



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE  
NEUTRÓFILOS RECLUTADOS POR LA INFECCIÓN  
CON *Taenia crassiceps*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

CUAUHTÉMOC DEL ÁNGEL  
SÁNCHEZ BARRERA



DIRECTORA DE TESIS: DRA. YADIRA LEDESMA SOTO

LOS REYES IZTACALA, 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.

## **Dedicatoria**

A mis padres, por ser el principal pilar de este logro. Gracias mamá porque sin todo tu esfuerzo y dedicación no lo habría logrado, no tengo palabras para agradecer todo lo que haces por mí. Siempre recuerda que este logro es de ambos porque tu apoyo me hizo fuerte en los momentos más difíciles. Te amo ma.

A mi familia, principalmente a mis abuelitos, Felicitas y Felipe que me han guiado con cariño y comprensión. A mis primos, Felipín, Emiliano e Ivonne. A mi tío Fer.

A mi otra familia, porque gracias a ustedes comprendí que la familia también se escoge. Gracias por todo el apoyo que me han brindado (Patis, Luigi, Chino, Mary, Chan, Nancí y Rubén)

“TENER UN LUGAR A DONDE IR ES UN HOGAR.  
TENER ALGUIEN A QUIEN AMAR ES UNA FAMILIA.  
TENER AMBOS ES UNA BENDICIÓN”.

DONNA HEDGES.

## **Agradecimientos**

A mi asesora, Yadis, por la confianza brindada a lo largo de este tiempo, por ser mi guía en el maravilloso campo de la inmunología. Gracias por tu apoyo, paciencia y por creer en mí.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y por la confianza demostrada para la realización de este proyecto.

A mis sinodales, la Dra. Ana María García Bores, la Dra. Elvia Gallegos Neyra y el Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy por su orientación.

A la Dra. Leticia por el gran esfuerzo que realizó para poder proporcionar los animales necesarios.

A mis amigos del laboratorio, gracias por soportar todas mis ocurrencias (Memo, Blanca, Sandy, Yola, Ilse, Dianis y Yael).

A mis amigos de la carrera, por su apoyo y consejos (Alí, David, Mixtzin y Ferchis).

A mi amigo Rafael Silvestrim, por apoyarme en la gran lección de vida que me dio Argentina.

El presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la Beca Ayudante de SIN con registro 77080

**“La ciencia se compone de errores,  
que, a su vez, son los pasos hacia la  
verdad.”**

**Julio Verne**

**“Es tiempo de llamar a una tregua en la  
guerra entre la ciencia y el espíritu.  
Dios no amenaza a la ciencia, la  
mejora. Dios no es amenazado por la  
ciencia. Él la hizo posible”**

**Francis Collins**



## I. CONTENIDO

<b>I. CONTENIDO .....</b>	<b>1</b>
<b>I. ABREVIATURAS EMPLEADAS .....</b>	<b>2</b>
<b>II. RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
4.1 NEUTRÓFILOS.....	5
4.1.1 ORIGEN .....	5
4.1.2 RECLUTAMIENTO.....	8
4.1.3 ACTIVACIÓN.....	11
4.1.4 FUNCIONES EFECTORAS .....	11
4.2 NEUTRÓFILOS EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS.....	15
4.2.1 INFLAMACIÓN AGUDA .....	16
4.2.2 INFLAMACIÓN CRÓNICA .....	16
4.3 SUBPOBLACIONES DE NEUTRÓFILOS .....	17
4.3.1 NEUTRÓFILOS N1 .....	18
4.3.2 NEUTRÓFILOS N2 .....	19
4.4 NEUTRÓFILOS EN INFECCIONES PARASITARIAS .....	21
4.5 <i>TAENIA CRASSICEPS</i> .....	22
4.6 RESPUESTA INMUNE FRENTE A <i>TAENIA CRASSICEPS</i> .....	23
<b>IV. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>VI. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
6.1 GENERAL .....	27
6.2 PARTICULARES.....	27
<b>VII.MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>IX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>X. CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>53</b>
<b>XII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>



## I. ABREVIATURAS EMPLEADAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AAM/S	Alternatively activated macrophages (Macrófagos alternativamente activados)
ANOVA	Analysis of variance (Análisis de varianza)
APRIL	A-proliferation inducig ligand (Ligando inductor de la proliferación A)
Arg-1	Arginasa 1
CAM/S	Classically activated macrophages (Macrófagos clásicamente activados)
CLP	Common lymphoid progenitor (Progenitor linfoide común)
CU	Colitis ulcerativa
CXCL	Chemokine C-X-C motif ligand (Ligando de quimiocina con motivo C-X-C)
CXCR	Chemokine C-X-C motif receptor (Receptor de quimiocina con motivo C-X-C)
DAMPs	Damage-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a daño)
DCFH	Diclorofluoresceína
EC	Enfermedad de crohn
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
ESAM	Endothelial adhesión molecule (Molécula de adhesión endotelial)
ESL-1	E-selectin ligand 1 (Ligando 1 para E-selectina)
FACS	Fluorescence activated cell sorter (Citometría de flujo)
fmlF	Péptido N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G-CSF	Granulocyte colony-stimulatinf factor (Factor estimulante de colonias de granulocitos)
G-MDSC	Granulocyte-like myeloid ferived suppressor cells (Células mieloides supresoras de tipo granulocito)
GMP	Granulomonocytic progenitor (Progenitor granulomonocítico)
GPCRs	G protein coupled receptors (Receptores acoplados a proteína G)
HDN	High density neutrophils (Neutrófilos de alta densidad)
HGF	Hepatocyte growth factor (Factor de crecimiento de hepatocitos)
HSCs	Hematopoietic stem cells (Células madre hematopoyéticas)
ICAM	Intercellular adhesión molecule (Molécula de adhesión intercelular)
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
IFN- $\alpha$	Interferón alfa
INOS	Inducible nitric oxide synthase (Sintasa de óxido nítrico inducible)
JAM	Junctional adhesión molecule (Molécula de adhesión y unión)
LDN	Low density neutrophils (Neutrófilos de baja densidad)
LFA-1	Linfocitic function antigen 1 (Ligando de función linfocitaria 1)
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LTB4	Leucotrieno B4
LXR	Liver X receptors (Receptores X del bazo)
MAC-1	Macrophage-1 antigen (Antígeno de macrófago 1)
MB	Mieloblasto



MDSC	Myeloid-derived suppressor cell (Células mieloides supresoras)
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase dos
MMP	Metaloproteasa de matriz
MoB	Monoblasto
MPO	Mieloperoxidasa
NETs	Neutrophil extracellular traps (Trampas extracelulares de neutrófilos)
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-like (Receptor tipo proteínas de oligomerización de nucleótidos)
NOX	NADPH oxidasa
PAD4	Peptidil arginasa deaminasa
PAF	Factor activador de plaquetas
PAMPs	Patogen-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a patógenos )
PDL	Programmed death ligand (Ligando de muerte programada)
PECAM	Platelet-endothelial cell adhesión molecule (Molécula de adhesión plaquetaria a células endoteliales)
PECs	Células de exudado peritoneal
PKC	Proteína cinasa C
PMN	Célula polimorfonuclear
PPAR- $\gamma$	Peroxisome proliferation activated gamma receptor (Receptor gamma activado de proliferación de peroxisomas)
PRRs	Pathogen recognition receptors (Receptores de reconocimiento de patrones)
PSGL	P-selectin glicoprotein ligand (Ligando de la glicoproteína P-selectina)
SBF	Suero bovino fetal
SCF	Seminal cell factor (Factor de células seminales)
SSF	Solución salina fisiológica
TGF- $\beta$	Tumoral growth factor beta (Factor de crecimiento tumoral beta)
TLR	Toll like receptor (Receptro tipo toll)
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor Alpha (Factor de necrosis tumoral alfa)
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (Ligando inductor de la apoptosis del factor de necrossi tumoral)
VEGF	Vascular endotelial growth factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)
Ym-1	Factor quimiotáctico de eosinófilos
$\mu$ Ci	MircroCurie



## II. RESUMEN

Los neutrófilos son considerados la población más abundante de leucocitos circundantes, constituyen entre el 50 y 70% de los glóbulos blancos totales y son las primeras células que se reclutan ante una infección. Aunque juegan un papel importante en el combate de patógenos, han sido relacionados con enfermedades que involucran una respuesta inmune exacerbada. Sin embargo, se ha reportado que también pueden participar en la resolución de la inflamación y el mantenimiento de la homeostasis, ya que, en investigaciones recientes, se ha demostrado la presencia de dos poblaciones de neutrófilos denominadas N1, con actividad inflamatoria y N2, con actividad anti-inflamatoria. Tomando en cuenta los reportes que exponen la capacidad que tiene *Taenia crassiceps* para modular la respuesta inmune y polarizar algunas poblaciones celulares, el presente trabajo evaluó las diferencias fenotípicas y funcionales de los neutrófilos reclutados por la infección con este parásito, destacando, la ausencia de dichas células entre las dos y cuatro semanas de infección. En cuanto al fenotipo, los neutrófilos reclutados a los dos días de infección presentan altos niveles de PDL-1, MHCII y CD86 mientras que los reclutados a las ocho semanas expresan PDL-1, PDL-2 y MHCII. Además, la infección durante ocho semanas disminuye el número de neutrófilos que producen especies reactivas del oxígeno. En cuanto a su función, se demostró que los neutrófilos de la porción LDN tanto de dos días como de ocho semanas de infección tienen la capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T. Finalmente, se encontraron algunas diferencias en la producción del RNA mensajero de TNF- $\alpha$ , IL-10, Ym-1, Arg-1 y TGF- $\beta$  respecto a un control inflamatorio, lo que sugiere la existencia de diferencias en el perfil de citocinas de los neutrófilos reclutados por ambos estímulos.



### III. INTRODUCCIÓN

#### 4.1 NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos son considerados la población más abundante de leucocitos circundantes, constituyen entre el 50 y 70 % de los glóbulos blancos totales y son las primeras células que se reclutan ante una infección. Tienen un diámetro de entre 10 y 15  $\mu\text{m}$ , su núcleo está segmentado de dos a cinco lóbulos y su citoplasma contiene diferentes tipos de gránulos ricos en sustancias antimicrobianas como la azurociclina y diversas enzimas como la elastasa, gelatinasa y proteasas (Abbas *et al.*, 2006).

##### 4.1.1 ORIGEN

La producción de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) es una de las principales actividades de la médula ósea, donde, aproximadamente dos tercios de la hematopoyesis está destinada a esta actividad (Borregaard, 2010). Los neutrófilos se forman a partir de células madre hematopoyéticas (HSCs) que se diferencian por el efecto de diversos estímulos extracelulares y reguladores intracelulares; este proceso puede ser dividido en dos grandes etapas, la determinación del linaje (Fig. 1) y la granulopoyesis comprometida (Fig. 2) (Cowland y Borregaard, 2016).

Tanto la determinación del linaje como la granulopoyesis comprometida son reguladas por un amplio número de citocinas y dependiendo de su combinación pueden inducir la formación de diversos linajes hematopoyéticos. Por ejemplo, en la determinación del linaje, la interacción del receptor CXCR4, presente en las HSCs, con su ligando CXCL12, expresado por las células mesenquimales, auxilia en la retención de las HSCs en los nichos proporcionados por los osteoblastos (Borregaard, 2010; Strydom y Rankin, 2013; Nauseef y Borregaard, 2014; Cowland y Borregaard, 2016).



Por otra parte, estímulos como el Interferón  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), promueven su proliferación, mientras que el factor de células seminales (SCF) es requerido para su mantenimiento (Mayani *et al.*, 2007; Bugl *et al.*, 2012; Cowland y Borregaard, 2016).

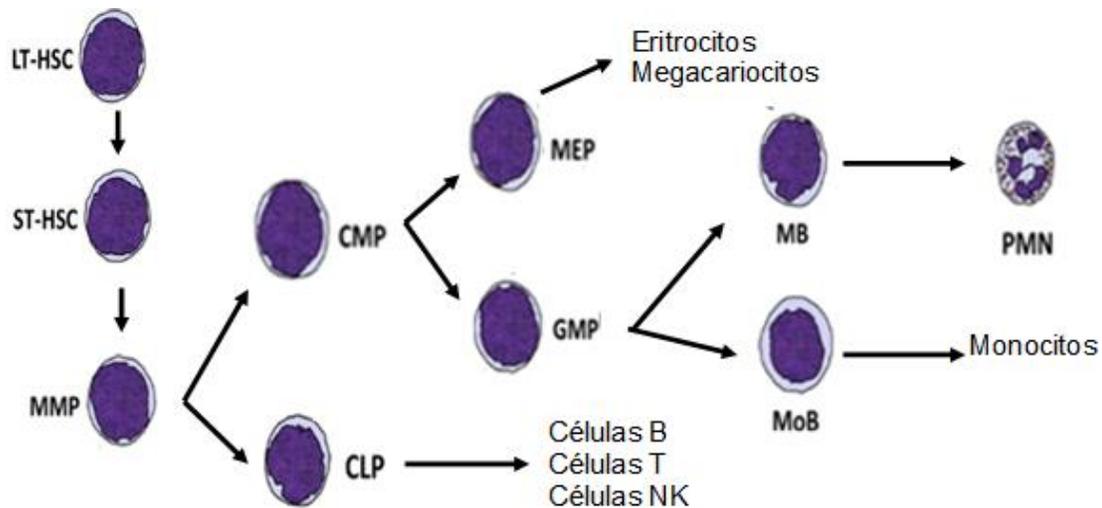


Figura 1. En la médula ósea las HSCs a largo plazo (LT-HSC) tienen la capacidad de renovarse y al dividirse generan HSCs a corto plazo (ST-HSC), aunque estas tienen capacidad de renovación limitada al dividirse forman a las células progenitoras (MMP) que pierden totalmente esta capacidad y pueden diferenciarse hacia un progenitor linfóide común (CLP) o un progenitor mielóide común (CMP), con lo que se establece un linaje diferente para ambas células. Al ser de origen mielóide, los neutrófilos derivan de las CMP que al madurar forman al progenitor granulomonocítico (GMP) que a su vez puede originar un monoblasto (MoB) o un mieloblasto (MB) que al madurar dan origen a los monocitos y células polimorfonucleares (PMN) respectivamente (modificado de Cowland y Borregaard, 2016).

Así mismo, en la granulopoyesis comprometida la diferenciación y liberación de los neutrófilos depende principalmente del G-CSF que promueve la síntesis de citocinas como CXCL1, CXCL2 y la expresión del receptor CXCR2 en dichas células. Además, promueve la disminución de CXCL12 y CXCR4 lo que facilita la liberación al torrente sanguíneo (Borregaard, 2010; Strydom y Rankin, 2013; Nauseef y Borregaard, 2014; Cowland y Borregaard, 2016).



En conjunto, estos estímulos activan diversos factores de transcripción que participan en el proceso de diferenciación entre los que destacan C/EBPA- $\alpha$  (CCAAT/ proteína de unión al potenciador) y C/EBPA- $\beta$  activados en condiciones normales y de emergencia respectivamente (Borregaard, 2010; Mayadas *et al.*, 2015; Cowland y Borregaard, 2016).

