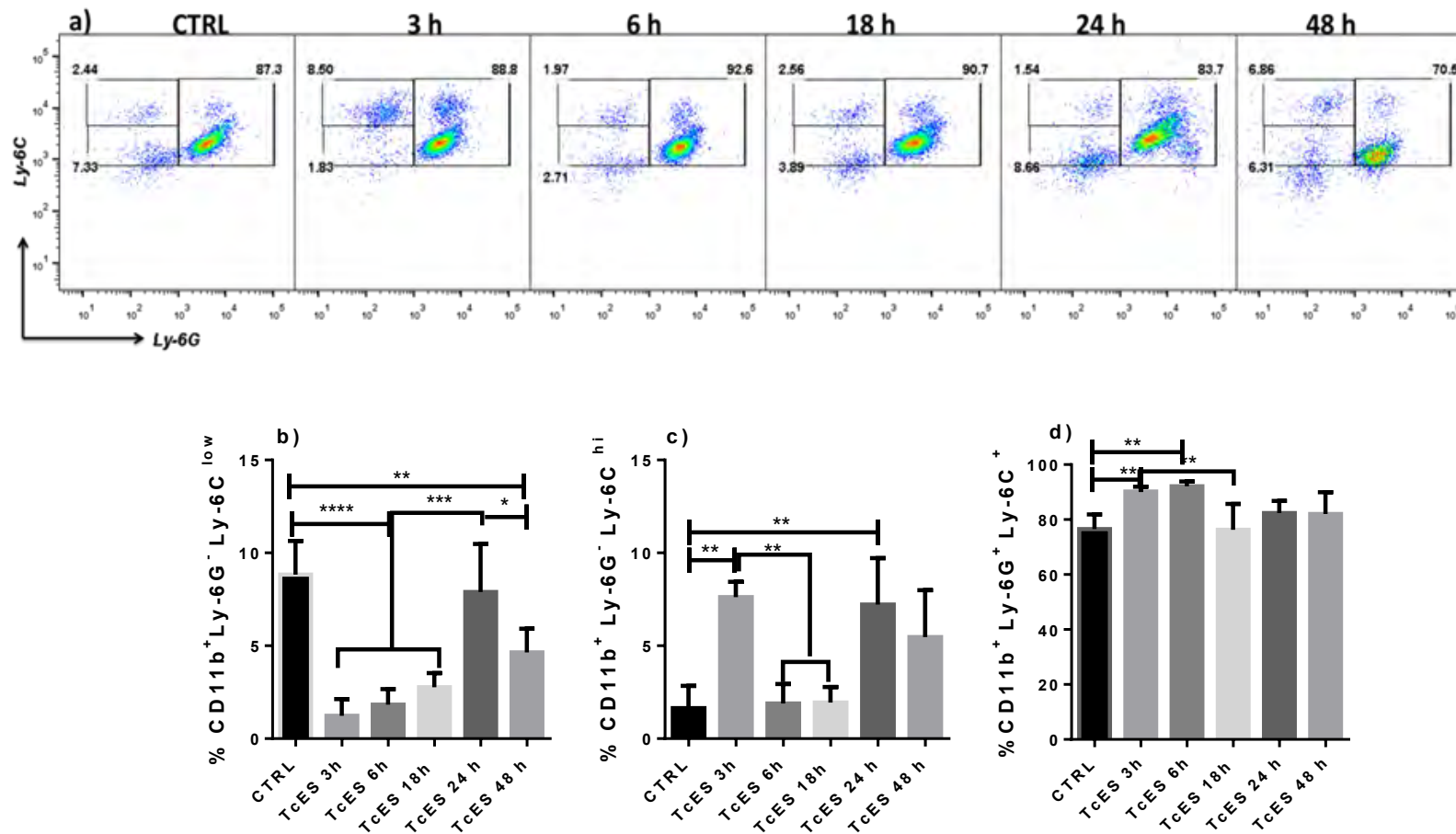


Figura 8. A) Dot plots representativos de porcentajes de monocitos y granulocitos en sangre en diferentes tiempos después de la inoculación intraperitoneal de los productos TcES, los plots provienen de una región que incluye tanto a monocitos y granulocitos en un plot principal de tamaño vs granularidad, de la cual se derivó un plot secundario (granularidad vs CD11b) donde se seleccionaron las células CD11b⁺, población de células de la cual se generó el plot Ly6G vs Ly6C. Los resultados presentes corresponden a dos experimentos independientes y representan la media porcentual de monocitos CD11b⁺Ly-6G⁻Ly-6C^{low} b), CD11b⁺Ly-6G⁻Ly-6C^{hi} c) y %CD11b⁺Ly-6G⁺Ly-6C⁺ d).

9.1.3. Capacidad de las MDSC en suprimir la proliferación del linfocito T

¿Las células presentes en los diferentes tiempos tienen un efecto supresor?

Aunado al análisis de expresión de PDL-1 en las células reclutadas por los productos TcES, se comprobó si tenían función supresora, por lo que se realizó un ensayo de funcionalidad *in vitro* de proliferación, donde se emplearon esplenocitos estimulados con α CD3 y después de un periodo de activación mínimo de tres horas se procedió a distribuir la proporción 1:4 de células mieloides supresoras reclutadas en diferentes tiempos, 72h después de la etapa de cultivo, se recuperaron las células que incorporaron 3 H-timidina y se graficaron las cuentas por minuto (cpm).

En los resultados obtenidos de este ensayo se observó variabilidad en la proliferación de cada uno de los grupos experimentales, como se explica a continuación; los controles colocados como referencia de una óptima proliferación “esplenocitos+ α CD3” alcanzó \bar{x} = 85230.5 cpm, una cantidad similar se observó en el grupo “esplenocitos+ α CD3+ MDSC control” ya que el valor fue de \bar{x} = 81618.8 cpm, tomando como referencia los datos anteriores, al realizar la comparación con los datos del cocultivo que contenía células reclutadas después de 3 horas, se encontró que estas no tienen efecto supresor, ya que en este punto los linfocitos T proliferaron aún más que los controles \bar{x} = 110690. Sin embargo, a partir de la sexta hora se nota una tendencia a disminuir la proliferación, aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa respecto a los controles. Aunado a lo anterior y de forma interesante, las MDSC que fueron reclutándose por los TcES en un lapso de 18h post-inoculación adquieren la capacidad de suprimir la proliferación del linfocito T, este evento se repitió con los cocultivos de 24 y 48 horas al registrarse un bajo número de cuentas por minuto, como se muestra a continuación: 18h (\bar{x} = 20), 24h (\bar{x} = 12738.7) y 48h (\bar{x} = 38 cpm) (figura 9).

La baja capacidad supresora de las células mieloides que llegaron en las horas iniciales de esta curva de reclutamiento se podría asociar a la población celular más abundante en esos momentos, los granulocitos, que a pesar de expresar PDL1, la supresión de los esplenocitos activados es ineficiente, aunque este proceso mejora detrás del descenso en la densidad de los neutrófilos a partir de la sexta hora y el paulatino arribo de ambas subpoblaciones de monocitos PDL1⁺ a partir de la hora 18, cuando se observó una mejor capacidad de reacción supresora, proceso que se conservó con células reclutadas hasta el último momento de este análisis, en la hora 48.