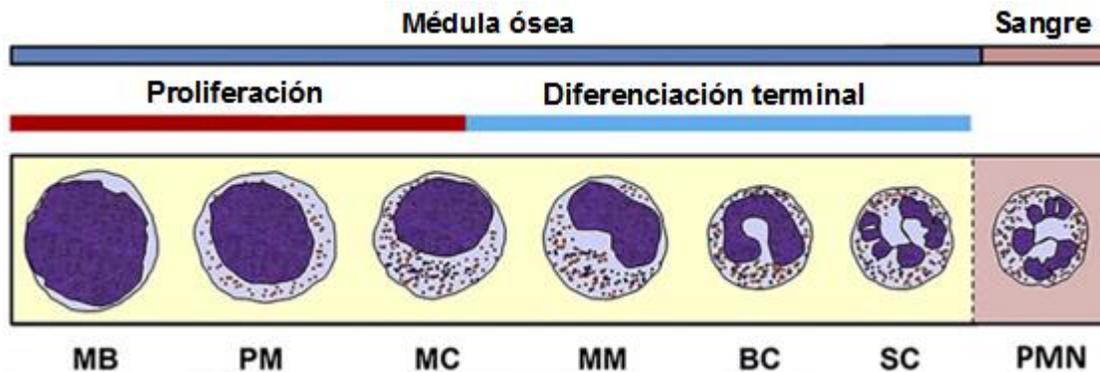


Figura 2. En la médula ósea el mieloblasto (MB) se diferencia en un promielocito (PM), célula caracterizada por tener núcleo redondo y gránulos azurófilos. Posteriormente, se desarrolla un mielocito (MC) que aún tienen núcleo redondo, gránulos azurófilos y además desarrolla gránulos específicos. En la siguiente etapa se forman los metamielocitos (MM) con núcleo en forma de riñón, estos al madurar dan origen a las células en banda (BC) cuyo nombre es dado por la forma de su núcleo, al igual que las células segmentadas (SC), última etapa presente en la médula ósea, antes de la liberación de las células polimorfonucleares o neutrófilos (PMN) al torrente sanguíneo (modificado de Cowland y Borregaard, 2016).

Aunque la existencia de un mecanismo regulador de la diferenciación de los neutrófilos o “neutrostat” aún está en controversia, trabajos recientes han descrito algunas rutas de retroalimentación que controlan la producción de estas células (Mayadas *et al.*, 2015). En condiciones normales, los neutrófilos senescentes son fagocitados por macrófagos tisulares (efferocitosis) que envían señales antiinflamatorias a través de la expresión de PPAR- $\gamma$  (receptor gamma activado por el factor de proliferación de peroxisomas) y LXR (receptores X del bazo). Estas señales disminuyen la producción de IL-23 en los macrófagos, citocina que induce la producción de IL-17 (en linfocitos T, células NK y células T citotóxicas) necesaria para la producción de G-CSF (Borregaard, 2010; Bugl *et al.*, 2012; Nauseef y Borregaard, 2014; Wirths *et al.*, 2017).



Además, el número de neutrófilos también puede ser regulado por el espacio disponible en médula ósea y por procesos mediado por el receptor de tipo Toll-4 (TLR4), involucrando de esta manera a la microbiota, en un proceso llamado granulopoyesis de emergencia (Bugl *et al.*, 2012; Nauseef y Borregaard, 2014; Mayadas *et al.*, 2015; Wirths *et al.* 2017).

#### 4.1.2 RECLUTAMIENTO

Una vez liberados al torrente sanguíneo, los neutrófilos circulan durante seis a diez horas para ser atraídos a los focos de infección mediante factores quimiotácticos como CXCL1, CXCL2, IL-8, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el factor activador de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 (LTB4), el componente C5 del sistema del complemento y el péptido N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLF) (Kobayashi y Deleo, 2009; El-Benna *et al.*, 2016).

Otros productos de la activación del endotelio vascular por estímulos como la IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , promueven la expresión de moléculas de adhesión, componentes que facilitan la interacción física del neutrófilo con el endotelio vascular permitiendo que se lleve a cabo la cascada de adhesión, proceso que culmina con la salida del neutrófilo del torrente sanguíneo y su activación (Dimasi *et al.*, 2013; Mathieu-Benoit y Nourshargh, 2013).

En la primera etapa de la cascada de adhesión, la captura o anclaje (Fig. 3), el neutrófilo y el endotelio vascular tienen su primer contacto a través de una familia de glicoproteínas llamadas selectinas, conformadas por la L-selectina, expresada constitutivamente en leucocitos y en su forma activa se libera al torrente sanguíneo; E-selectina, sintetizada de *novo*, con alta afinidad al ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1) y la P-selectina cuya afinidad al PSGL-1 es baja y se almacena preformada en vesículas llamadas cuerpos de Weibel-Palade (Dimasi *et al.*, 2013; Mathieu-Benoit y Nourshargh, 2013; Mayadas *et al.* 2015).



A continuación, los neutrófilos ruedan a lo largo del endotelio en dirección al sitio inflamado en un proceso denominado rodamiento (Fig. 3). Como en la captura, las selectinas juegan un papel importante, en especial la E-selectina y su ligando alternativo, ligando para E-selectina 1 (ESL-1), necesarios para lograr un rodamiento estable (Yuan *et al.*, 2012; Dimasi *et al.*, 2013; Mayadas *et al.* 2015).

Una reducción en la velocidad de rodamiento abre paso a la siguiente etapa, el rodamiento lento (Fig. 3). En este proceso la E-selectina sigue siendo de gran importancia, sin embargo, ESL-1 es sustituida por CD44. Además, otra familia de proteínas llamada integrinas comienza su participación en la cascada de adhesión, destacando la  $\beta_2$ -integrinas: antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1) y el receptor 1 de macrófagos (MAC-1) que interactúan con el ligando endotelial ICAM-1 (Dimasi *et al.*, 2013; Mathieu-Benoit y Nourshargh, 2013; Mayadas *et al.* 2015).

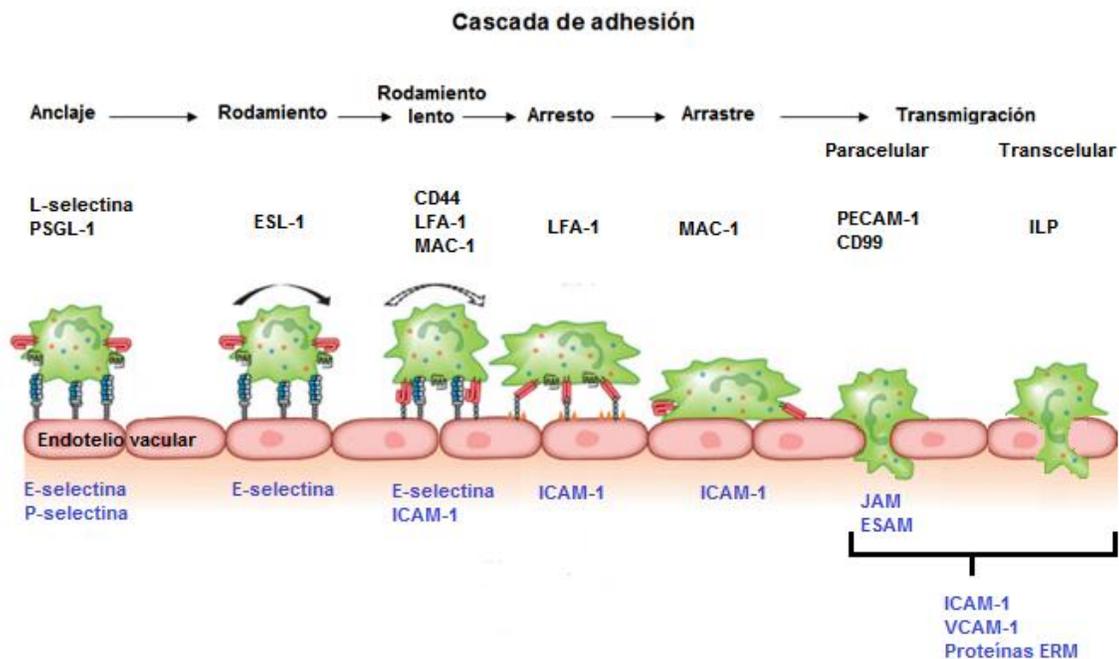


Figura 3. Cascada de adhesión y sus diferentes etapas. Se muestran las diferentes moléculas de adhesión expresadas por los neutrófilos (negro) y el endotelio vascular (azul) (modificado de Mayadas *et al.*, 2015).



La detención total del rodamiento es el inicio de la etapa llamada arresto (Fig. 3), mediada por la activación de las  $\beta_2$ -integrinas, de hecho, la activación de LFA-1 es crítica en el paro del rodamiento, ya que esto provoca un cambio conformacional, lo que aumenta la avidéz y afinidad por el ligando ICAM-1, promoviendo una unión más firme (Yuan *et al.*, 2012; Dimasi *et al.*, 2013; Mayadas *et al.*, 2015).

En seguida, los neutrófilos entran en la penúltima etapa de la cascada de adhesión, el arrastre (Fig. 3), donde con ayuda de la unión ICAM-1 y MAC1 rastrean el endotelio vascular en busca de los sitios idóneos para la transmigración.

Finalmente, los neutrófilos atraviesan el endotelio vascular en la transmigración paracelular (entre las células) o transcelular (a través de las células) (Fig. 3). La vía paracelular es la forma predominante y entre el 85-95 % de neutrófilos migran por esta vía, por el contrario, la migración transcelular se limita a tejidos específicos como la médula ósea, páncreas y timo (Yuan *et al.*, 2012; Dimasi *et al.*, 2013; Mathieu-Benoit y Nourshargh, 2013; Mayadas *et al.* 2015).

Las vías transcelular y paracelular comparten algunas interacciones tempranas como la formación de las copas transmigratorias en el endotelio vascular, ricas en ICAM-1 y VCAM-1, proteínas citoplasmáticas ERM (erzina, radixina y moesina) y componentes del citoesqueleto como la viniculina,  $\alpha$ -actinina y talina-1. Por el contrario, existen algunas diferencias, por ejemplo, la expresión de moléculas de adhesión y unión (JAM), moléculas plaquetarias de adhesión a células endoteliales (PECAM-1), molécula de adhesión endotelial (ESAM) y CD99 en la transmigración paracelular, así como, la formación de estructuras conocidas como protrusiones tipo invadosoma (ILP) en la trasmigración transcelular (Dimasi *et al.*, 2013; Mayadas *et al.*, 2015).



#### 4.1.3 ACTIVACIÓN

Una vez en el tejido, los neutrófilos son activados por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que pueden ser del tipo endocítico; como el receptor desencadenante expresado en células mieloides (TREM-1) y los receptores de lectinas tipo C, siendo la más importante la Dectina-1; o pueden ser del tipo señalizador como los receptores tipo toll (TLRs), las proteínas de oligomerización de nucleótidos (NOD) y los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Mayadas *et al.*, 2015; Teng *et al.*, 2017).

Otros factores importantes para la activación de los neutrófilos son las opsoninas, moléculas que sirven para marcar a los patógenos; existen dos tipos, las inmunoglobulinas que se reconocen a través de los receptores FCYRs y el componente C3b del sistema del complemento que es reconocido a través de receptores específicos llamados CR3 y CR4 (Mayadas *et al.*, 2015; Teng *et al.*, 2017).

#### 4.1.4 FUNCIONES EFECTORAS

Después de su activación y dependiendo del estímulo, los neutrófilos llevan a cabo alguna de sus funciones efectoras (Fig. 4), por ejemplo, la estimulación de receptores del tipo endocítico o de receptores para opsoninas dispara el proceso llamado fagocitosis, en el cual se envuelven partículas grandes en vesículas formadas por la membrana plasmática, llamadas fagosomas, que se fusionan con gránulos ricos en proteasas y péptidos antimicrobianos para formar una sola vesícula llamada fagolisosoma en donde se lleva a cabo la destrucción del patógeno (Abbas *et al.*, 2006; Mayadas *et al.*, 2015).

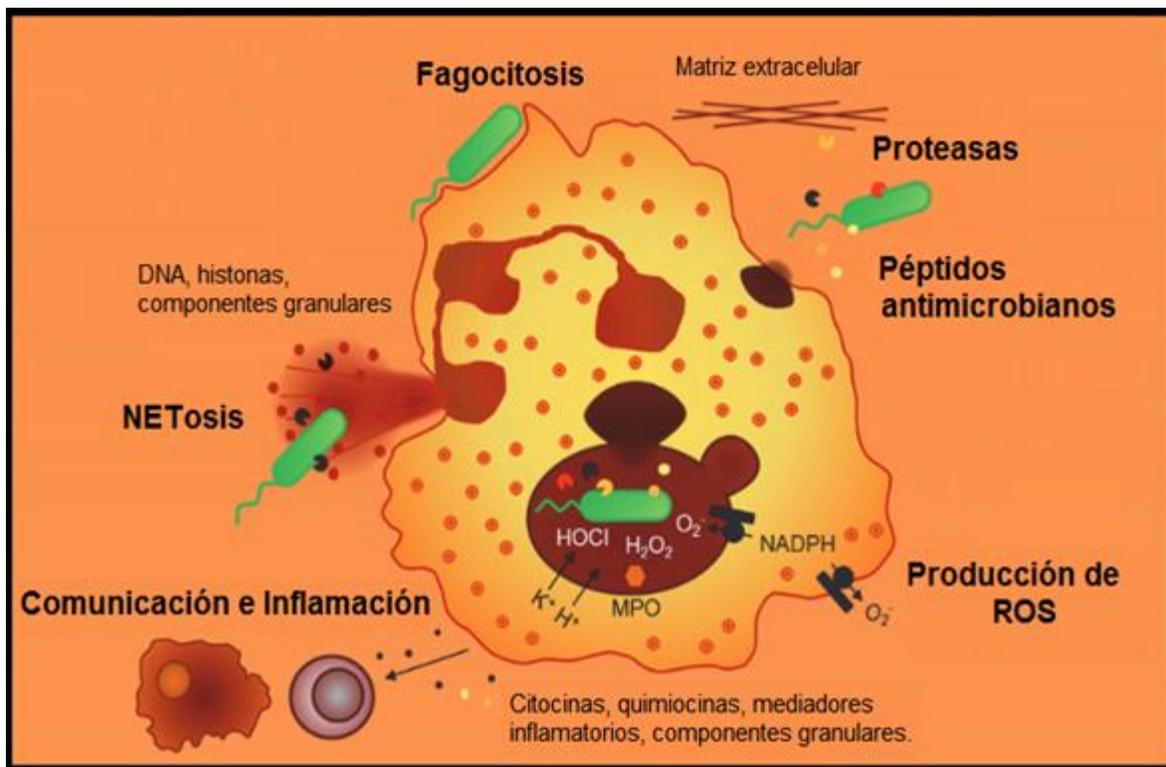


Figura 4. Funciones efectoras de los neutrófilos. Estas pueden ser: fagocitosis, degranulación, producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), liberación de moléculas de comunicación celular y liberación de trampas extracelulares (NETosis) (modificado de Kruger *et al.*, 2015).

Además de fusionarse al fagosoma, los gránulos también pueden ser liberados al medio extracelular en un proceso denominado degranulación. Existen cuatro tipos de gránulos:

- 1) Gránulos azurófilos o primarios: son los primeros en formarse dentro de la transición de promielocito a mielocito, tienen un alto contenido de mieloperoxidasa (MPO), elastasa, defensinas, catepsinas, entre otras (Cuadro 1) (Faurischou y Borregaard, 2003).
- 2) Gránulos específicos o secundarios: se forman después de los gránulos primarios en los mielocitos y metamielocitos, son ricos en lactoferrina, colagenasa e histaminasa (Cuadro 1) (Faurischou y Borregaard, 2003).
- 3) Gránulos de gelatinasa o terciarios: son los terceros en formarse dentro de la etapa de células en banda y células segmentadas, son ricos en gelatinasa y acetiltransferasa (Cuadro 1) (Faurischou y Borregaard, 2003).