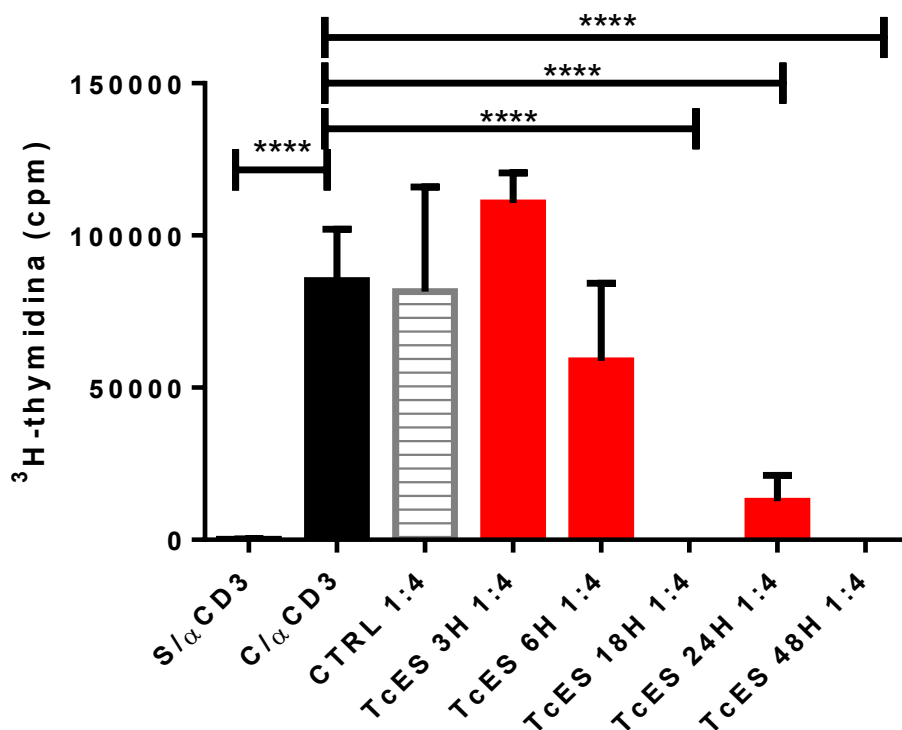


Figura 9. Ensayo de proliferación correspondiente a un co-cultivo de linfocitos T preactivados con anti-CD3 con su respectiva proporción 1:4 de células totales de exudado peritoneal provenientes de ratones inoculados con TcES y sacrificados a las 0, 3, 6, 18, 24 y 48 h. Los valores graficados representan cuentas por minuto (cpm).

9.1.4. Separación de las diferentes subpoblaciones de MDSC y su actividad supresora

¿La capacidad supresora de las células reclutadas por los TcES es un efecto sinérgico o depende de solo una población celular?

Establecido el tiempo óptimo donde tanto granulocitos y monocitos convergieron y en el que probablemente podrían tener un papel supresor importante, se realizó un cell sorting, donde se logró separar tres poblaciones celulares con ayuda de los marcadores que distinguen a las células mieloides supresoras, para lo que se emplearon anticuerpos anti-CD11b, Ly-6C y Ly-6G, se seleccionó el área de las regiones celulares más apropiada a la morfología y la intensidad de fluorescencia que emitían las MDSC (Fig. 6 a y b). Al finalizar la pureza obtenida para cada grupo celular fue: monocitos CD11b⁺ Ly-6C^{hi} Ly-6G⁻ (90%), CD11b⁺ Ly-6C^{low} Ly-6G⁻ (76.2%) y neutrófilos CD11b⁺ Ly-6C⁻ Ly-6G⁺ (99%) (figura 10 c).

Con las células recuperadas del proceso de separación se realizó un ensayo de proliferación *in vitro*, donde se pudo observar que en control negativo “esplenocitos sin α CD3” no existió proliferación (\bar{x} = 372.75 cpm), mientras que en el control positivo “esplenocitos+ α CD3” se halló (\bar{x} = 79165.5 cpm), estos datos indicaron una excelente respuesta en la activación de las células estimuladas con α CD3 además este último dato concordó con los resultados de los cultivos donde se incluyeron células del exudado peritoneal de los roedores control, debido a que se obtuvo un promedio de \bar{x} = 76622.8 cpm. Después se examinó el efecto de las MDSC que llegaron en la hora 24, y en el resultado se observa que inhibieron la proliferación eficientemente, dado que las cuentas por minuto fueron menores (\bar{x} = 16785.3), una diferencia significativa respecto a los controles (figura 10 d).

Sin embargo, cuando se separó este grupo de células heterogéneas, su capacidad supresora cambió en diferentes grados, como es el caso de la subpoblación CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁻, responsable de una importante reducción en el crecimiento de los esplenocitos (\bar{x} = 26511cpm), mientras que los monocitos CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻ fueron menos efectivos (\bar{x} = 40033.5 cpm) y finalmente la

población que tuvo la menor capacidad para inhibir la proliferación recayó en los granulocitos CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁺ \bar{x} = 50215.5 cpm como podemos observar en la figura 10 d.

Para comprobar las interpretaciones de los números obtenidos, se procedió a analizarlos estadísticamente, lo cual derivó en el hallazgo de diferencias significativas en cada uno de los cultivos realizados, tanto con células totales (MDSC) que tuvieron contacto con los TcES durante 24 horas, como con las dos subpoblaciones de monocitos y neutrófilos por separado.

Sin embargo, cuando se confrontó los efectos que causaron directamente cada una de las poblaciones celulares por separado frente a células tratadas con TcES, se identificaron dos diferencias en la comparación de células TcES vs. Ly6C^{hi} y TcES vs. Ly6G, donde se puede interpretar que las MDSC suprimieron mejor que los monocitos y granulocitos por separado, aunque no hubo diferencia significativa en la relación TcES vs. Ly6C^{low}, debido a que los valores obtenidos de ambos grupos coincidieron en un rango establecido por la desviación estándar de los datos recopilados.

De estos datos se podría desprender que a pesar de las diferencias significativas que existen entre las células mieloides supresoras reclutadas por los productos de *T. crassiceps*, ya sea en conjunto o de forma individual, pueden neutralizar la proliferación desde un 37% hasta un 80%, aunque la mejor eficiencia se obtiene cuando estas subpoblaciones actúan de forma sinérgica, debido a que consuman su función supresora con más intensidad.

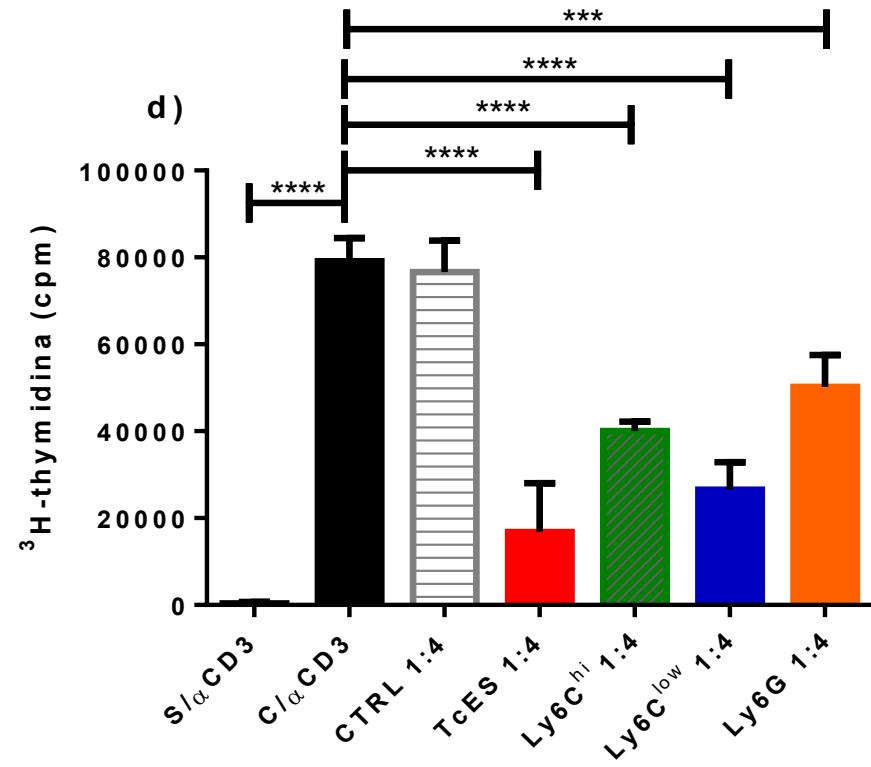
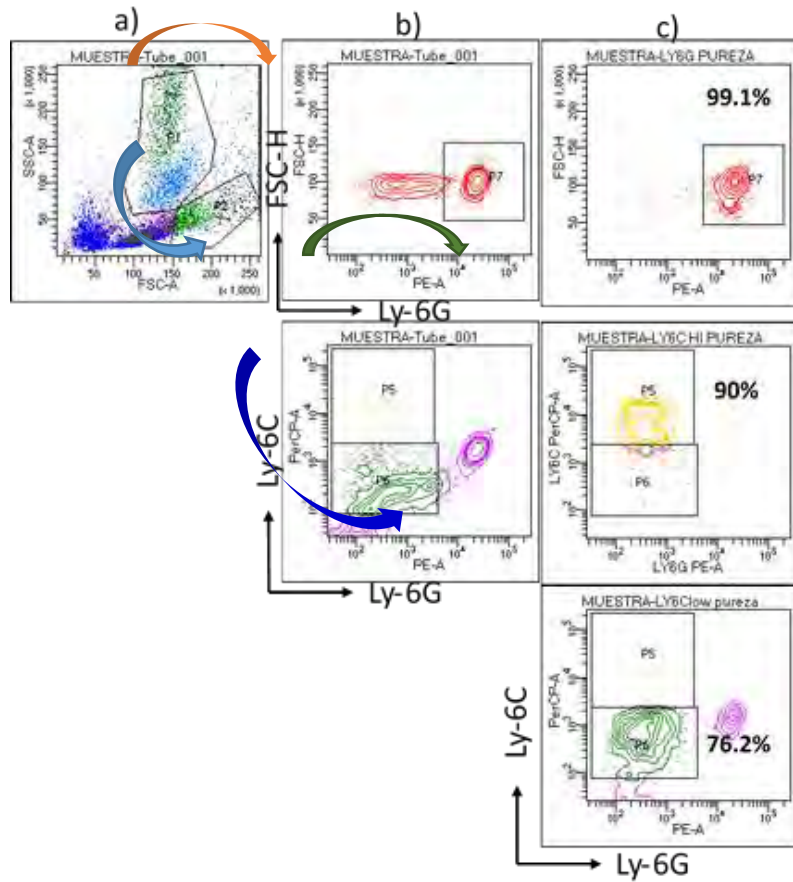


Figura 10. Estrategia utilizada en cell sorting, **a)** Selección de las dos poblaciones principales de células determinado por sus características morfológicas de tamaño (FSC-A) contra complejidad/ granularidad (SSC-A), de tal modo que la región P1 corresponde a las células granulocíticas, mientras que la región P2 a la de monocitos. A partir de las regiones anteriores se seleccionó a las células **b)** (P1), CD11b+ Ly-6G+ Ly-6C^{neg} (neutrófilos) y las células CD11b+Ly6G^{hi}Ly6C^{low} (P6) y CD11b+Ly6G^{hi}Ly6C^{hi} (P5), (dos subpoblaciones de monocitos). **c)** Pureza de las correspondientes células separadas por cell sorting. **d)** Gráfico de cocultivo de linfocitos T preactivados con anti-CD3+ células totales y células procesadas por cell sorting, 24h de haberse inoculado con TcES.

9.1.5. Producción de citocinas y quimiocinas inducidas por los TcES necesarias para el reclutamiento de monocitos.

¿Existirá diferencia en la producción de MCP-1, IFN- γ e IL-10 en presencia de productos TcES?

Para el reclutamiento de las diferentes poblaciones celulares, así como su activación y consecuente función efectora es importante la producción tanto de citocinas como de quimiocinas. Aquí se cuantificó la producción de MCP-1, IFN- γ e IL-10 en muestras de suero, líquido de ascitis y sobrenadantes de cultivo de los ratones inoculados con los TcES a diferentes tiempos, la determinación en la concentración se realizó mediante la técnica de ELISA-Sándwich.

La población de células mieloides supresoras es heterogénea, y dada esta naturaleza podemos hallar monocitos como uno de sus componentes, los cuales son reclutados por MCP-1, al indicar la localización del daño y marca la ruta a donde son requeridos, razón por lo que se decidió monitorearla en un primer momento en el área anatómica donde tuvo efecto los productos de *T. crassiceps*, el peritoneo, lugar del que se obtuvo el líquido de ascitis, muestra problema que nos indicaría la concentración *in situ*.

En un inicio la cantidad de CCL2 en el peritoneo es nula en el grupo control, sin embargo, en los ratones inoculados con TcES hubo producción de MCP-1 en cada tiempo donde se muestreo el líquido de ascitis, no obstante, a pesar de los cambios detectados en cada grupo, las diferencias significativas no residieron en todas, sino únicamente en dos tiempos, el primero identificado a la hora 3, cuando la concentración fue de \bar{x} = 943.8 pg/mL y el segundo a las 24 horas donde la media se instauró en \bar{x} = 511.611 pg/mL. La alternancia a través del tiempo donde tuvo lugar el repunte de esta quimiocina podría indicar un relapso por parte del sistema inmune, aunque en una menor concentración que a las 3h (Fig. 11 a).

Por otro lado, la concentración de esta misma citocina en suero solo fue medida cualitativamente, por lo que se reportaron los datos en D.O., con lo que se pudo

observar un comportamiento análogo al que se llevó en el peritoneo, aunque en circulación ocurrió en tiempos diferentes, de tal manera que en el tiempo cero o control en la sangre se cuantificó $\bar{x}=0.6135$, esta concentración cambio después de inocularse los TcES, por lo que en la tercera hora se encontró $\bar{x}= 0.7075$, posteriormente hallamos el primer pico a la sexta hora post-inoculación $\bar{x}=0.9781$, tiempo a partir del cual se ocurre un ligero descenso, como se observa en las 18 horas $\bar{x}=0.8105$, el cual continuó hasta la hora 24 $\bar{x}=0.5028$, y a continuación se presentó un segundo pico o relapso a las 48 horas $\bar{x}=0.917$ (figura 11 b). Las diferencias significativas se encontraron donde la concentración era mayor.

En algunas investigaciones la producción de IFN- γ se ha asociado con la inducción de la expresión de la molécula PDL1, por tal motivo, se decidió medir si los TcES podrían inducir la producción de IFN- γ en el peritoneo de manera temprana para la expresión de PDL1 en las MDSC. Los resultados de la cuantificación en el líquido de ascitis nos indicaron que esta proteína se incrementó en presencia de los TcES durante las primeras 6h post-inoculación, como se muestra a continuación (ctrl. $\bar{x}= 326.25$ pg/mL; 3h $\bar{x}= 2\ 868.54$ pg/mL y 6h $\bar{x}= 2\ 960.21$ pg/mL), no obstante, se observó que después de las 18 h la producción disminuye a $\bar{x}= 281.042$ pg/mL, aunque 24h después se detectó un incremento ($\bar{x}= 3242.5$ pg/mL), aunque pasando en el grupo de 48h vuelve a disminuir ($\bar{x}= 272.708$ pg/mL). Con base a estos resultados se practicó el correspondiente análisis estadístico, el cual nos confirmó que las diferencias significativas estuvieron en los puntos con una mayor concentración de esta proteína a las tres, seis y 18 horas post-inoculación.

Otra citocina que fue determinada en este trabajo fue IL-10, la cual fue medida en los sobrenadantes de los cocultivos. Esto con la finalidad de determinar si a parte de PDL1 como molécula supresora de la proliferación de los linfocitos T, otros factores producidos por las MDSC como esta citocina antiinflamatoria era producida para contrarrestar la proliferación de linfocitos T como se observa en la figura 11 d.

Finalmente, para determinar si además de PDL1 como molécula supresora de la proliferación de linfocitos T, y si existían otros productos generados por las MDSC que pudiesen estar involucrados en el fenómeno de la supresión, se cuantificó la IL-10 en sobrenadantes procedentes del cocultivo de esplenocitos con MDSC de diferentes tiempos de colecta de células. En los resultados se pudo observar diferencias en cada uno de los tiempos, y al analizar la presencia de esta interleucina en los pozos de células vírgenes y no activados, se puede observar la ausencia, no obstante cuando las células mieloides supresoras se agregaron en el cocultivo, se observó una ligera tendencia a incrementar en las primeras seis horas $\bar{x}=171.1$ pg/mL, $\bar{x}=210$ pg/mL $\bar{x}=151.6$ pg/mL, y posteriormente regresa a su estado basal en la hora 18, aunque este descenso no duro mucho tiempo, ya que las células de 24 y 48 horas secretaron una mayor cantidad de IL-10 $\bar{x}=858.3$ y $\bar{x}=395$ pg/mL respectivamente, puntos donde se detectaron las diferencias significativas.