- 4) Vesículas secretoras: son los últimos que se forman y se crean por endocitosis en las células segmentadas, por lo que pueden tener alto contenido de proteínas plasmáticas como la albumina (Faurischou y Borregaard, 2003).

Cuadro 1. Contenido granular y vesicular de neutrófilos (modificado de (Faurischou y Borregaard, 2003).

Gránulos azurófilos	Gránulos específicos	Gránulos de gelatinasa
Ácido mucopolisacárido	Colagenasa	Acetiltransferasa
Ácido $\beta$ -glicerolfosfatasa	CRISP-3 (SGP-28)	Arginasa-1
Azurocidicina	Gelatinasa	CRISP-3
BPI	hCAP-18	Gelatinasa
Catepsinas	Heparanasa	Lisosima
Defensinas	Histaminasa	$\beta_2$ -microglobulina
Elastasa	Lactoferrina	
Lysosimas	Lysosima	
MPO	Metaloproteinasas de matriz	
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidasa	NGAL	
Proteinsa-3	Sialidasa	
Sialidasa	Transcobalamina-I	
Ubiquitina	uPA	
$\alpha_1$ -antitripsina	$\beta_2$ -microglobulina	
$\alpha$ -manosidasa		
$\beta$ -glicerofosfatasa		

En general, por su facilidad de movilización, la liberación de vesículas secretoras se realiza con mayor facilidad, mientras que los gránulos primarios, secundarios y terciarios sólo se liberan en errores de la fagocitosis (Kobayashi; 2015; Mayadas *et al.*, 2015).

Otro mecanismo involucrado en la destrucción de patógenos en el fagosoma es la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS), producidas a partir del oxígeno por la NADPH oxidasa, capaz de formar aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Fig.5), que al interactuar con protones del medio forma peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ),



utilizado por la mieloperoxidasa (MPO) para formar ácido hipocloroso (HOCl) o puede reaccionar con el superóxido para formar radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ). Por otra parte, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es capaz de formar óxido nítrico (NO), molécula con propiedades similares a las ROS (Arazna *et al.*, 2015; El-Benna *et al.*, 2015; Mayadas *et al.*, 2015).

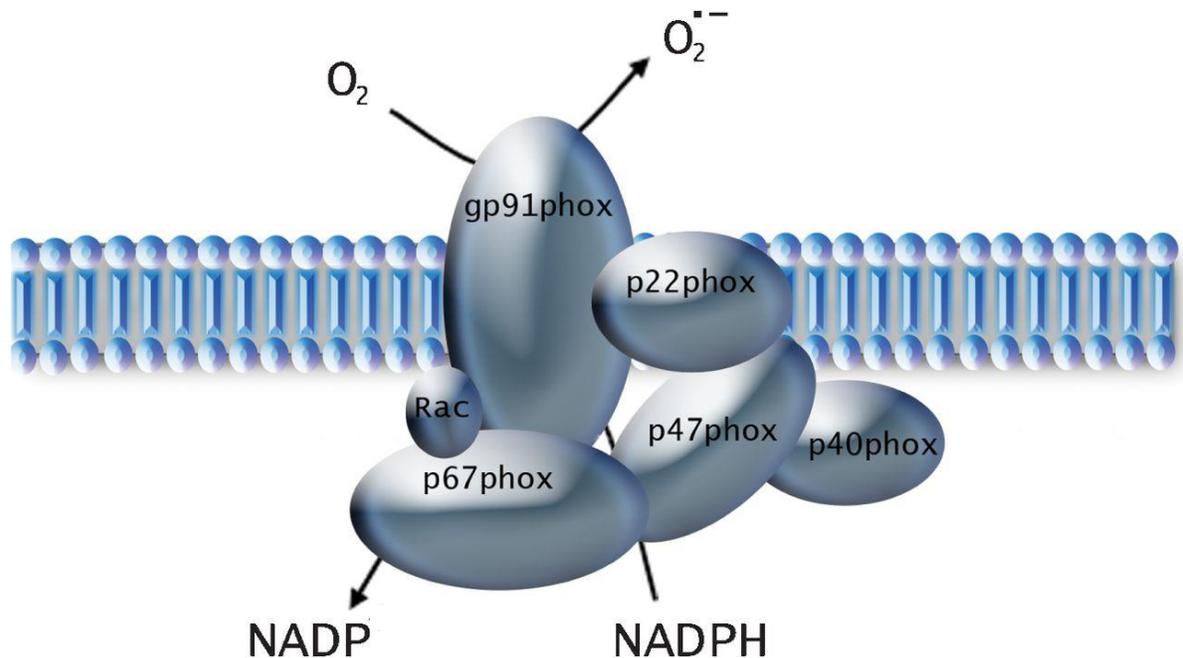


Figura 5. La NADPH oxidasa, está conformada por el heterodímero gp91 phox/ p22 phox unido a la membrana, además, otras subunidades como p67 phox, p47 phox, p40 phox y Rac se unen al activarse el neutrófilo, esta enzima oxida el NADPH para formar  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Ray y Shah, 2005).

En los últimos años se ha descubierto una nueva función efectora de los neutrófilos, la producción de trampas extracelulares de DNA (NETs). En este proceso los neutrófilos liberan una malla de fibras de cromatina acompañada de péptidos antimicrobianos como elastasa, MPO, catepsina G, lactoferrina, pentraxina 3, gelatinasa, proteinasa 3, entre otras. Hasta ahora se conocen tres tipos de NETosis:



- A) Suicida: mediada por TLR-4, 8 y 7; en su señalización participan la NADPH oxidasa (NOX), la proteína cinasa c (PKC) y el aumento de calcio citosólico, cofactor de la peptidil arginasa deaminasa (PAD4). En este proceso la liberación del material genético se da de dos a cuatro horas, además, se pierde la membrana nuclear a causa de la participación de ROS, MPO y elastasa (Mayadas *et al.*, 2015; Delgado-Rizo *et al.*, 2017).
- B) Vital independiente de ROS: la formación de NETs se da a través de la liberación de DNA en vesículas durante 5-60 min, en consecuencia, no hay pérdida de la membrana nuclear debido a que es independiente de ROS. Este proceso se desencadena a través de la estimulación de TLR-2 y 4, el receptor del complemento para la proteína C3 y la interacción de la proteína IB plaquetaria con CD18. Cabe destacar que después de la liberación del material genético, los neutrófilos aún son capaces de fagocitar y su viabilidad no se ve afectada (Mayadas *et al.*, 2015; Delgado-Rizo *et al.*, 2017).
- C) Vital dependiente de ROS: como su nombre lo dice es dependiente de la señalización de las especies reactivas del oxígeno, sin embargo, en este proceso no se ve involucrado el DNA nuclear, si no, el DNA mitocondrial. La formación de NETs tarda aproximadamente 15 min y se desencadena por el reconocimiento de LPS o C5a (Mayadas *et al.*, 2015; Delgado-Rizo *et al.*, 2017).

## 4.2 NEUTRÓFILOS EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

Además de jugar un papel importante en el combate de patógenos, los neutrófilos participan en diversas enfermedades; de las cuales, las más estudiadas son las de carácter agudo, donde, se sabe que en condiciones patológicas pueden generar algún tipo de daño (Mayadas *et al.*, 2015).



#### 4.2.1 INFLAMACIÓN AGUDA

En el daño pulmonar agudo, la participación de los neutrófilos es benéfica en caso de una infección bacteriana. Sin embargo, se ha comprobado que su reclutamiento es un sello distintivo de la enfermedad. Además, la liberación de productos antimicrobianos y ROS contribuyen al agravamiento de la enfermedad promoviendo daño en el epitelio alveolar, incremento de su permeabilidad y formación de edemas (Groommes y Soehnlein, 2011). Otro ejemplo es el caso del daño hepático agudo, donde, se ha descrito que el reclutamiento, activación y acumulación de neutrófilos es responsable del daño tisular en esta enfermedad, ya que, estos se unen a los hepatocitos y provocan su muerte por necrosis a través de la liberación de ROS y proteasas (Ramaiah y Jaeschke, 2007).

#### 4.2.2 INFLAMACIÓN CRÓNICA

Si bien, los neutrófilos han sido ampliamente relacionados con la inflamación aguda, en los últimos años diversos reportes indican que también tienen un papel importante en procesos que involucran la inflamación crónica y enfermedades autoinmunes.

Por ejemplo, en el lupus eritematoso sistémico, se han reportado un gran número de neutrófilos en los tejidos dañados, además se sabe que en médula ósea son una fuente importante de interferones de tipo I, factor activador de células B (BAFF) y el ligando inductor de proliferación A (APRIL), moléculas activadoras de linfocitos B y T (Smith y Kaplan, 2015).

Por otra parte, han surgido algunas observaciones polémicas que indican que los neutrófilos no sólo participan en el daño tisular, si no, que también pueden contribuir a la resolución de la inflamación; como en la enfermedad inflamatoria intestinal, donde, la migración de neutrófilos al epitelio de la mucosa se considera una marca de condiciones inflamatorias tanto en la colitis ulcerativa (CU) como en la enfermedad de Crohn (EC) (Chin y Parkos, 2006).



Además, en CU se sabe que la activación de los neutrófilos causa daño significativo en tejido, mientras que en EC neutrófilos defectuosos pueden no ser capaces de controlar la microbiota, dando lugar a inflamación descontrolada (Wéra *et al.*, 2016).

Sin embargo, se ha reportado que productos derivados de los neutrófilos son esenciales para mantener la homeostasis en el tejido, por ejemplo, la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) auxilia en la angiogénesis del tejido dañado y la regeneración de tejidos (Wéra *et al.*, 2016). Este papel dual se ha explicado con la aparición de distintas poblaciones de neutrófilos, promovidas por las diferentes condiciones en el microambiente.

#### 4.3 SUBPOBLACIONES DE NEUTRÓFILOS

En investigaciones recientes, principalmente en modelos de cáncer, se ha demostrado la presencia de dos poblaciones de neutrófilos denominadas N1 o anti-tumorales con actividad inflamatoria y N2 o pro-tumorales con actividad anti-inflamatoria (Fridlender *et al.*, 2009), así como, el reclutamiento de una subpoblación de células mieloides supresoras (MDSC) con fenotipo granulocítico (neutrófilos inmaduros) denominada G-MDSC (Youn *et al.*, 2008). Por otra parte, en un estudio que involucra el uso de un gradiente de densidad, se asocia a los neutrófilos N1 con la fracción de alta densidad (HDN) y a los neutrófilos N2 y G-MDSC con la fracción de baja densidad (LDN) (Fig. 6) (Sagiv *et al.*, 2015); destacando que su desarrollo es dependiente de TGF- $\beta$  (Fridlender *et al.*, 2009; Sagiv *et al.*, 2015; Uribe-Querol y Rosales, 2015); lo que sugiere que podría tratarse de subpoblaciones con características similares.

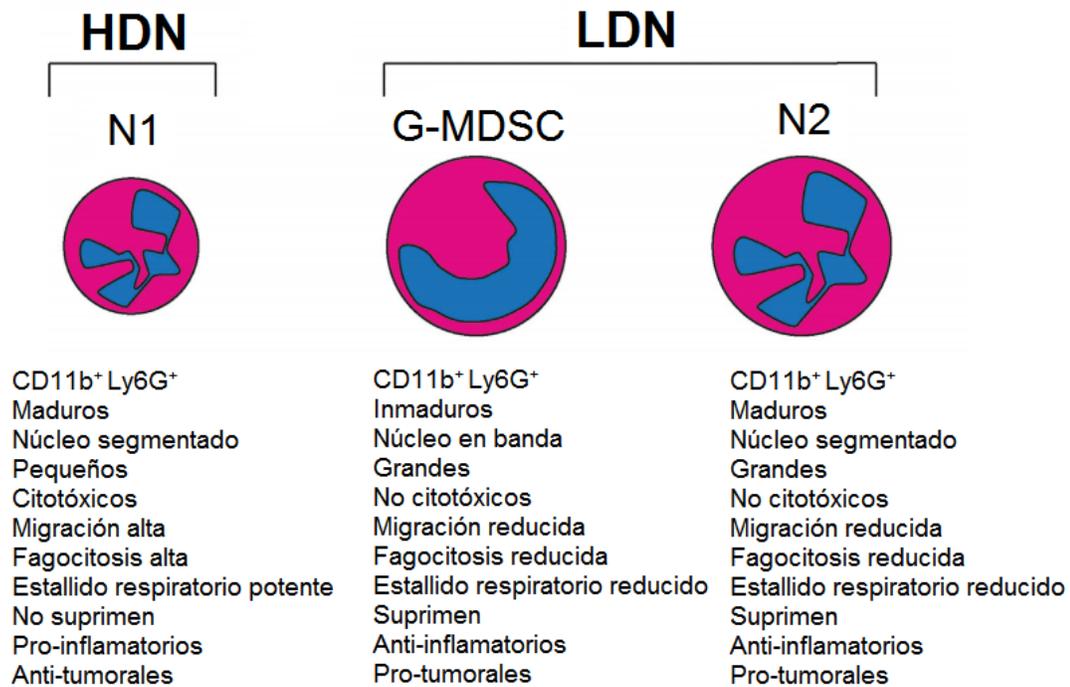


Figura 6. Subpoblaciones de neutrófilos y algunas de sus características (modificado de Sagiv *et al.*, 2015)

#### 4.3.1 NEUTRÓFILOS N1

En cuanto a las propiedades de ambas subpoblaciones, se sabe que los neutrófilos N1 pueden eliminar directamente a las células tumorales (Gerrard *et al.*, 1981; Katano y Torisu, 1982) mediante la liberación de ROS-HOCl (Dallegrì *et al.*, 1991) y metaloproteasa de matriz 8 (MMP-8) (Balbín *et al.*, 2003), así mismo, son capaces de inducir la apoptosis en las células malignas a través del ligando inductor de apoptosis del factor de necrosis tumoral (TRAIL) (Brincks *et al.*, 2013) y citotoxicidad mediada por anticuerpos, en un proceso similar al de las células NK (Wagner *et al.*, 2017). Por último, se ha reportado que estas células pueden reclutar y activar células T CD8<sup>+</sup> e inhibir el reclutamiento y polarización de neutrófilos N2 (Fig. 7) (Beauvillain *et al.*, 2007).