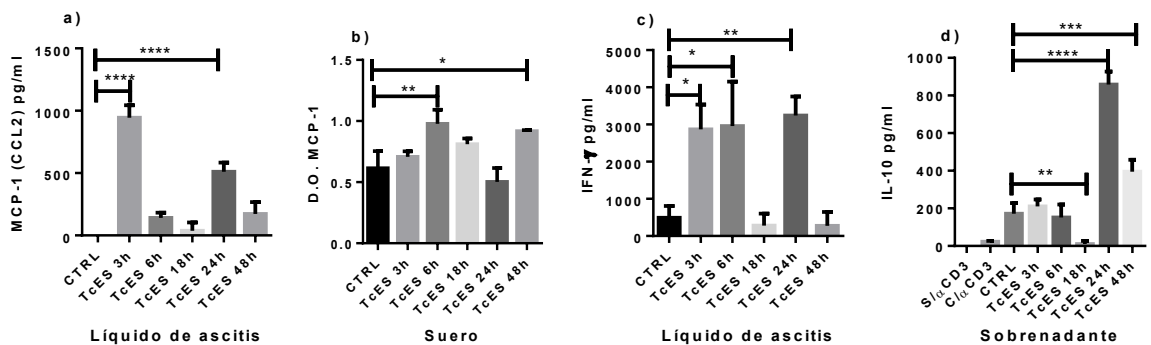


Figura 11. Gráfica de concentración de citocinas en diferentes tiempos post-inoculación de TcES, pg/mL de MCP-1 en líquido de ascitis a), densidad óptica (D.O.) de MCP-1 en suero b) Concentración de IFN- γ en líquido de ascitis c) Niveles de IL-10 en pg/mL en sobrenadantes de cocultivos de esplenocitos +MDSC de ratones inoculados con TcES y sacrificados a diferentes tiempos d).

9.2. ¿El reclutamiento de las MDSC se verá afectado en ausencia de STAT-1, STAT-6 y/o IL-4R α ?

¿Las vías de señalización STAT-1, STAT-6 y/o IL-4R α son indispensables para el reclutamiento de las MDSC por los TcES?

Tomando en cuenta los datos generados en el proceso de reclutamiento celular por los productos TcES que se inocularon en la cavidad peritoneal de ratones silvestres (BALB/c). Se diseñó un experimento donde tres líneas de ratones deficientes en STAT-1^{-/-}, STAT-6^{-/-} o IL-4R α ^{-/-}, de fondo BALB/c, fueron inoculados con los antígenos de *Taenia crassiceps*, cada cepa con su respectivo control, y 18h después se extrajo las MDSC, el reclutamiento de con cada grupo experimental fue comparado después de un análisis de citometría de flujo.

El número de células recuperadas por individuo en este único lapso de tiempo fue homogéneo al comparar los valores de los ratones control de las cuatro líneas evaluadas, ya que las células identificadas como CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁻, representan del 0.8 a 1.1 % cuando no existe estímulo. Sin embargo, en los organismos inoculados con TcES se reportó un incremento en la proporción de estas células que no rebasó el 10 %.

Los especímenes que reclutaron una mayor proporción de estas células correspondieron a los ratones silvestres y a los deficientes en STAT1 al presentar \bar{x} =3.63% y \bar{x} =4.12% respectivamente, medias que cuando fueron comparadas en el análisis estadístico se descartó una diferencia significativa entre estos dos grupos. Este resultado se repitió cuando se comparó contra los valores de los roedores deficientes en STAT6^{-/-} y IL-4R α ^{-/-}, ya que se reportó una media de \bar{x} =2.74 a 2.9% respectivamente. A pesar de que se pudo observar ligeras diferencias entre estos grupos, no fueron suficientes para ser estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando se realizó la comparación respecto a los grupos control, solo se identificó diferencias en los organismos silvestres y STAT1^{-/-} inoculados con los productos de *T. crassiceps*.

La subpoblación de monocitos identificada como $CD11b^+Ly6C^{hi}Ly6G^-$ resulto ser la menos abundante al no rebasar 1.4% de células, los animales controles de cada grupo experimental mantuvieron valores homogéneos cuando se les inoculo PBS o solución salina, se reportaron medias $\bar{x}= 0.08$ a 0.22%, en tanto que al grupo al que se le inyectaron los productos excretados secretados reclutaron $\bar{x}= 0.79\%$ en el grupo control de la cepa silvestre, $\bar{x}= 0.26\%$ en los $STAT1^{-/-}$ y $\bar{x}= 0.65\%$ tanto en $STAT6^{-/-}$ como en $IL4R\alpha^{-/-}$. Con base a estos resultados se puede inferir que en tres grupos no existieron diferencias significativas, aunque en este grupo celular en particular se hizo notar la casi total ausencia en los roedores deficientes en STAT1 (figura 12 c).

La población de neutrófilos, aquí caracterizada como $CD11b^+Ly6C^+Ly6G^+$ fue la que tuvo mayor presencia, el grupo inoculado con PBS no reportó cambios, prueba de que no existió elemento alguno para que la movilización de estas células hacia la cavidad peritoneal se llevara a cabo, mientras que los individuos inoculados con TcES mostraron un sustancial reclutamiento en el peritoneo de tal manera que en ratones silvestres se obtuvo un $\bar{x}=11.91\%$, $STAT1^{-/-}$ $\bar{x}=22.93\%$, $STAT6^{-/-}$ $\bar{x}=6.26\%$ y $IL4R\alpha$ $\bar{x}=5.91\%$, valores que implican cambios considerables al ser analizados, ya que en el grupo control contra el cual fueron comparados los otros grupos experimentales, indicaron diferencias significativas al confrontar los datos obtenidos contra $STAT-1^{-/-}$ y $STAT-6^{-/-}$.

Interesantemente, la ausencia de STAT-1 favorece el incremento de los neutrófilos en la cavidad peritoneal, en contraste la ausencia de STAT-6 o de $IL4R\alpha$ disminuyeron el arribo de los neutrófilos en cavidad peritoneal, también la ausencia de STAT-1 podría afectar el reclutamiento de monocitos $CD11b^+Ly6C^{hi}Ly6G^-$, no obstante, la ausencia de STAT-6 o $IL4R\alpha$ no alteró el reclutamiento de ambas subpoblaciones de monocitos al peritoneo.