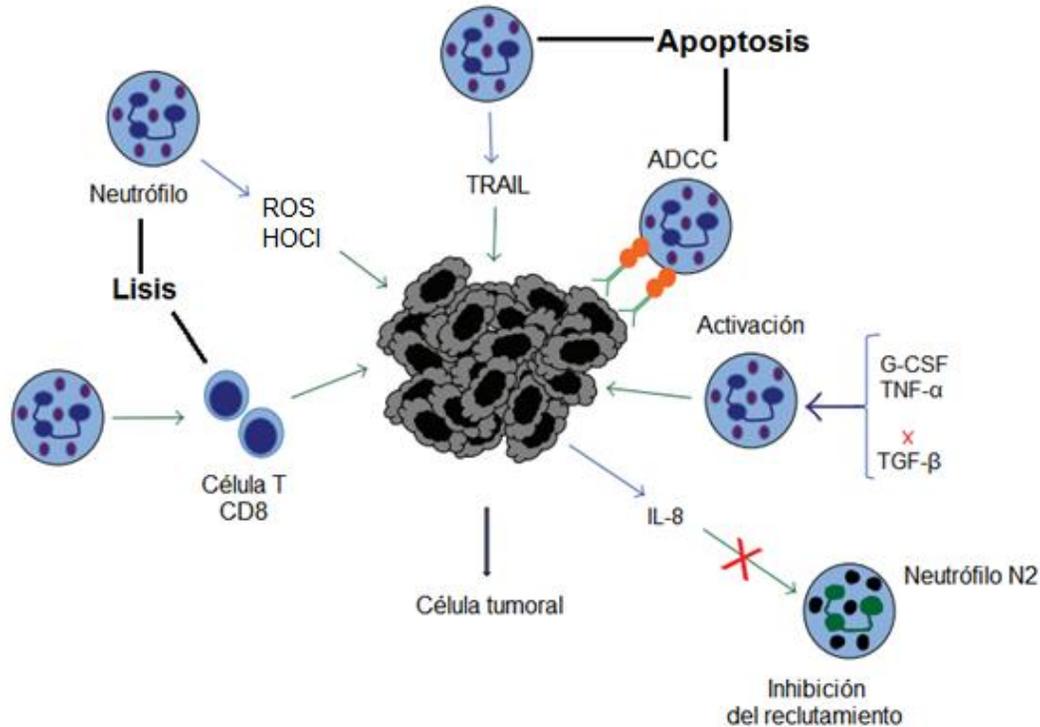


Figura 7. Neutrófilos N1 y sus principales características descritas en modelos de cáncer (modificado de Uribe-Querol y Rosales, 2015).

#### 4.3.2 NEUTRÓFILOS N2

Mientras que los neutrófilos N2, favorecen el crecimiento y desarrollo de tumores mediante la secreción de algunas moléculas como la elastasa que promueve la proliferación y migración de células tumorales, así como, la liberación de TGF- $\beta$  (Houghton *et al.*, 2010), la catepsina G, promotora de angiogénesis y migración tumoral (Yui *et al.*, 2014), la metaloproteasa de matriz 9 que favorece la angiogénesis a través de la degradación de la matriz extracelular y la liberación de (VEGF) (Coussens *et al.*, 2000). Por otra parte, las ROS promueven la síntesis de estas metaloproteasas, además, por su capacidad genotóxica son responsables de mutaciones genéticas y pueden inhibir la proliferación de linfocitos T CD8 (Schmielau y Finn, 2001) al igual que la arginasa 1 (Rotondo *et al.*, 2009). Finalmente, los neutrófilos son capaces de secretar algunas moléculas tipo citocinas como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Imai *et al.*, 2005) y oncostatina, molécula homóloga a la IL-6 que promueve la síntesis de VEGF (Goren *et al.*, 2006) (Fig. 8).

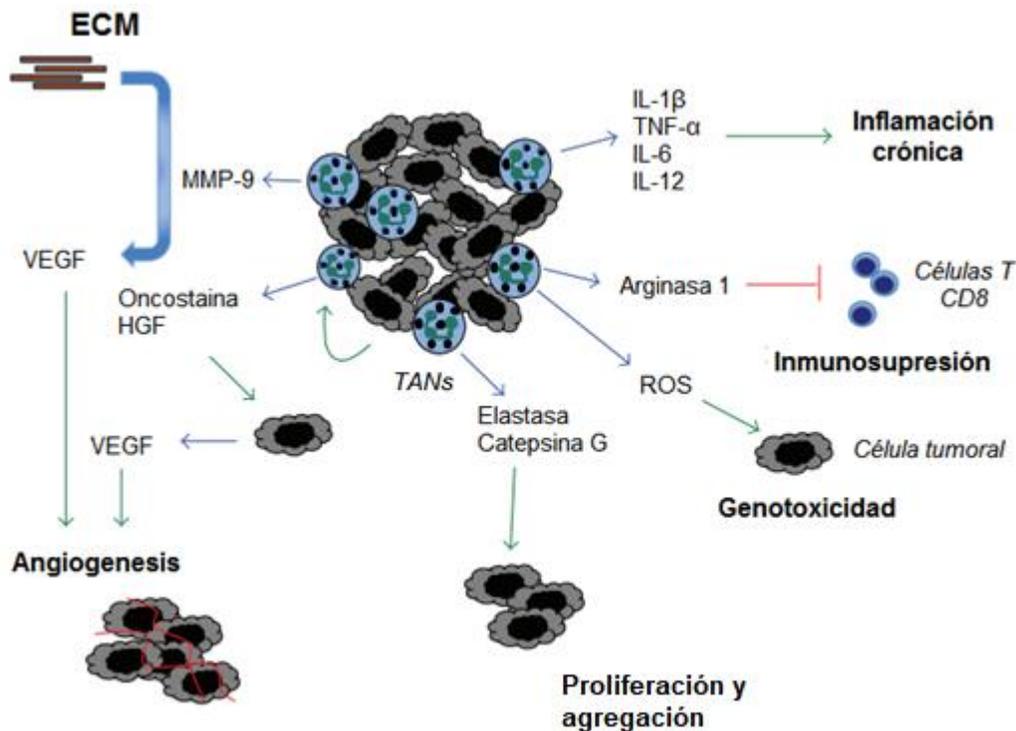


Figura 8. Neutrófilos N2 y sus principales características descritas en modelos de cáncer (modificado de Uribe-Querol y Rosales, 2015).

Por otra parte, se ha reportado la presencia de neutrófilos con fenotipo N2 en modelos de accidente cerebrovascular isquémico agudo (Cuartero *et al.*, 2013) e infarto al miocardio (Ma *et al.*, 2017). Así mismo la actividad anti inflamatoria de los neutrófilos ha sido reportada en diversos trabajos, por ejemplo, en un modelo *in vitro* se observó que los neutrófilos humanos promueven la polarización de los macrófagos a un perfil alternativo mediante la liberación de  $\alpha$ -defensinas (Miles *et al.*, 2015). Además, en un modelo murino de artritis reumatoide, se demostró que los neutrófilos del líquido sinovial son capaces de suprimir la proliferación de células T a través de un mecanismo óxido nítrico dependiente (Egelston *et al.*, 2012).

Finalmente, se ha reportado la presencia del ligando de muerte programada 1 (PDL-1), en neutrófilos humanos estimulados con IFN- $\gamma$  (Bankey *et al.*, 2010; Kleijn *et al.*, 2013), en neutrófilos provenientes de pacientes con lupus eritematoso sistémico (Luo *et al.*, 2016) y VIH (Bowers *et al.*, 2014).



#### 4.4 NEUTRÓFILOS EN INFECCIONES PARASITARIAS

A pesar de los reportes que exponen la capacidad que tienen los parásitos para modular la respuesta inmune y polarizar algunas poblaciones celulares, estos modelos han sido poco utilizados en el estudio de las subpoblaciones de neutrófilos. Sin embargo, algunos trabajos han considerado estos puntos, como el realizado en pacientes con leishmaniosis visceral, enfermedad causada por los parásitos intracelulares *Leishmania donovani* (India y Sudán) y *Leishmania infantum* (América del Sur), donde, se demuestra la presencia de una población de neutrófilos de baja densidad que expresa altos niveles de HLA-DR, CD80 y CD86, además de moléculas de supresión como PDL-1 (Sharma *et al.*, 2017). Por otra parte, en un modelo murino de la infección por el parásito helminto *Nippostrongylus brasiliensis*, se demostró el desarrollo de una subpoblación de neutrófilos N2 con la capacidad de promover la polarización de los macrófagos a un perfil alternativo a través de un proceso mediado por IL-10 e IL-13 (Chen *et al.*, 2014).

El conocimiento de los efectos que ejercen las infecciones por parásitos sobre el perfil de los neutrófilos puede ser aprovechado en el tratamiento de enfermedades relacionadas con una respuesta inmune exacerbada. Un modelo idóneo para este fin es el de *Taenia crassiceps*, donde, se ha demostrado que la infección con este parásito reduce la tumorigénesis asociada a colitis (León-Cabrera *et al.*, 2014), limita la patogénesis y liberación de citocinas proinflamatorias en la colitis ulcerativa (Ledesma-Soto *et al.*, 2015) y, además, sus antígenos son capaces de modular la encefalomiелitis experimental, a través de la reducción de la neuroinflamación y la promoción de un ambiente supresor (Peón *et al.*, 2017).



#### 4.5 TAENIA CRASSICEPS

*Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) es un céstodo cosmopolita endémico del hemisferio norte, incluyendo Europa, Norteamérica y Asia. El adulto cuenta con una longitud aproximada de 14 cm y 82 proglótidos, su escólex está conformado por cuatro ventosas ovales y un róstelo armado con 30 ganchos aproximadamente. Sus larvas miden de 4 a 5 mm y cuentan con un escólex de 17 ganchos y cuatro ventosas (Willms y Zurabian, 2017). En su forma adulta puede ser encontrado en el intestino delgado de cánidos, mientras que su estado larval se encuentra en la musculatura, cavidad pleural o peritoneal de roedores (Fig.9). Debido a su similitud con *Taenia solium* (Linnaeus, 1758) y a su capacidad de reproducirse asexualmente por gemación en su fase larval, *T. crassiceps* se ha convertido en uno de los mejores modelos experimentales para el estudio de infecciones parasitarias, además se considera inocuo para el ser humano, a excepción de algunos casos en donde pacientes inmunocomprometidos con cáncer, virus de inmunodeficiencia humana y de la hepatitis C, han sido infectados por este parásito (Peón *et al.*, 2013).

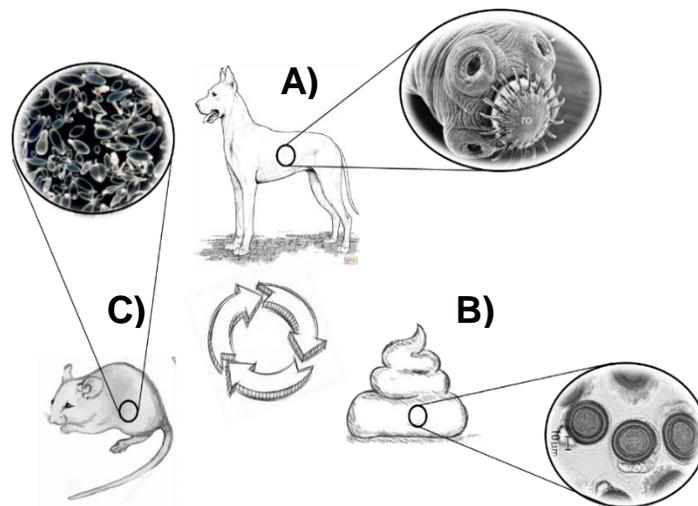


Figura 9. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. El adulto se encuentra en el huésped definitivo (A) quien a través de las heces expulsa proglótidos grávidos (B) que pueden ser ingeridos por el hospedero intermediario (C) donde se desarrolla la larva y puede reproducirse por gemación. Finalmente, para cerrar el ciclo, el huésped intermediario puede ser consumido por el huésped definitivo.



#### 4.6 RESPUESTA INMUNE FRENTE A *TAENIA CRASSICEPS*

Los estudios realizados en este modelo han revelado que la infección intraperitoneal, en infecciones agudas (2-3 semanas), provoca una respuesta del tipo Th1 transitoria; caracterizada por la presencia de IL-1 $\beta$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , NO e IgG2a. Sin embargo, en infecciones crónicas (después de cuatro semanas), es reemplazada por una respuesta del tipo Th2 cuyas principales características son el reclutamiento de eosinófilos, la síntesis de citocinas IL-4, IL-10, IL-13 y anticuerpos de isótipo IgG1, IgG4 e IgE (Fig. 10) (Terrazas *et al.*, 1998).

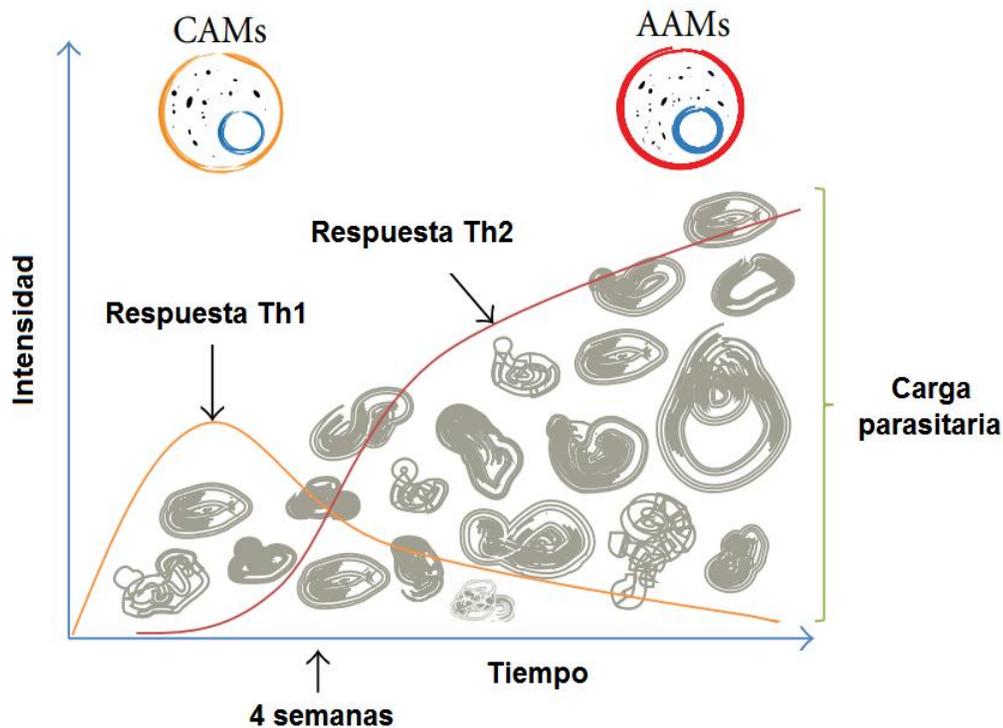


Figura 10. Respuesta inmune contra *Taenia crassiceps*. Al inicio de la infección la respuesta contra este parásito es del tipo Th1, sin embargo, a las cuatro semanas esta es reemplazada por una respuesta del tipo Th2, lo que favorece el desarrollo del parásito (modificado de Peón *et al.*, 2013).



El cambio en la respuesta inmune trae consigo el despliegue de distintas poblaciones de macrófagos, ya que, al inicio de la infección se ha observado la presencia de macrófagos clásicos (CAM/s), células que expresan óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y son capaces de secretar citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-23 y TNF- $\alpha$  (Peón *et al.*, 2013). Por otra parte, en la etapa crónica los macrófagos son del tipo alternativo (AAM/s), células que secretan altos niveles de IL-10 y TGF- $\beta$ , expresan marcadores como Arginasa 1, YM1, RELM $\alpha$  y presentan marcadores de membrana como PDL-1 y PDL-2 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002).

Así mismo, se ha reportado la presencia de otras poblaciones celulares como las Células Mieloides Supresoras o GR1<sup>+</sup> (Reyes *et al.*, 2010), que incluyen a las células Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> (monocitos) y Ly6C<sup>low</sup> Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos), sin embargo, estas poblaciones han sido poco estudiadas en el modelo de *T. crassiceps*.



---

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Los efectos que ejercen las infecciones por helmintos sobre el sistema inmune pueden ser aprovechado en el tratamiento de enfermedades relacionadas con una respuesta inmune exacerbada. Este tipo de respuesta implica el reclutamiento de un gran número neutrófilos, células altamente relacionadas con el daño tisular. Sin embargo, son pocos los trabajos que toman en cuenta la influencia de estas infecciones sobre los neutrófilos, por lo que es necesario estudiar esta relación tomando en cuenta los nuevos reportes que involucran la polarización de esta población celular.