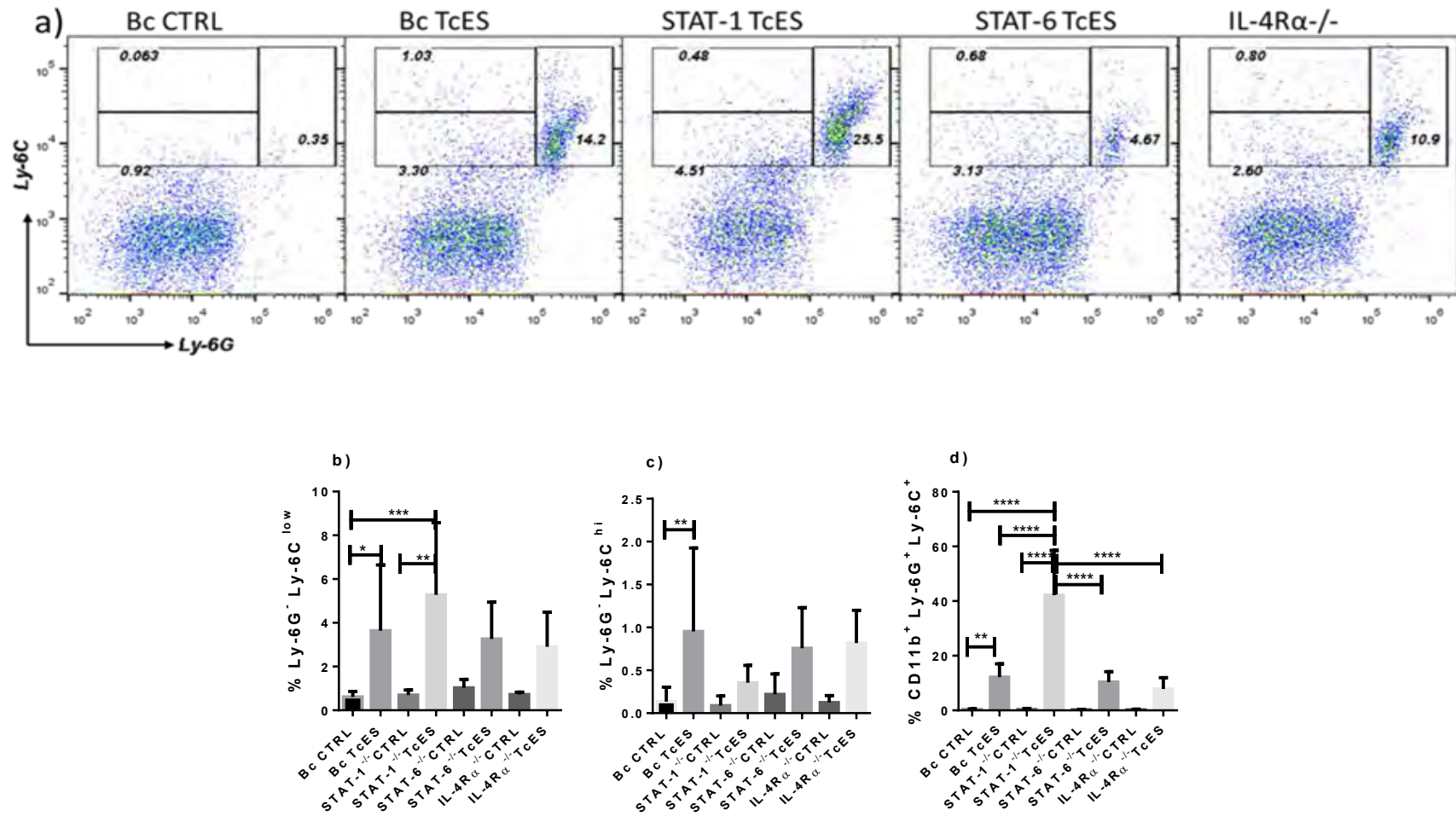


Figura 12. Dot-plots representativos de porcentajes de células de exudado peritoneal en ratones silvestres y deficientes de STAT1^{-/-}, STAT6^{-/-} o IL-4R α ^{-/-} a las 18h post inoculación de TcES a). Gráficos de medias porcentuales de tres subpoblaciones que componen las MDSC en cuatro líneas ratones b) CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{low} (monocitos), c) CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi} (monocitos) y d) CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁺ (neutrófilos).

9.2.1. Expresión de PDL-1 en células CD11b⁺ en ausencia de STAT-1, STAT-6 Y IL4-R α

Para poder analizar la expresión de PDL-1 en las células en ratones deficientes en STAT-1, STAT-6 y IL4-R α se siguió la estrategia de análisis previamente descrita en la expresión de ésta molécula en monocitos y granulocitos de la curva de reclutamiento celular en ratones silvestre. Pero la dificultad para poder diferenciar completamente la proporción de PDL-1 en cada una de las tres subpoblaciones identificadas solo permitió observar las diferencias entre las células CD11b⁺.

En las cuatro líneas de ratones hubo homogeneidad en la expresión de PDL-1 en las células CD11b⁺ en condiciones basales, aunque se hallaron diferencias después de la inoculación de los TcES.

Después de comparar los porcentajes obtenidos del grupo experimental correspondiente a los animales silvestres se observó una ligera tendencia a incrementar la expresión de PDL-1 en células CD11b⁺ a las 18 horas post-inoculación. Sin embargo, el rango de la desviación estándar fue muy amplio por lo que ésta diferencia no fue significativa.

Por otro lado, las células CD11b⁺ provenientes de ratones deficientes en STAT1 y STAT6, que fueron inoculados con los TcES, 18 horas antes, redujeron la cantidad de PDL-1. Las diferencias entre las proporciones de células PDL-1⁺ fueron estadísticamente significativas cuando se compararon con su respectivo grupo control. Así mismo estos contrastes se hicieron más notables cuando se confrontó con el grupo silvestre inyectado con TcES.

Finalmente, en las células CD11b⁺ de ratones carentes de IL-4R α que fueron inoculados con productos derivados de *T. crassiceps* hubo ligeros cambios en la expresión de PDL-1, pero sin diferencias significativas respecto a su grupo control y respecto al grupo de ratones silvestres inoculados con TcES (figura 13).

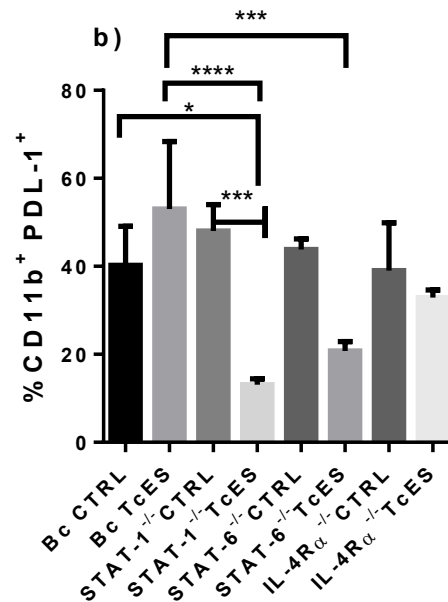
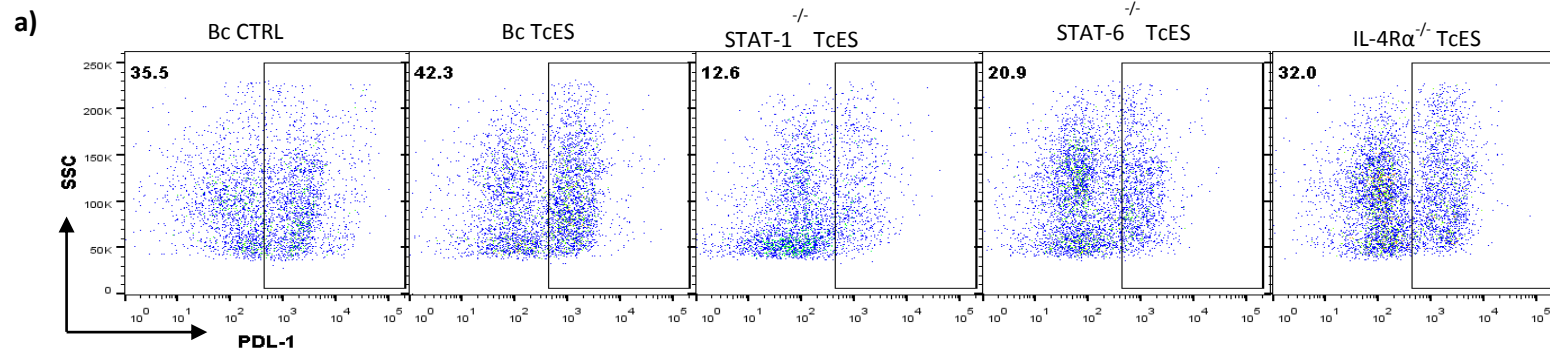


Figura 13. a) Dot-plots representativos de la expresión de la molécula PDL-1 en células CD11b⁺ peritoneales provenientes de cuatro líneas de ratones (WT <BALB/c>, STAT-1, STAT-6 e IL-4Rα) y recuperadas 18 horas después de la inoculación de TcES. **b)** Gráfica de porcentaje de expresión de PDL-1 en células CD11b. Las diferencias entre las medias estadísticamente significativas se hallaron con una P < 0.05. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey se realizó con $\alpha=0.05$ están representadas con asterisco y los grupos contra los cuales fueron comparados se indican con las líneas horizontales.

10. DISCUSIÓN

Las infecciones parasitarias regulan o alteran la respuesta inmune del hospedero. La infección con helmintos o extractos de helmintos dirigen las respuestas de células T CD4⁺ (TH) hacia el tipo TH2. Entre la diversidad de moléculas presentes o secretadas por parásitos helmintos, se ha demostrado que los glicanos son claves en la inducción de la respuesta inmunitaria de tipo TH2 o antiinflamatorias (Harn *et al.*, 2009).

Esto ha sido confirmado a través de experimentos en nematodos y trematodos. Sin embargo, los resultados de las investigaciones de la interacción del SI con antígenos de cestodo en el sistema inmune innato y su papel en la iniciación y consecuente polarización TH2 se ha enfocado en células presentadoras de antígeno, como macrófagos y células dendríticas (Terrazas, Gómez-García y Terrazas, 2010). Células reguladoras relacionadas con el desarrollo del sistema inmune y que han pasado por un proceso de maduración a partir de progenitores mieloides (Hettinger *et al.*, 2013).

Y ha dejado de lado la interacción paralela con otras células innatas que también influyen en el desarrollo de una inmunidad tipo 2, como los neutrófilos y monocitos, células que en estadios inmaduros conforman a un grupo de células denominada células mieloides supresoras (MDSC).

En este trabajo se evaluó la capacidad de reclutamiento celular de una fracción mayor a 50 kDa de los productos excretados/secretados de *T. crassiceps* (TcES), en ratones silvestres, que se sacrificaron en diferentes tiempos, para poder observar la dinámica poblacional de células reportadas como células supresoras de origen mieloides (MDSC).

En este estudio se pudo identificar tres subpoblaciones de células, que pudieron ser diferenciadas por la expresión de marcadores CD11b, Ly6C y Ly6G. Dos subpoblaciones de monocitos (CD11b⁺ Ly6C^{low} Ly6G⁻ y CD11b⁺ Ly6C^{hi} Ly6G⁻), así como una población de neutrófilos (CD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁺) que, al ser consideradas

como células totales del exudado peritoneal, presentan un notable incremento desde las primeras horas (CTRL= 8.4, 3h= 66.8, 6 h=62.8, 18 h=34.4, 24 h= 34.6 y 48h=47.69).

Los resultados confirman la capacidad de reclutar células supresoras de origen mieloides a las 18h, tal como lo demostró Gómez-García *et al.*, en el 2005, cuando indujo el reclutamiento de estas células con antígenos solubles de *T. crassiceps* (TSA), aunque los marcadores inmunológicos empleados para identificar las células fueron distintos (CD11b, F4/80 y Gr-1).

Sin embargo, al comparar las proporciones de células aquí reportadas con los resultados de Gómez-García *et al.*, en el 2005, donde se observó una tendencia a incorporar 25-30% de células F4/80⁺/Gr-1⁺ que pudieron ser subdivididas en dos poblaciones, de acuerdo a su expresión de F4/80, F4/80^{hi} y F4/80^{low}. No obstante, el marcador F4/80 está más relacionado con macrófagos maduros, células que pueden derivarse de monocitos, que aquí son reportados de forma específica empleando el marcador Ly6C, además permitió identificar dos subpoblaciones de monocitos.

Las variaciones detectadas en las subpoblaciones de monocitos, CD11b⁺Ly6C^{low} y CD11b⁺Ly6C^{hi}, se presentaron de forma significativa hasta la hora 48 post-inoculación, datos que nos indican que probablemente las células F4/80⁺/Gr-1 reportados por (Gómez-García *et al.*, 2005) no están relacionadas con células que se puedan diferenciarse hacia macrófagos. Sino que probablemente son células en un estadio de neutrófilos inmaduros, si se toma como referencia los resultados obtenidos en este trabajo, debido a que el incremento en el reclutamiento de ambas subpoblaciones de monocitos reportadas aquí se vio reflejada hasta las 24 horas postinoculación.

La presencia de monocitos Ly6C^{hi} previamente se reportó después de cuatro días de infección con *Taenia crassiceps*, estas células comúnmente se han asociado a respuestas inmunes de tipo inflamatorio al estar ligados con la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α y óxido nítrico (Gimeno y Barquinero,

2011), que cuando se presenta en cierta intensidad podría ayudar a eliminar al parásito durante los primeros días de la infección en ratones que han sido reportados como susceptibles.

Sin embargo, al verificar el papel de los monocitos Ly6C^{hi} en la infección y evaluar el efecto de los oligodesoxinucleótidos (CpG) a los 4 días post-inoculación se halló que, la presencia de CpG incrementó considerablemente la proporción de células innatas como neutrófilos y macrófagos, mientras que la subpoblación de monocitos Ly6C^{hi} fue menor cuando se comparó con el grupo control (Aldridge, Johnson y Kuhn, 2010).

Este fenómeno antes descrito concuerda con la presencia de células neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺) durante las primeras 24 horas post-inoculación de TcES, cuya presencia se desvanece gradualmente hasta la hora 48. Mientras que el arribo significativo de monocitos (CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁻), en el último punto de monitoreo, podría asociarse con el retorno de los monocitos Ly6C^{hi} de forma significativa en el octavo día post-infección acompañados de una proporción invariable de macrófagos y neutrófilos (Aldridge, Johnson y Kuhn, 2010).

La comparación antes descrita, puede relacionarse a una respuesta inmune inflamatoria donde la población de células predominante corresponde a granulocitos y macrófagos durante periodos cortos de tiempo con los TcES, que puede prolongarse varios días sin cambios en la conformación poblacional de células innatas, durante la infección.

CCL2 es una de las moléculas proinflamatorias más estudiadas entre los miembros de la familia C-C, por regular la migración e infiltración de monocitos, linfocitos T de memoria CD41 y células NK (Ansari *et al.*, 2011), por lo que ha sido investigado como un atractivo candidato para controlar infecciones que requieren una respuesta altamente polarizada por células T cooperadoras, debido a que ha sido reportada como una molécula necesaria en el desarrollo de una respuesta TH2 protectora contra el nematodo *Trichuris muris*, así como su ausencia ha

indicado susceptibilidad, de esta infección intestinales (DeSchoolmeester *et al.*, 2003).

La presencia de la quimiocina MCP-1 en el peritoneo durante las 48 horas de monitoreo a través del tiempo fue variable. Los puntos de concentración alta, correspondió a las primeras tres horas post-inoculación, donde curiosamente se encontró la mayor cantidad proporción de neutrófilos $CD11b^+Ly6C^+Ly6G^+$, presento un repunte de menor intensidad a las 24 horas, donde el número de células de este fenotipo se redujo considerablemente, aunque ambas diferencias fueron significativas respecto al grupo control.

La correlación de una alta densidad de neutrófilos, un menor número de ambas subpoblaciones de monocitos y la alta concentración de CCL2, anteriormente fue reportado, aunque en el modelo de infección peritoneal más CpG a los cuatro días post-infección (Aldridge, Johnson y Kuhn, 2010).

Los niveles de MCP-1 en circulación también mostraron variaciones, hubo dos diferencias significativas a las 6 y 48 horas post-inoculación. Puntos de tiempo donde el comportamiento de las células probablemente fue a salir del torrente sanguíneo en el caso de los monocitos, debido a que los niveles basales de $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^-$ fue a reducirse, mientras que un incremento significativo de la subpoblación $CD11b^+Ly6C^{hi}Ly6G^-$ es sucedida por una drástica reducción en la hora 6, probablemente debido a la extravasación hacia el peritoneo.

Las variaciones en las concentraciones de las citocinas indican una serie de eventos que se desarrollaron a través del tiempo.

La presencia de CCL2 en el peritoneo seguido de la inoculación de los TcES nos indica que MCP-1 es liberado al ambiente después de que ha interactuado con los antígenos, un paso crucial en el desarrollo de una respuesta inmune, ya que se piensa que las concentraciones altas de CCL2 induce la secreción de IL-4 (Deshmane *et al.*, 2009).

Sin embargo, la presencia de IL-4 en este trabajo no fue medido, aunque se ha reportado su presencia posterior a tres inoculaciones semanales de TSA. Así se demuestra que se ha desarrollado una respuesta TH2 con sus respectivas poblaciones celulares, anticuerpos, citocinas y genes involucrados en la respuesta inmune de tipo antiinflamatoria (Gómez-García *et al.*, 2006). Adicionalmente se realizó un ensayo de ELISA para la detección de IL-13 pero no se detectó la presencia.

El comportamiento de estas células al infiltrar el peritoneo resulta normal, ya que los neutrófilos son caracterizados como las primeras células reclutadas al sitio de una respuesta inflamatoria aguda por su habilidad para actuar como células fagocitarias, para liberar distintos productos que pueden actuar en conjunto con las células residentes de los tejidos afectados, tal como los macrófagos y mastocitos, para amplificar la respuesta inflamatoria inicial e inducir el reclutamiento adicional de neutrófilos y otras poblaciones de leucocitos, incluyendo monocitos y linfocitos, y en escenarios TH2 basófilos y eosinófilos (Makepeace *et al.*, 2012).