---

## V. HIPÓTESIS

Los neutrófilos reclutados por la infección con *Taenia crassiceps* presentarán un fenotipo y función diferente al de los neutrófilos reclutados por un estímulo inflamatorio (peritonitis estéril).



---

## VI. OBJETIVOS

### 6.1 GENERAL

Caracterizar fenotípica y funcionalmente los neutrófilos reclutados por la infección con *Taenia crassiceps*.

### 6.2 PARTICULARES

- Realizar la cinética de reclutamiento de neutrófilos durante la infección por *T. crassiceps*.
- Analizar la presencia de moléculas como PDL-1, PDL-2, MCHII y CD86 en los neutrófilos reclutados por la infección con *T. crassiceps*.
- Determinar la producción de especies reactivas del oxígeno de los neutrófilos reclutados por la infección con *T. crassiceps*.
- Evaluar la capacidad supresora de los neutrófilos reclutados en la infección por *T. crassiceps*.
- Analizar el perfil de citocinas de los neutrófilos reclutados por un estímulo inflamatorio y por la infección con *T. crassiceps*.



## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### Ratones

Ratones hembra de la cepa BALB/c de seis a ocho semanas de edad fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; donde se mantuvieron en condiciones libres de patógenos hasta el día de su sacrificio, el cual se llevó a cabo en cámara de CO<sub>2</sub> siguiendo los procedimientos de cuidado y manejo animal establecidos por el Comité de Bioética de la Facultad y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Los ratones fueron divididos aleatoriamente en seis grupos, con cuatro ratones cada uno. El grupo control (sin estímulo), el grupo con peritonitis estéril y los grupos infectados con el helminto *T. crassiceps* durante dos días, dos, cuatro y ocho semanas.

### Infección experimental con *T. crassiceps*

Metacéstodos de *T. crassiceps* cepa ORF, se obtuvieron de la cavidad peritoneal de hembras BALB/c con ocho a diez semanas de infección y se lavaron cuatro veces con solución salina fisiológica estéril (SSF). La cisticercosis experimental fue inducida a través de la inyección intraperitoneal (i.p) de 20 cisticercos pequeños (aproximadamente 2 mm de diámetro) y que no presentaron gemación; utilizando como vehículo SSF.

### Peritonitis estéril

Se administraron 2 ml de medio de cultivo tioglicolato (SIGMA-ALDRICH) vía i.p. 15 h antes del sacrificio.

### Obtención de sangre periférica

Antes del sacrificio se obtuvo sangre de la cola de los ratones de cada grupo, colocándola en un tubo eppendorf con 50 µl de EDTA al 5 %.



### Extracción de células del exudado peritoneal

Las células del exudado peritoneal (PEC's) fueron obtenidas a través de lavados de la cavidad peritoneal de los diferentes grupos de ratones con SSF. El exudado se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. Posteriormente, la pastilla formada se resuspendió en medio de cultivo RPMI completo (suero bovino fetal (SBF) al 10 % y penicilina/estreptomicina). Finalmente, las células se contaron en cámara de Neubauer, evaluando su viabilidad por exclusión con azul de Tripano.

### Citometría de flujo

Para la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de las PEC's, se colocaron  $1 \times 10^6$  células en tubos para citometría (BD Falcon), se centrifugaron a 1 500 rpm durante 5 min, se les agregó 0.5  $\mu$ l de anti-CD16/32, para evitar un pegado inespecífico, disueltos en 25  $\mu$ l de buffer de FACS (PBS-SBF 0.5 %-azida de sodio 0.1 %) y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, cada muestra fue teñida con anticuerpos específicos de superficie (Cuadro 2), se incubaron durante 30 min a 4 °C y se lavaron con 1 ml buffer de FACS.

Cuadro 2. Anticuerpos para citometría de células de exudado peritoneal.

Anticuerpo	Conjugado	Marca		Cantidad ( $\mu$ l) $1 \times 10^6$
CD11b	Bv510	BioLegend	M1/70	0.2
Ly6C	PE Cy7	BioLegend	HK1.4	0.1
Ly6G	APC Cy7	BD	1A8	0.2
PDL-1	PE	Tonbo	10F.9G2	0.5
PDL-2	APC	BioLegend	TY25	0.5
MHCII	FITC	BioLegend	M5/114.15.2	0.5
CD86	PE	BioLegend	GL-1	0.5

Alofocianina (APC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) violeta brillante (BV)



Para la sangre periférica, se colocaron 50  $\mu$ l de sangre en tubos BD Falcon, se les agregó 0.5  $\mu$ l de anti-CD16/32 disueltos en 25  $\mu$ l de buffer de FACS y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, cada muestra fue teñida con anticuerpos específicos de superficie (Cuadro 3) y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Finalmente se agregaron 3 ml de solución hemolizante (Tis-HCl 0.15 M, NH<sub>4</sub>Cl 0.01 M, Ph 7.56), se incubaron durante 10 min y se lavaron dos veces con 1 ml de buffer de FACS.

Cuadro 3. Anticuerpos para citometría de sangre periférica.

Anticuerpo	Conjugado	Marca		Cantidad ( $\mu$ l) 1x10 <sup>6</sup>
<b>CD11b</b>	APC Cy7	BioLegend	M1/70	0.1
<b>Ly6C</b>	FITC	BioLegend	HK1.4	0.6
<b>Ly6G</b>	PE Cy7	Tonbo	1A8	0.2

Alofocianina (APC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)

Las muestras (20 000 eventos de la región 2) se leyeron en el equipo FACS Aria III con ayuda del software FACS Diva y fueron analizadas con el software FlowJo v10.1r7.

### Determinación de especies reactivas del oxígeno por citometría de flujo

Se colocaron 1x10<sup>6</sup> PEC's en tubos para citometría y se realizó la tinción para marcadores de superficie CD11b, Ly6G, Ly6C (Cuadro 4). Posteriormente, se colocó 1 ml de 2' 7' diacetato de diclorofluoresceína (5 mM) para marcar las ROS y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se lavó con 1 ml de buffer de FACS y se leyeron inmediatamente en el equipo FACS Aria III con ayuda del software FACS Diva.



Cuadro 4. Anticuerpos para citometría de células de exudado peritoneal.

Anticuerpo	Conjugado	Marca	Clona	Cantidad (µl) 1x10 <sup>6</sup>
CD11b	APC Cy7	BioLegend	M1/70	0.1
Ly6C	PE Cy7	BioLegend	HK1.4	0.6
Ly6G	PE	Tonbo	1A8	0.2

Alofococianina (APC), ficoeritrina (PE)

### Aislamiento de neutrófilos mediante gradiente de densidad

Para facilitar la separación de neutrófilos en el citometro de flujo, se enriqueció la muestra mediante un gradiente de densidad. Se colocaron 3 ml de percoll (1.129 g/ml) en un tubo falcon de 15 ml, posteriormente, se adicionaron 3 ml de Histopaque (1.077 g/ml) y 50x10<sup>6</sup> de células (provenientes de la peritonitis estéril y la infección de *T. crassiceps* durante dos días y ocho semanas) en 6 ml de medio RPMI completo y se centrifugaron a 2 000 rpm durante 30 min (Sagiv *et al.*, 2015). Finalmente se recuperaron las fracciones de baja y alta densidad y se analizaron mediante citometría de flujo (Cuadro 2).

### Aislamiento celular por citometría de flujo

Un millón de células recuperadas de la fracción de baja densidad del gradiente de densidad se colocaron en un tubo falcon de 15 ml, se lavaron con 1 ml de buffer de separación (PBS 1X-SBF 0.5%) y se incubaron con los marcadores CD11b, Ly6C y Ly6G durante 30 min a 4°C (Cuadro 5). Finalmente, las células positivas para estos marcadores fueron separadas con ayuda del equipo FACS Aria III. Las células aisladas fueron utilizadas en el ensayo de proliferación y los ensayos de RT-PCR.



Cuadro 5. Anticuerpos para aislamiento celular por citometría de flujo

Anticuerpo	Conjugado	Marca		Cantidad (µl) 1x10 <sup>6</sup>
CD11b	APC Cy7	BioLegend	M1/70	0.1
Ly6C	FITC	BioLegend	HK1.4	0.6
Ly6G	PE	Tonbo	1A8	0.2

Alofococianina (APC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)

### Ensayo de proliferación

Placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con 100 µl de anti CD3 a una concentración de 2 µg/ml (BioLegend, Clona:17A2) durante 24 h, posteriormente se colocaron 300 000 esplenocitos de un ratón sano en cada pozo y se incubaron en condiciones estándar durante 48 h, se agregaron 75 000 neutrófilos purificados y se incubaron 4 h en condiciones estándar. Finalmente, se agregaron 0.5 µCi de H<sup>3</sup> Timidina 18 h antes de las 72 h del cultivo, posteriormente se mantuvo en condiciones estándar para ser cosechada y leída 18 h después con ayuda de un lector de centelleo para identificar la H<sup>3</sup> Timidina incorporada.

### Determinación de citocinas y marcadores alternativos por RT-PCR

De las células provenientes de la separación celular por citometría de flujo, se realizó la extracción de RNA por el método fenol-cloroformo y se realizó la reacción de la transcriptasa reversa con ayuda del kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis. A partir de 1 µg de cDNA, se evaluaron las citocinas TNF-α, IL-10 y TGF-β y los marcadores alternativos Arginasa 1 y Ym-1 con ayuda del kit Amplificasa (BioTecMol) en las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización inicial: 94 °C durante 1 min.
2. Desnaturalización: 95 °C durante 30 s.
3. Alineamiento (Tm): Cuadro 6.
4. Extensión: 72 °C durante 30 s.
5. Elongación final: 72 °C durante 30 s.



Cuadro 5. Secuencias utilizadas en los análisis de RT-PCR.

Gen	Secuencia	Tm (°C)
<b>GAPDH</b>	F: TCG GTG TGA ACG GAT TTG CG R: CTC TTG CTC AGT GTC CTT GC	56
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	F: GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C R: ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G	59
<b>IL-10</b>	F: TGC TGC CTG CTC TTA CYG AC R: GGG GCA TCA CCT CTA CCA GG	56
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	F: GCC CTT CCT GCT CCT CAT R: TTG GCA TGG TAG CCC TTG	56
<b>Arg1</b>	F: CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG R: CAG ATA TGC AGG GAG TCA CC	54
<b>Ym1</b>	F: TCA CAG GTC TGG CAA TTC TTC TG R: TTT GTC CTT AGG AGG GCT TTC TC	56

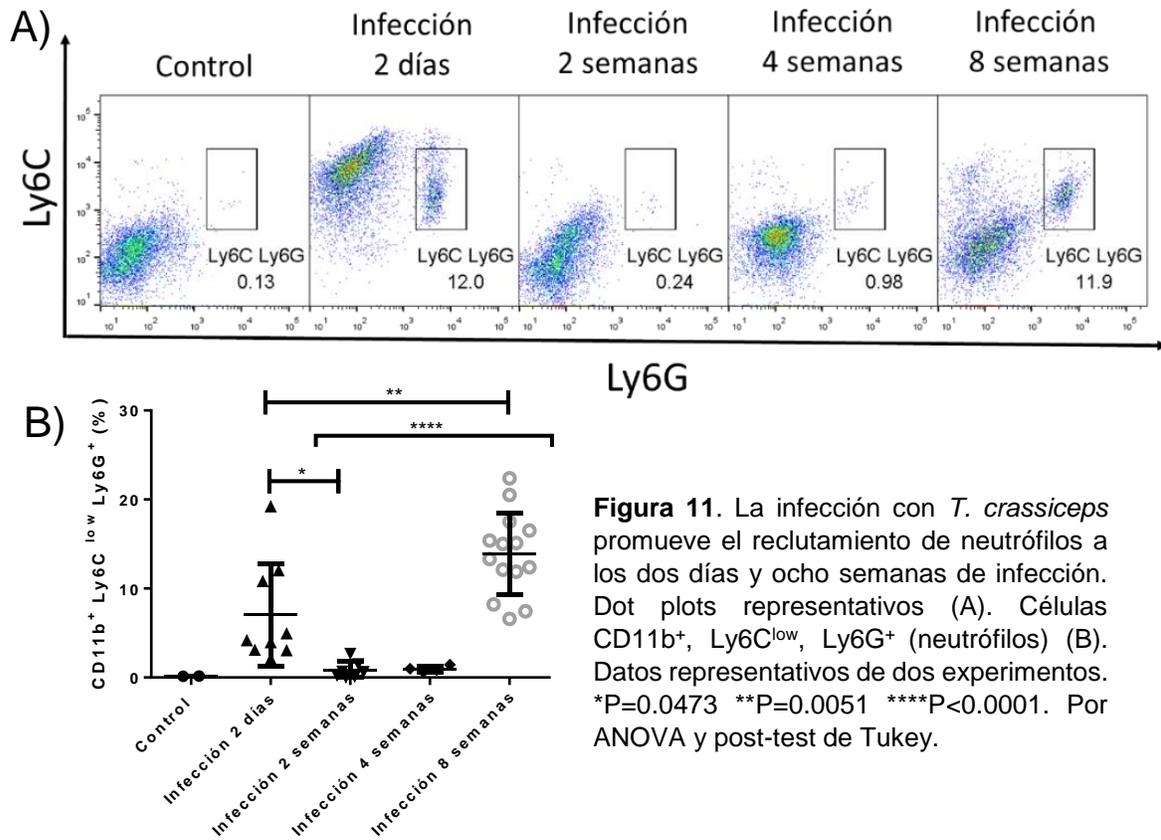
### Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba paramétrica ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) para la determinación de diferencias significativas y prueba de Tukey para identificar los grupos entre los que existen dichas diferencias. Lo anterior con ayuda del programa GraphPad Prism 6.



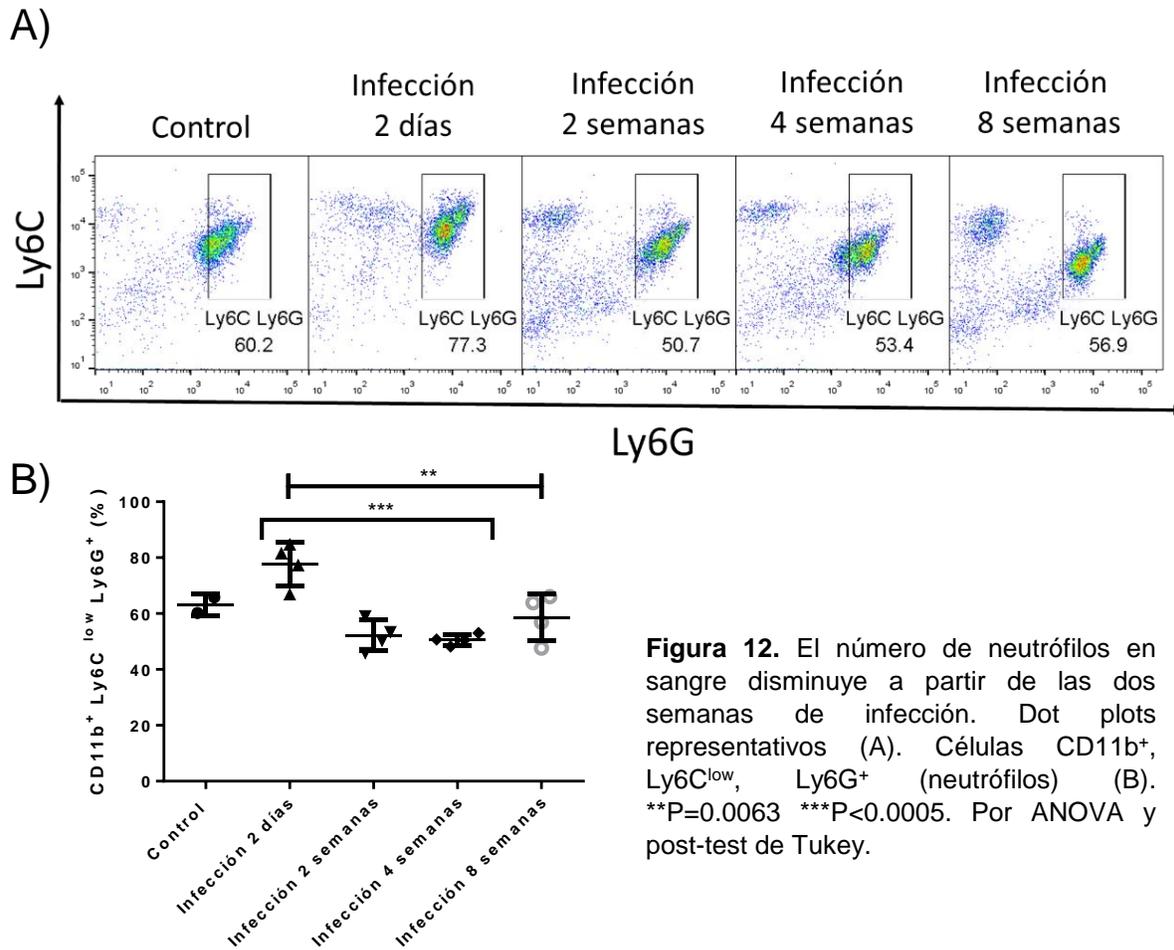
## VIII. RESULTADOS

Para conocer el comportamiento de los neutrófilos durante la infección con *T. crassiceps*, se realizó una curva de reclutamiento obteniendo las células de exudado peritoneal de los ratones con dos días, dos, cuatro y ocho semanas de infección. En ella se observó que a los dos días de infección el 7.02 % de células presentes en el peritoneo son neutrófilos, mientras que a las dos y cuatro semanas estas células no se encuentran presentes. Sin embargo, cabe destacar que a las ocho semanas de infección los neutrófilos son reclutados nuevamente constituyendo un 14 % de las células del peritoneo (Fig. 11).



**Figura 11.** La infección con *T. crassiceps* promueve el reclutamiento de neutrófilos a los dos días y ocho semanas de infección. Dot plots representativos (A). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) (B). Datos representativos de dos experimentos. \*P=0.0473 \*\*P=0.0051 \*\*\*\*P<0.0001. Por ANOVA y post-test de Tukey.

Con el fin de descartar anomalías en el porcentaje de neutrófilos presentes a nivel sistémico, estos fueron evaluados en sangre periférica. Observándose que, respecto al control, el número de neutrófilos aumenta un 10 % a los dos días de infección y disminuye 20 % a partir de las dos semanas (Fig. 12).



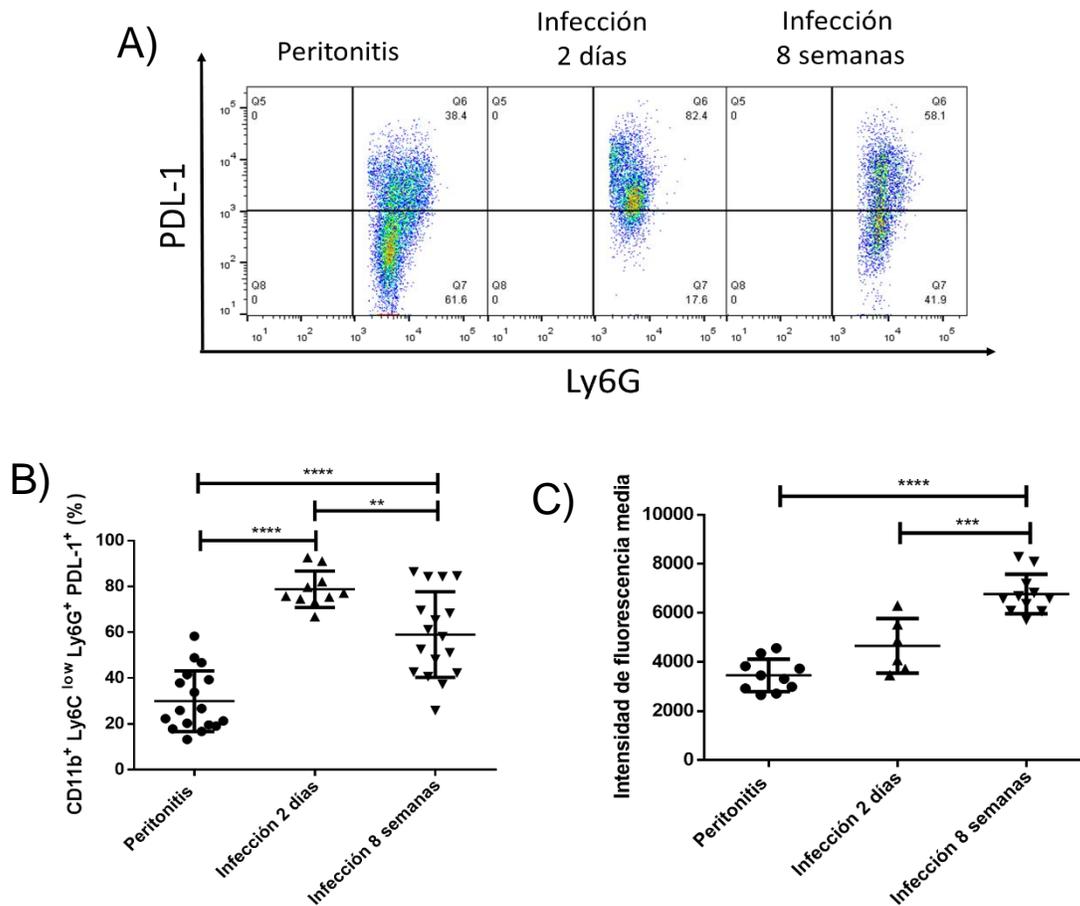
**Figura 12.** El número de neutrófilos en sangre disminuye a partir de las dos semanas de infección. Dot plots representativos (A). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) (B). \*\*P=0.0063 \*\*\*P<0.0005. Por ANOVA y post-test de Tukey.

Posteriormente, se evaluaron moléculas como PDL-1 y PDL-2 con el fin de determinar si la infección con *T. crassiceps* es capaz de activar diferentes fenotipos de neutrófilos, ya que, de acuerdo con la curva de reclutamiento, es posible identificar una población de neutrófilos asociada a la infección aguda (dos días) y otra asociada a la infección crónica (ocho semanas).

Porque, como se ha reportado, la respuesta inmune contra *T. crassiceps* se divide en dos etapas, la aguda característica por involucrar una marcada respuesta del tipo Th1 y la polarización de los macrófagos a su perfil clásico y la etapa crónica en donde se observa una respuesta del tipo Th2 y la polarización de los macrófagos a su perfil alternativo (Terrazas *et al.*, 1998; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002; Peón *et al.*, 2013).



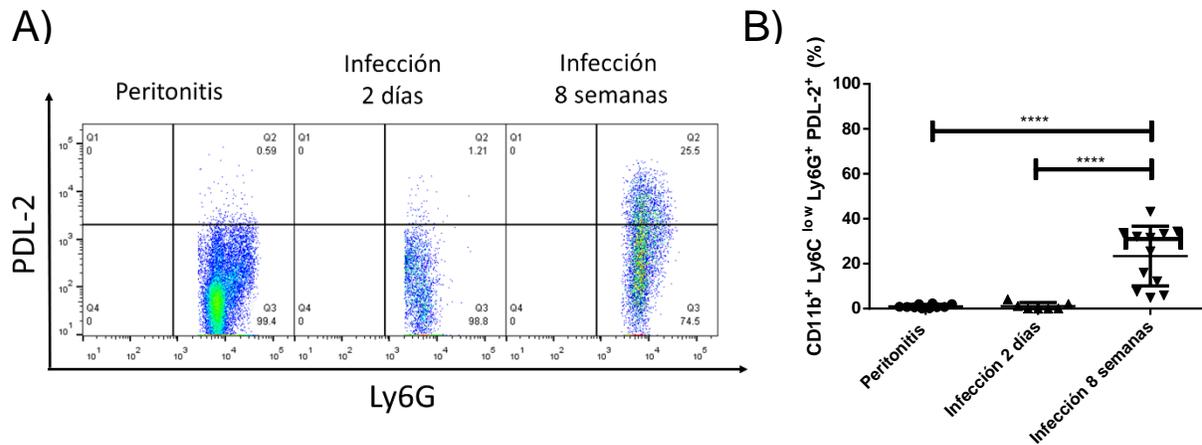
La primera de ellas fue el ligando de muerte programada 1 (PDL-1), molécula cuya presencia ha sido reportada previamente en neutrófilos (Bankey *et al.*, 2010; Kleijn *et al.*, 2013; Bowers *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2017). Se observó que, en comparación con un control de estímulo inflamatorio (30 %), la infección con *T. crassiceps* a los dos días (79 %) y ocho semanas (59 %) promueve el reclutamiento de un mayor porcentaje de neutrófilos que expresan dicha molécula (Fig. 13A y B). Además, de acuerdo con la intensidad de fluorescencia media, PDL-1 se presenta en mayor proporción en los neutrófilos provenientes de ratones con ocho semanas de infección (Fig. 13C).



**Figura 13.** La infección con *Taenia crassiceps* recluta un mayor porcentaje de neutrófilos que expresan PDL-1. Los neutrófilos reclutados a las ocho semanas de infección expresan mayor cantidad de dicha molécula. Dot plots representativos (A). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, PDL-1<sup>+</sup>; \*\*P=0.0047 \*\*\*\*P<0.0001 (B). Intensidad de fluorescencia media \*\*\*P=0.0001 \*\*\*\*P<0.0001 (C). Por ANOVA y post-test de Tukey. Datos representativos de tres experimentos.

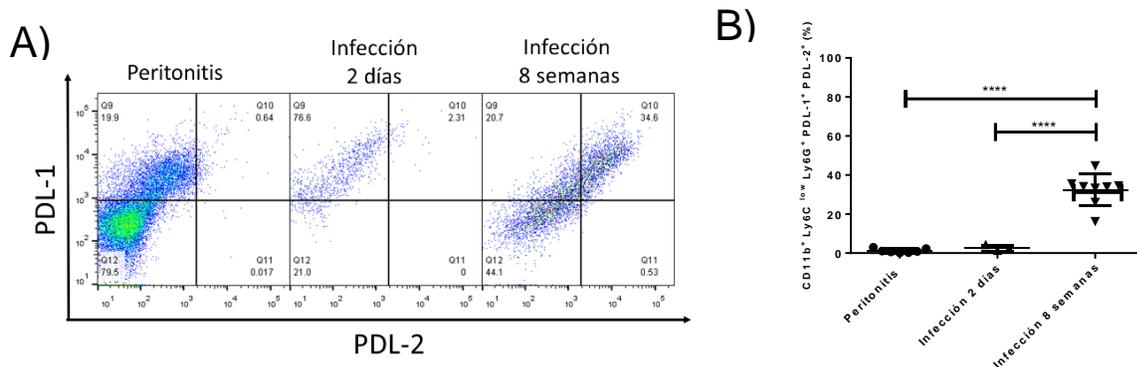


Otra molécula evaluada fue PDL-2, ligando inducible con las mismas funciones que PDL-1, cuya presencia nunca ha sido reportada en neutrófilos. Se observó que únicamente los neutrófilos reclutados a las ocho semanas de infección con *T. crassiceps* expresan dicha molécula (23 %) (Fig. 14).



**Figura 14.** Los neutrófilos reclutados a las ocho semanas de infección con *Taenia crassiceps* expresan PDL-2. Dot plots representativos (A). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, PDL-2<sup>+</sup>; \*\*\*\*P<0.0001 \*\*\*\*P<0.0001 (B). Por ANOVA y post-test Tukey Datos representativos de tres experimentos.

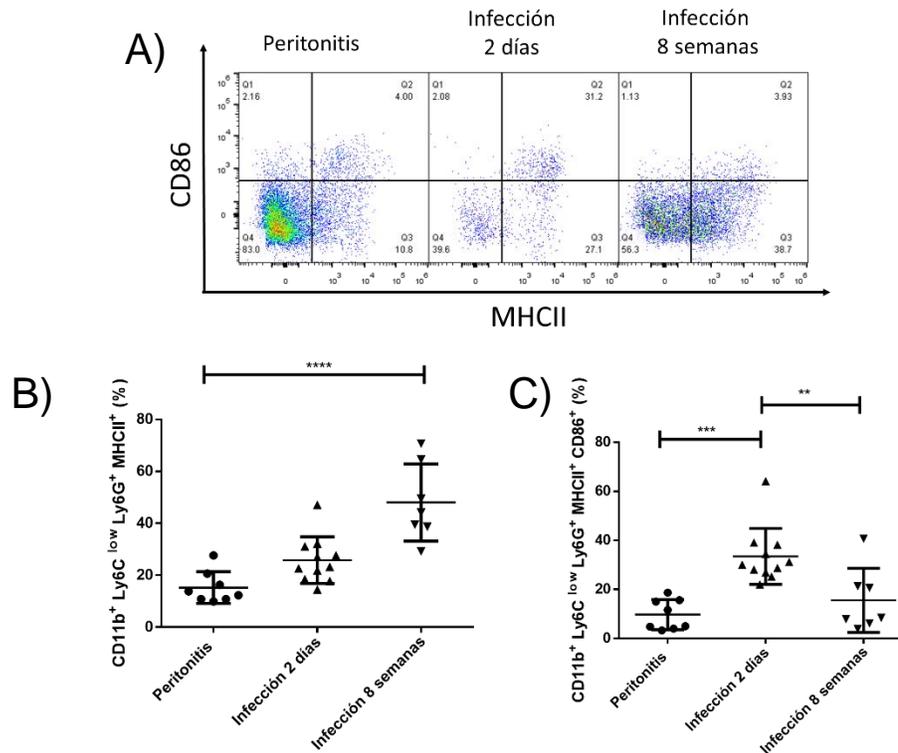
Por otra parte, para determinar si los neutrófilos reclutados a las ocho semanas de infección con *T. crassiceps* expresan simultáneamente PDL-1 y PDL-2, se realizó un análisis en donde se observó que el 35 % de los neutrófilos expresan ambas moléculas (Fig. 15)



**Figura 15.** Los neutrófilos reclutados a las ocho semanas de infección con *Taenia crassiceps* expresan PDL-1 y PDL-2. Dot plots representativos, células (A). CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, PDL-1<sup>+</sup>, PDL-2<sup>+</sup>; \*\*\*\*P<0.0001 (B). Por ANOVA y post-test Tukey. Datos representativos de tres experimentos.



Además, se evaluó MHCII y CD86, cuya expresión, ha sido reportada en neutrófilos de pacientes con leishmaniosis visceral (Sharma *et al.*, 2017) y se observó que el porcentaje de neutrófilos que expresan MHCII, en comparación con la peritonitis estéril (10 %) es mayor tanto en la infección de dos días (26 %) como en la infección de ocho semanas (32 %). Por otra parte, el ligando CD86 sólo es expresado en el 30 % de los neutrófilos reclutados a las dos semanas de infección con *T. crassiceps* (Fig. 16).