Por otra parte el incremento de MCP-1 probablemente fue resultado de la interacción de IFN- γ con su receptor ya que se ha reportado su participación en la up-regulación de genes involucrados en el tráfico de leucocitos como quimiocinas y moléculas de adhesión en células como macrófagos (Gil *et al.*, 2001; Schroder *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos de la cuantificación de IFN- γ en este proyecto indican diferencias significativas al menos en tres tiempos.

Otras funciones inmunomoduladoras de IFN- γ recaen en inhibición de la proliferación celular y los efectos sobre la apoptosis, la activación de funciones efectoras microbicidas (Schroder *et al.*, 2004), tal como fue demostrado por la inducción de PDL1 en neutrófilos de sangre periférica estimulados con IFN- γ (de Kleijn *et al.*, 2013).

Aquí se asoció la presencia de IFN- γ con esta capacidad de controlar el ciclo celular a través de la expresión de coestimuladores negativos (PDL1) en células

mieloides, donde se observó su expresión significativa en células las células reclutadas. El diseño experimental de cocultivos contribuyo a generar información referente a su funcionalidad.

Las células provenientes del exudado peritoneal fueron cultivadas con esplenocitos activados con α CD3 y se logró percibir su función efectora al detener la proliferación en los linfocitos.

Aunado a la escasa investigación del papel que desempeñan las células que constituyen el grupo de las mieloides supresoras, también se desconoce de la biología y funcionalidad cuando moléculas importantes en el desarrollo de las principales respuestas inmunes asociadas a células T cooperadoras están ausentes. Por tal motivo se desarrollaron experimentos de reclutamiento de células mieloides en organismos deficientes en STAT1, STAT6 e IL-4R α .

La representación de cada una de las células que responden a los TcES a las 18 horas se vio alterada, al menos en ausencia de STAT1, molécula que modifico el reclutamiento de dos subpoblaciones de células, principalmente neutrófilos, ya que su presencia en el peritoneo se incrementó de forma significativa respecto al grupo control y las otras cepas evaluadas. Esto indica que STAT1 probablemente juega in papel en la homeostasis durante el reclutamiento y proporción de las células, debido a que cuando está presente regula un número inferior de neutrófilos. Aunado a que, la población de monocitos CD11b⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻ se observó ausente.

Los productos inoculados en los ratones deficientes de STAT6 coinciden a los datos reportados por Gómez-García et al en el 2005, al observar que el reclutamiento de las células mieloides supresoras se realizó de manera independiente a STAT6, efectos similares se generaron en ratones carentes de IL4-R α .

Un evento igual de importante a considerar en este trabajo, fue evaluar la posible funcionalidad de estas células en la zona de inoculación a través de la expresión de moléculas de coestimulación negativa.

De esta manera se monitoreó la expresión de moléculas de coestimulación negativa. Y se comprobó una reducción significativa en la expresión de PDL1 en las líneas de ratones deficientes en las moléculas STAT (1 y 6), mientras que los ratones carentes de IL-4R α la expresión de este ligando no fue afectado.

Cabe mencionar que este comportamiento en las células reclutadas sólo es una imagen de sucesos que acontecieron sólo en un tiempo, y que queda por describir procesos en periodos más cortos de tiempo, que ayudarían a comprender mejor el panorama de hechos que están sucediendo.

Los resultados aquí presentes aportan una noción más clara de cómo una fracción de alto peso molecular de los productos derivados de metacestos de *Taenia crassiceps* pueden iniciar una respuesta, a través del reclutamiento de células inmunes innatas que participan de forma inmediata a la presencia de estas moléculas, y exhiben un perfil de activación de neutrófilos que no había sido reportado en la interacción con moléculas derivadas de un helminto.

11. CONCLUSIONES

- Los TcES tienen la capacidad de reclutar durante las primeras 6h neutrófilos y monocitos a las 48h, además inducen la expresión de moléculas supresoras como PDL1.
- Los monocitos Ly6C^{low} reclutados por los TcES fueron más supresores seguidos por los monocitos Ly6C^{hi} y los neutrófilos Ly6G⁺ Ly6C⁺. El mayor efecto supresor se presentó cuando las tres poblaciones actuaron de forma sinérgica.
- La administración de los TcES induce la producción de la quimiocina MCP-1, así como la producción de IFN- γ en el peritoneo.
- El reclutamiento de los monocitos Ly6C^{hi} es dependiente de STAT-1 e independiente de STAT-6 y IL-4R α .
- La ausencia de STAT-1 favorece el reclutamiento de neutrófilos por los TcES.
- La expresión de PDL1 en células CD11b⁺ fue dependiente de STAT-1 y STAT-6.

12. PERSPECTIVAS

Realizar una cinética de reclutamiento celular en ratones deficientes en STAT-1 y STAT-6, así como su funcionalidad en el control de la proliferación y en la generación de microambientes tempranos.

Comprobar que no existe alteración en el proceso de mielopoyesis en medula ósea.

Analizar el proceso de señalización intracelular en el eje JAK-STAT, en los diferentes fenotipos de células inmaduras y la interacción de STAT1 y STAT6.

13. LITERATURA CITADA

- Abbas, K. A., Lichtman, A. H. y Pillai, S. (2012) *Inmunología Celular Y Molecular*. 7°. Madrid, España: Edit Elsevier Inc. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- Aldridge, J. R. Johnson E. C. y Kuhn R. E. 2010) “CpG stimulates protective immunity in Balb/cJ mice infected with larval *Taenia crassiceps*” *The Journal of Parasitology*, 96(5), pp. 920–928. doi: 10.1645/GE-2483.1.
- Allen J. E. y Maizels R. M. 2011) “Diversity and dialogue in immunity to helminths.” *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group, 11(6), pp. 375–88. doi: 10.1038/nri2992.
- Ansari, A. W. *et al.* 2011) “CCL2: A potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis” *European Journal of Immunology*. WILEY-VCH Verlag, 41(12), pp. 3412–3418. doi: 10.1002/eji.201141676.
- Apt Baruch, W. L., Alcaíno, H. y Arriagada, C. (2013) *Parasitología humana*. México, D.F., MX: McGraw-Hill Interamericana.
- Becerra-Díaz M. y Terrazas L. I. 2014) “*Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ .” *International journal for parasitology*. Australian Society for Parasitology Inc., 44(9), pp. 613–23. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.03.012.
- Becerril Flores, M. A. (2014) *Parasitología médica*. 4a ed. México, D.F.: McGraw-Hill/Interamericana.
- Botero, D. y Restrepo, M. (2012) *Parasitosis humanas*. 5a ed. Medellín, Colombia: Corporación para investigaciones biológicas.
- Bronte, V. *et al.* 2016) “Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards.” *Nature communications*, 7(5), p. 12150. doi: 10.1038/ncomms12150.
- Condamine T. y Gabrilovich D. I. 2011) “Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function” *Trends in Immunology*, 32(1), pp. 19–25. doi: 10.1016/j.it.2010.10.002.
- Delves, P. J. *et al.* (2008) *Roitt Inmunología: Fundamentos*. 12a ed. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana.
- DeSchoolmeester, M. L. *et al.* 2003) “Absence of CC chemokine ligand 2 results in an altered Th1/Th2 cytokine balance and failure to expel *Trichuris muris* infection.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(9), pp. 4693–700. doi: 10.4049/jimmunol.170.9.4693.
- Deshmane, S. L. *et al.* 2009) “Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview” *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(6), pp. 313–326. doi: 10.1089/jir.2008.0027.