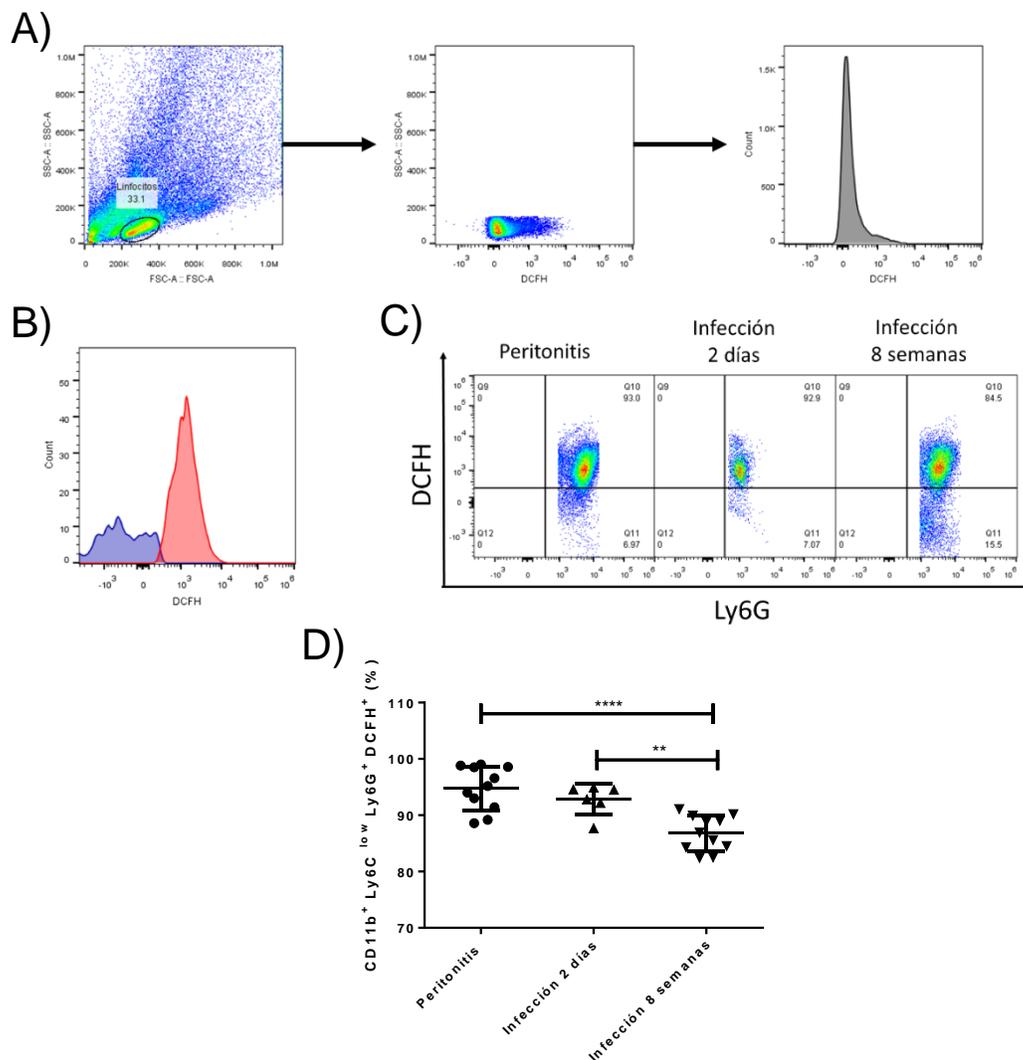


**Figura 16.** La infección con *Taenia crassiceps* recluta un mayor porcentaje de neutrófilos que expresan MHCII. Sin embargo, moléculas de coestimulación como CD86 sólo son expresadas a los dos días de infección. Dot plots representativos (A). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup> (B). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> \*\*\*P=0.001 \*\*\*\*P<0.0001 (C). Por ANOVA y post-test Tukey. Datos representativos de dos experimentos.

Otro mecanismo que puede ser afectado por un cambio en el fenotipo de los neutrófilos es la producción de especies reactivas del oxígeno, por lo que se evaluaron utilizando el método de la 2' 7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH), molécula que al ser oxidada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emite una señal a una longitud de onda máxima de 529 nm.



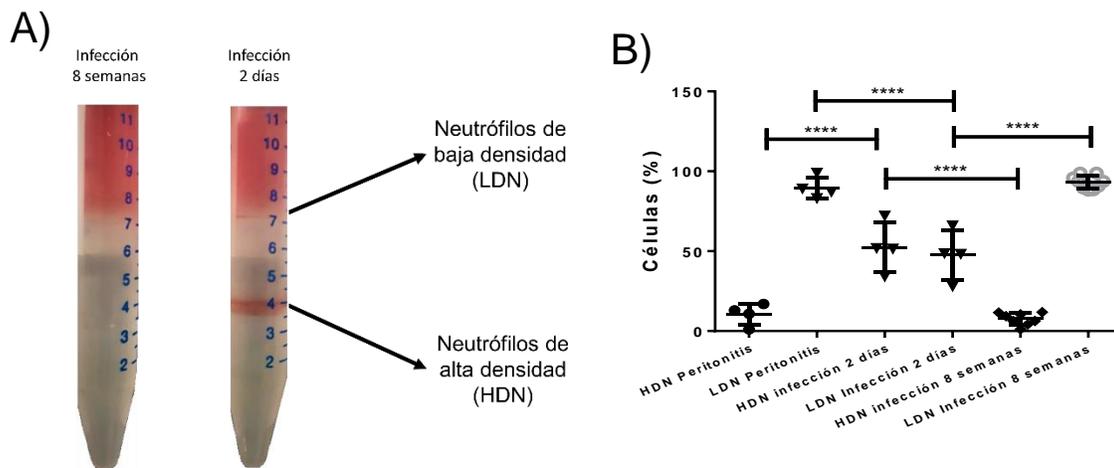
Utilizando como control negativo la región correspondiente a los linfocitos (Fig. 17A), se observó que en los tres estímulos es posible identificar células positivas y negativas para la prueba de DCFH (Fig. 17B), sin embargo, los porcentajes en los que estas se encuentran son variables (Fig. 17C). Cabe destacar que en comparación con la peritonitis estéril y con la infección con *T. crassiceps* durante dos días, la infección durante ocho semanas promueve la reducción de los neutrófilos productores de ROS en un 14 % (Fig. 17D).



**Figura 17.** La infección con *Taenia crassiceps* disminuye la producción de especies reactivas del oxígeno. Control negativo (A). Intensidad de fluorescencia media de la población positiva (rojo) y negativa (azul) para DCFH (B). Dot plots representativos (C). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, DCFH<sup>+</sup>. \*\*P=0.0075 (D). Por prueba de ANOVA. Datos representativos de dos experimentos.

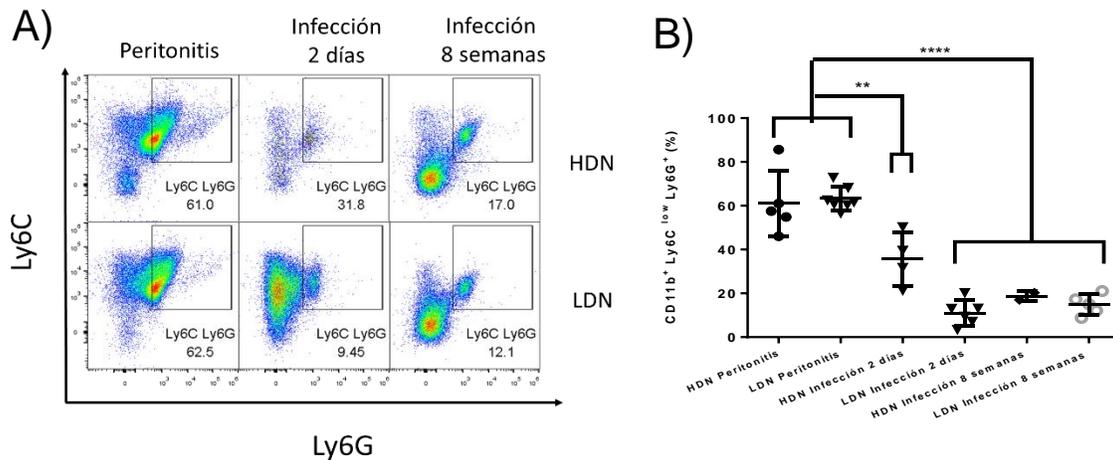


Una vez identificadas las diferencias entre los neutrófilos reclutados por los diferentes estímulos, estos fueron aislados mediante un gradiente de densidad (Sagiv *et al.*, 2015), donde se recuperaron dos fases, la de baja densidad (LDN) y la de alta densidad (HDN) (Fig. 18A). En esta separación, se observaron diferencias entre ambas porciones, destacando que, tanto en la peritonitis estéril como en la infección durante ocho semanas, la porción LDN contiene la mayoría de células reclutadas con un 89 y 93 %, respectivamente. Mientras que en la infección durante dos días la porción LDN únicamente contiene un 47 % de las células reclutadas (Fig. 18B).



**Figura 18.** Separación de neutrófilos por gradiente de densidad. Porciones LDN y HDN de células reclutadas por la infección con *T. crassiceps* durante dos días y ocho semanas (A). Porcentaje de células en las fracciones LDN y HDN de los diferentes tratamientos \*\*\*\*P<0.0001 (B). Datos representativos de dos experimentos. Por ANOVA y post-test Tukey.

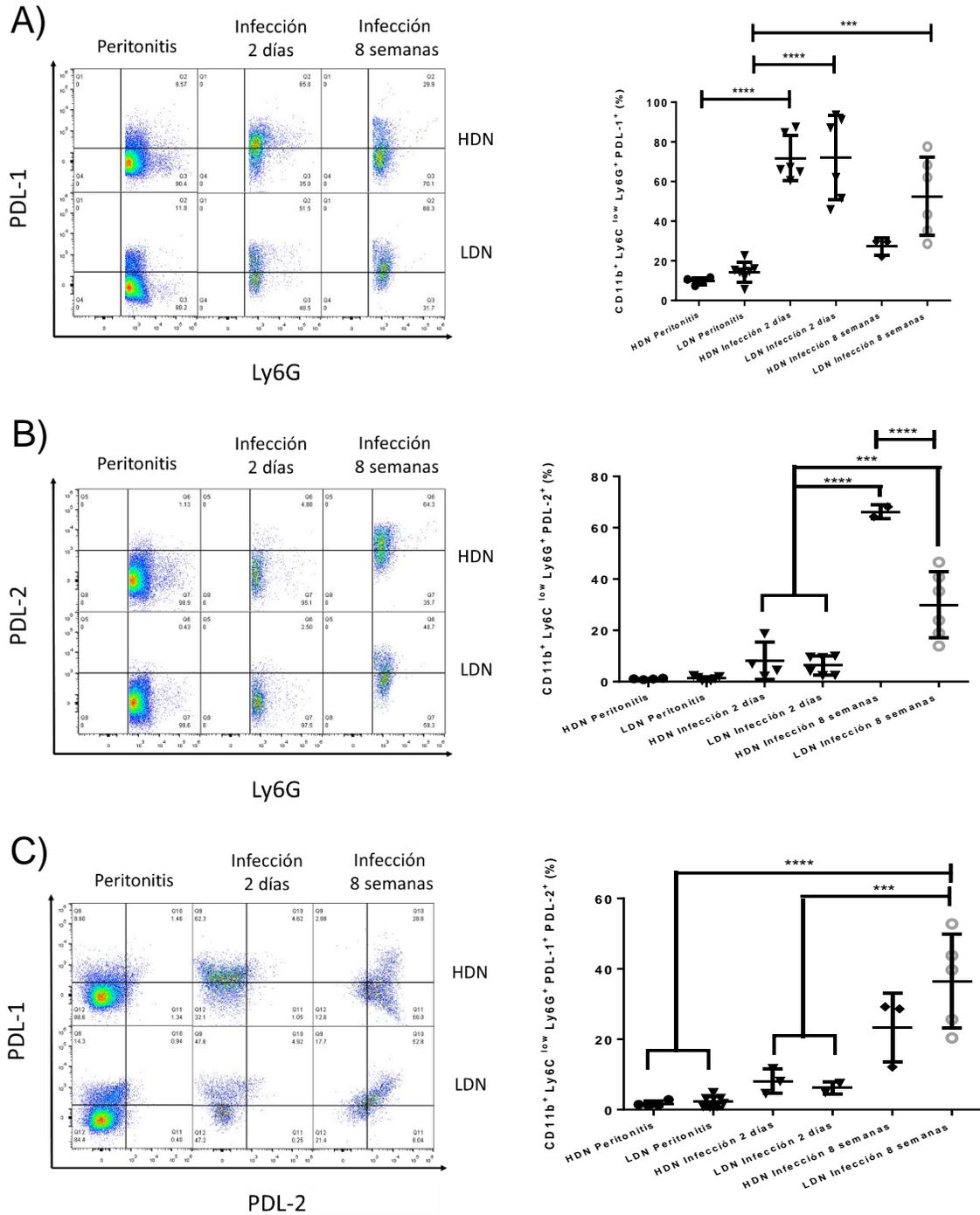
Posteriormente, las diferentes porciones fueron analizadas por citometría de flujo para comprobar el grado de pureza de neutrófilos en cada fracción, encontrándose que las fracciones LDN (63 %) y HDN (61 %) de la peritonitis estéril presentan el mayor grado de pureza, seguidos por la porción HDN de la infección durante dos días (35%). Finalmente, se determinó que las porciones HDN (18 %) y LDN (15 %) de la infección durante ocho semanas y la porción LDN de la infección durante dos días (9 %) contienen el menor número de neutrófilos (Fig. 19A y B).



**Figura 19.** Pureza de neutrófilos en las fracciones HDN y LDN de los diferentes tratamientos. Dot plots representativos (A). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) en las fracciones LDN y HDN de los diferentes tratamientos \*\*P=0.003 \*\*\*\*P<0.0001 (B). Datos representativos de dos experimentos. Por ANOVA y post-test Tukey.

Con el fin de comparar las porciones HDN y LDN de los diferentes grupos experimentales, se evaluaron los marcadores PDL-1 y PDL-2, MHCII y ROS por citometría de flujo, destacando que, en la infección durante dos días, el 71 % de ambas fracciones Ly6C de neutrófilos expresan PDL-1, porcentaje que se ve reducido tanto en la fracción HDN (27 %) como en la fracción LDN (52 %) de los neutrófilos reclutados a las ocho semanas de infección. Así mismo es importante destacar que en la peritonitis estéril, el porcentaje de neutrófilos que expresan PDL-1 varía entre 9-11 % en ambas porciones (Fig. 20A).

El marcador PDL-2 sólo es expresado de manera importante en la infección durante ocho semanas. Además, cabe destacar que en la porción HDN el 66 % de neutrófilos expresa dicha molécula, mientras que, en la porción LDN sólo el 30 % lo hace (Fig. 20B). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que sólo el 23 % de los neutrófilos pertenecientes a la fracción HDN expresan PDL-1 y PDL-2 simultáneamente, mientras que en la porción LDN lo hacen un 36% (Fig. 20C).