- Fox, S. *et al.* 2010) “Neutrophil apoptosis: Relevance to the innate immune response and inflammatory disease” *Journal of Innate Immunity*, 2(3), pp. 216–227. doi: 10.1159/000284367.
- Freeman R. S. 1962) “Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi 1810 Cestoda)” *Canadian Journal of Zoology*, 40(6), pp. 969–990. doi: 10.1139/z62-086.
- Gabrilovich D. I. y Nagaraj S. 2009) “Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.” *Nature reviews. Immunology*, 9(3), pp. 162–74. doi: 10.1038/nri2506.
- Gil, M. P. *et al.* 2001) “Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), pp. 6680–5. doi: 10.1073/pnas.111163898.
- Gimeno R. y Barquinero J. 2011) “Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Another player in the orchestra” *Inmunología*. Elsevier Masson SAS, 30(2), pp. 45–53. doi: 10.1016/S0213-9626(11)70015-4.
- Van Ginderachter, J. a. *et al.* 2010) “Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections” *European Journal of Immunology*, 40(11), pp. 2976–2985. doi: 10.1002/eji.201040911.
- Gómez-García, L. *et al.* 2005) “Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells” *Parasite Immunology*, 27(10–11), pp. 395–405. doi: 10.1111/j.1365-3024.2005.00790.x.
- Gómez-García, L. *et al.* 2006) “Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen” *Parasitology Research*, 99(4), pp. 440–448. doi: 10.1007/s00436-006-0159-2.
- Guilliams, M. *et al.* 2014) “Dendritic cells monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny” *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 14(8), pp. 571–578. doi: 10.1038/nri3712.
- Harn, D. A. *et al.* 2009) “Modulation of host immune responses by helminth glycans” *Immunological Reviews*, pp. 247–257. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00799.x.
- Helmbj H. 2009) “Helminths and our immune system: Friend or foe?” *Parasitology International*. Elsevier Ireland Ltd, 58(2), pp. 121–127. doi: 10.1016/j.parint.2009.02.001.
- Hernandez, J.-L. R. Leung G. y McKay D. M. 2013) “Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases” *International Journal for Parasitology*, 43(3–4), pp. 233–243. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.09.005.
- Hettinger, J. *et al.* 2013) “Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor” *Nature Immunology*, 14(8), pp. 821–830. doi: 10.1038/ni.2638.

- Hewitson J. P. Grainger J. R. y Maizels R. M. 2009) "Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity" *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.04.008.
- Hoberg, E. P. 2002) "Taenia tapeworms: Their biology evolution and socioeconomic significance" *Microbes and Infection*, 4(8), pp. 859–866. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01606-4.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A. y Osborne, B. A. (2007) *Inmunología de Kuby*. 6 ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- de Kleijn, S. *et al.* 2013) "IFN- γ -Stimulated Neutrophils Suppress Lymphocyte Proliferation through Expression of PD-L1" *PLoS ONE*, 8(8), p. e72249. doi: 10.1371/journal.pone.0072249.
- Lescano, A. G. y Zunt, J. (2013) *Other cestodes. sparganosis, coenurosis and Taenia crassiceps cysticercosis*. 1a ed, *Handbook of Clinical Neurology*. 1a ed. © 2013, Elsevier B.V. All rights reserved. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00027-3.
- Maizels, R. M. *et al.* 2004) "Helminth parasites - masters of regulation" *Immunological Reviews*, 201(1), pp. 89–116. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00191.x.
- Maizels R. M. y Yazdanbakhsh M. 2003) "Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms" *Nat Rev Immunol*, 3(9), pp. 733–744. doi: 10.1038/nri1183.
- Makepeace, B. L. *et al.* 2012) "Granulocytes in helminth infection -- who is calling the shots?" *Current medicinal chemistry*, 19(10), pp. 1567–86. doi: 10.2174/092986712799828337.
- Martinez F. O. Helming L. y Gordon S. 2009) "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." *Annual review of immunology*, 27, pp. 451–483. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132532.
- McSorley H. J. Hewitson J. P. y Maizels R. M. 2013) "Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators" *International Journal for Parasitology*, 43(3–4), pp. 301–310. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.11.011.
- McSorley H. J. y Maizels R. M. 2012) "Helminth infections and host immune regulation" *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), pp. 585–608. doi: 10.1128/CMR.05040-11.
- Nakao, M. *et al.* 2013) "Molecular phylogeny of the genus Taenia Cestoda: Taeniidae): Proposals for the resurrection of Hydatigera Lamarck, 1816 and the creation of a new genus Versteria" *International Journal for Parasitology*. Australian Society for Parasitology Inc., 43(6), pp. 427–437. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.11.014.
- Owen, J. A., Punt, J. y Stranford, S. A. (2014) *Kuby: inmunología*. 7a ed. México, D.F., MX: McGraw-Hill Interamericana.

- Parham, P. (2016) *Inmunología*. 4a ed. México, D.F.: Librisite.
- Pastuła A. y Marcinkiewicz J. 2011) “Myeloid-derived suppressor cells: a double-edged sword?” *International Journal of Experimental Pathology*, 92(2), pp. 73–78. doi: 10.1111/j.1365-2613.2010.00754.x.
- Peón, A. N., Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, L. I. 2013) “Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens” *BioMed Research International*, 2013, p. 498583. doi: 10.1155/2013/498583.
- Prez-Ponce de León G. García-Prieto, L. y Mendoza-Garfias, B. (2011) “Describing Parasite Biodiversity: The Case of the Helminth Fauna of Wildlife Vertebrates in Mexico” en Grillo O. ed.) *Changing Diversity in Changing Environment*. Croacia: InTech, pp. 33–54. doi: DOI: 10.5772/25011.
- Pillay, J. *et al.* 2013) “Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: Similarities and differences” *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(20), pp. 3813–3827. doi: 10.1007/s00018-013-1286-4.
- Prasanphanich, N. S. *et al.* 2013) “Glycoconjugates in Host-Helminth Interactions” *Frontiers in Immunology*, 4(August), pp. 1–22. doi: 10.3389/fimmu.2013.00240.
- Reyes, J. L. *et al.* 2009) “Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection.” *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(6), pp. 1115–27. doi: 10.1016/j.meegid.2009.05.011.
- Rodriguez-Sosa, M. *et al.* 2002) “Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling.” *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. American Association of Immunologists, 168(7), pp. 3135–3139. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3135.
- Schroder, K. *et al.* 2004) “Interferon- γ : an overview of signals mechanisms and functions” *Journal of leukocyte Biology*, 75(February), pp. 163–189. doi: 10.1189/jlb.0603252.Journal.
- Shi C. y Pamer E. G. 2011) “Monocyte recruitment during infection and inflammation.” *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group, 11(11), pp. 762–74. doi: 10.1038/nri3070.
- Siles-Lucas M. y Hemphill A. 2002) “Cestode parasites: Application of in vivo and in vitro models for studies on the host-parasite relationship” *Advances in Parasitology*, 51, pp. 133–230. doi: 10.1016/S0065-308X(02)51005-8.
- Spolski, R. *et al.* 2002) “Larval *Taenia crassiceps* secretes a protein with characteristics of murine interferon- γ ” *Parasitology Research*. Springer-Verlag, 88(5), pp. 431–438. doi: 10.1007/s00436-002-0590-y.
- Spolski, R. J. *et al.* 2000) “Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*” *Parasite Immunology*, 22(6), pp. 297–305. doi:

10.1046/j.1365-3024.2000.00301.x.

Taylor M.A. Coop R.L. and Wall R. L. eds) ed.) 2015) “Veterinary Helminthology” en *Veterinary Parasitology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–109. doi: 10.1002/9781119073680.ch1.

Terrazas, C. A. *et al.* 2011) “Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells.” *International journal of biological sciences*, 7(9), pp. 1391–400. doi: 10.7150/ijbs.7.1391.

Terrazas, C. A., Gómez-García, L. y Terrazas L. I. 2010) “Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling” *International Journal for Parasitology*, 40(9), pp. 1051–1062. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.02.016.

Terrazas, L. I. *et al.* 1998) “Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)” *The Journal of Parasitology*, 84(1), pp. 74–81. doi: 10.2307/3284533.

Terrazas, L. I. *et al.* 2005) “Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis” *International Journal for Parasitology*, 35(13), pp. 1349–1358. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.06.003.

Terrazas L. I. 2008) “The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts.” *Current topics in medicinal chemistry*, 8(5), pp. 383–392. doi: 10.2174/156802608783790848.

Terry R. L. y Miller S. D. 2014) “Molecular control of monocyte development” *Cellular Immunology*. Elsevier Inc., 291(1–2), pp. 16–21. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.02.008.

Willms, K. y Zurabian R. 2010) “*Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models.” *Parasitology*, 137(3), pp. 335–346. doi: 10.1017/S0031182009991442.

Zhao, Y. *et al.* 2016) “Phenotype development and biological function of myeloid-derived suppressor cells” *Oncolimmunology*, 5(2), p. e1004983. doi: 10.1080/2162402X.2015.1004983.