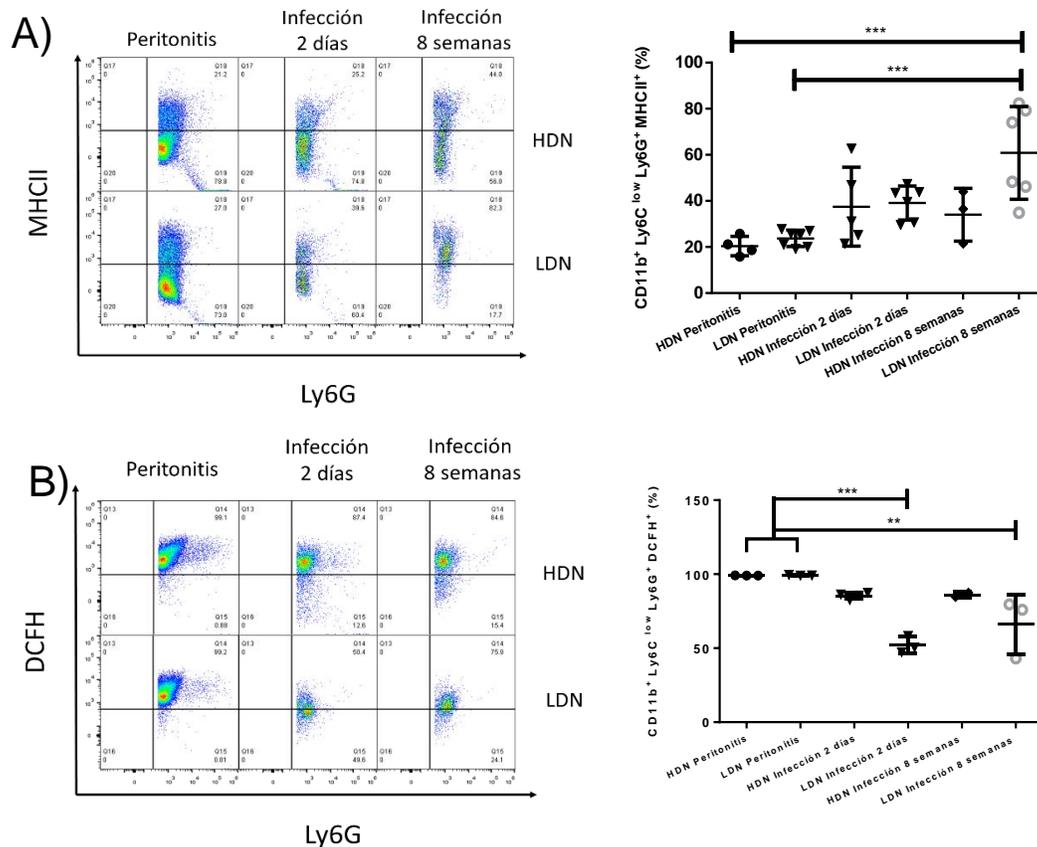


**Figura 20.** Los neutrófilos de las fracciones HDN y LDN de los distintos tratamientos presentan diferencias en la expresión de PDL-1 y PDL-2. Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, PDL-1<sup>+</sup>. (A) Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, PDL-2<sup>+</sup>. (B) Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, PDL-1<sup>+</sup>, PDL-2<sup>+</sup> (C) \*\*\*P=0.003 \*\*\*\*P<0.0001. Por ANOVA y post-test Tukey. Datos representativos de dos experimentos.



Se observó que la infección con *T. crassiceps* promueve la expresión de la molécula de presentación de antígeno MHCII, a los dos días como a las ocho semanas. Sin embargo, es importante destacar que el 60 % los neutrófilos de la fracción LDN de la infección durante ocho semanas expresan dicha molécula (Fig. 21A).

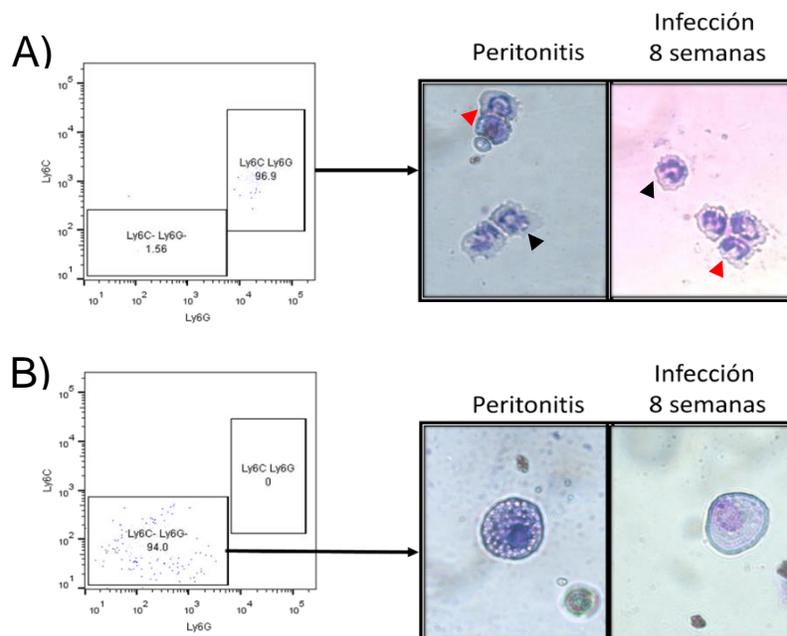
La producción de ROS presenta diferencias importantes, principalmente, en las fracciones LDN de ambos tiempos de infección; donde se observa que a los dos días de infección el porcentaje de neutrófilos productores de ROS disminuye en un 48 %, mientras que a las ocho semanas lo hace en un 33 %. Por el contrario, en la peritonitis estéril, el 99 % de neutrófilos de ambas porciones son productores de ROS (Fig. 21B).



**Figura 21.** Los neutrófilos de las fracciones HDN y LDN de los distintos tratamientos presentan diferencias en la expresión de MHCII y la producción de ROS. Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup> (A). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, DCFH<sup>+</sup> (B). \*\*P=0.005 \*\*\*P=0.0002. Por ANOVA y post-test Tukey. Datos representativos de dos experimentos.



Como se observó, no es posible aislar neutrófilos mediante un gradiente de densidad, debido a que en ambas porciones se encontró una gran cantidad de monocitos (células Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup>) (Fig. 19), sin embargo, este método puede ser complementado por otras técnicas. Bajo este esquema y por las diferencias encontradas en ambas porciones, se separaron neutrófilos de la porción LDN de todos los tratamientos mediante aislamiento celular por citometría de flujo (Cell Sorting), logrando un 96.9 % de pureza (Fig. 22). Se realizó un cytopspin para comprobar que las células separadas son neutrófilos, observándose distintos estados de maduración y morfología de dichas células (Fig. 22).

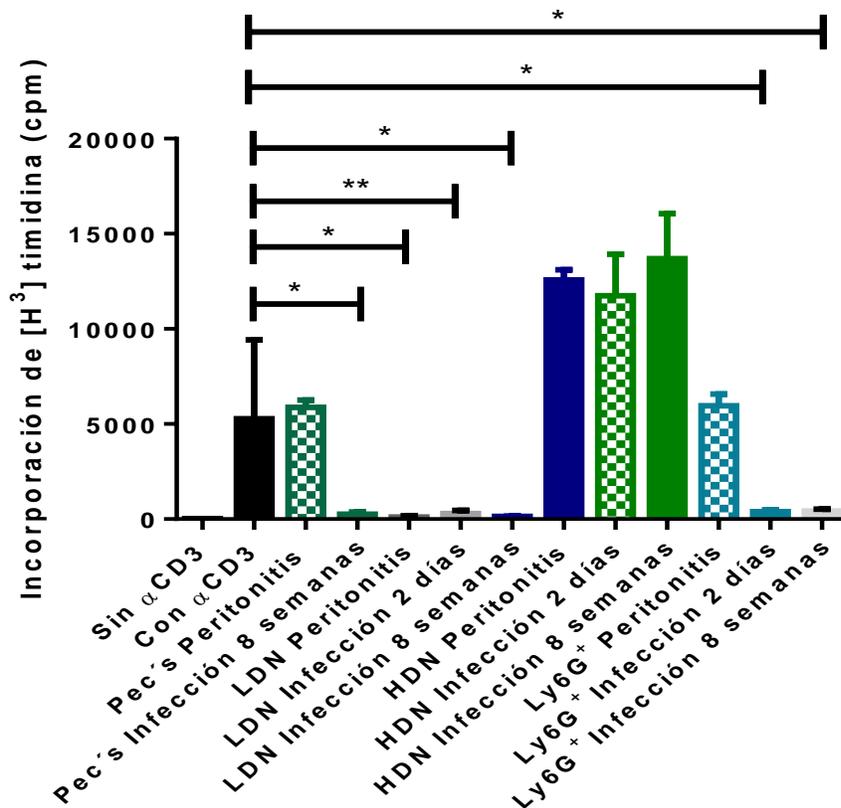


**Figura 22.** Separación de neutrófilos por citometría de flujo. Neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>low</sup>, Ly6G<sup>+</sup>) maduros con núcleo segmentado (negro) e inmaduros con núcleo en banda (rojo) (A). Células CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>-</sup> (B).

Los neutrófilos purificados fueron utilizados en un ensayo de proliferación para determinar si son capaces de suprimir la activación de células T. En este, se observó que los neutrófilos aislados de la infección durante dos días y ocho semanas son capaces de suprimir la proliferación de dichas células, mientras que los neutrófilos aislados de la peritonitis estéril no tienen esta capacidad. Además, se comprobó que las células totales provenientes de la peritonitis estéril no son

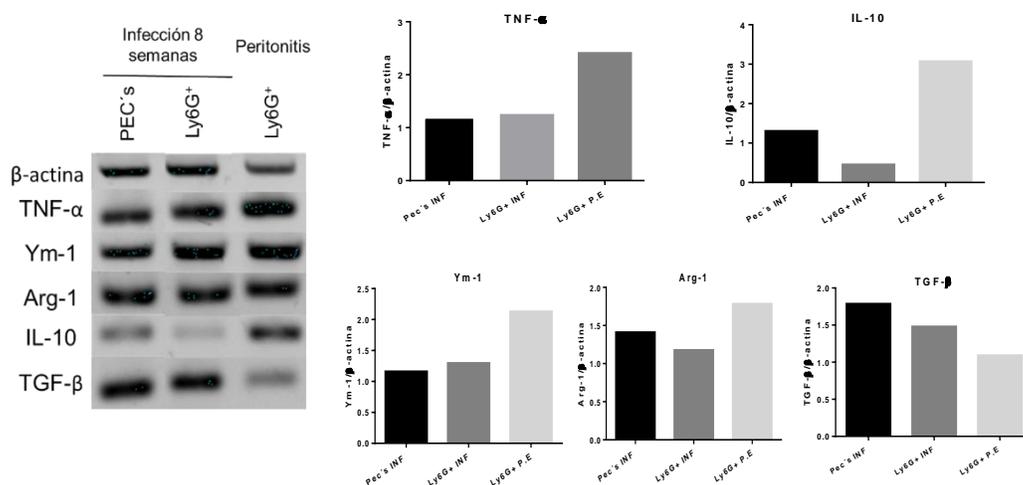


capaces de suprimir la proliferación, mientras que las células de la infección durante ocho semanas con *T. crassiceps* si tiene esta capacidad. Por otra parte, se evidencio que las células de las porciones LDN de todos los estímulos tienen capacidad supresora, mientras que las porciones HDN tienen el efecto contrario (Fig. 23).



**Figura 23.** Ensayo de proliferación por incorporación de [H<sup>3</sup>] timidina. \*P=0.03 \*\*P=0.01. Por ANOVA y post-test Tukey. Datos representativos de dos experimentos.

Finalmente, una porción de los neutrófilos purificados se utilizó para identificar diferencias en su RNA mensajero, identificando que, los neutrófilos provenientes de la peritonitis estéril presentan más mensajero para TNF-α, IL-10, Ym-1 y Arg-1, mientras que los neutrófilos de las ocho semanas de infección presentan más mensajero para TGF-β (Fig. 24).



**Figura 24.** Los neutrófilos de la peritonitis estéril y la infección durante ocho semanas presentan diferencias en la síntesis de RNA mensajero para diferentes citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-10 y TGF- $\beta$ ) y marcadores alternativos (Arg-1 y Ym-1).



## IX. DISCUSIÓN

Como reportaron Reyes y colaboradores en el 2010, la infección con *T. crassiceps* tiene la capacidad de reclutar macrófagos y células Gr1<sup>+</sup>, las cuales pueden dividirse en células Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> (monocitos) y células Ly6C<sup>low</sup> Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) (Rose *et al.*, 2012). Como se observó, la infección con *T. crassiceps* a las dos y cuatro semanas destaca por la ausencia de neutrófilos (Fig. 11), la cual, podría ser explicada con ayuda del proceso llamado eferocitosis, en donde, se observó que la apoptosis de los neutrófilos es un auxiliar en la resolución de la inflamación, además de promover la polarización de los macrófagos a un perfil alternativo (Mallary y Greenlee-Wacker, 2016). Esto coincide con lo reportado por Rodríguez-Sosa y colaboradores en 2002, donde, observa que a partir de la cuarta semana de infección el número de macrófagos alternativos aumenta de manera interesante. Así mismo, trabajos como el de Miles y colaboradores en 2009, reportan que los neutrófilos tienen la capacidad de polarizar a los macrófagos a su perfil alternativo en un proceso regulado por la apoptosis, mientras que Chen y colaboradores en 2014, observaron que en la infección por *Nippostrongylus brasiliensis* los neutrófilos juegan un papel importante en la polarización de los macrófagos al secretar IL-10 e IL-13.

La reducción de los neutrófilos en sangre a partir de las dos semanas de infección (Fig. 12) se podría relacionar con la producción y reclutamiento de neutrófilos porque como lo menciona Smith en 2007, la eferocitosis promueve la liberación de IL-23, reduciendo la producción de IL-17 y G-CSF, lo que deriva en una baja producción de neutrófilos y reducción en la liberación de quimocinas como CXXL1, CXCL2 y CXCL5. Por otra parte, el hecho de volver a encontrar neutrófilos a las ocho semanas de infección (Fig. 11), abre la posibilidad de que estos hayan sufrido un cambio de fenotipo como el que ha sido reportado en macrófagos por Rodríguez-Sosa y colaboradores en el 2002, tomando como primicia el fenómeno reportado por Terrazas en 1998, en donde la respuesta inmune contra *T. crassiceps* se divide en Th1 en tiempos agudos y Th2 en tiempos crónicos.



Bajo este esquema, se midieron diferentes moléculas en los neutrófilos, donde, destaca el aumento de PDL-1 a los dos días de infección (Fig. 13), lo que podría relacionarse con los trabajos realizados por Bankey y colaboradores en 2010 y de Klejin y colaboradores en 2013, donde, se observó que IFN- $\gamma$ , citocina característica de una respuesta del tipo Th1, promueve la expresión de dicha molécula en neutrófilos. Además, esto coincide con lo reportado por Sharma en el 2016, quien indica que los neutrófilos provenientes de pacientes con leishmaniosis visceral expresan altos niveles de PDL-1.

Es importante mencionar que únicamente los neutrófilos reclutados a las ocho semanas de infección expresan PDL-2, ligando cuya presencia nunca ha sido reportada en neutrófilos. Sin embargo, algunos reportes como el de Zhang y colaboradores en 2006, indican que esta molécula es de carácter inducible y se presenta en procesos crónicos. Además, como sucede en los macrófagos (Rodríguez-sosa *et al.* 2002), el ambiente Th2 podría favorecer la expresión de dicho ligando en los neutrófilos.

Otros marcadores encontrados en neutrófilos de la infección por *T. crassiceps*, fueron la molécula de presentación de antígeno MHCII y la de coestimulación CD86; sin embargo, cabe destacar que sólo en el grupo de dos días de infección estos se expresaron simultáneamente, mientras que a las ocho semanas de infección sólo se expresó MHCII (Fig. 16), por lo que es necesario realizar ensayos para comprobar la funcionalidad de estos marcadores. Porque como reportaron Sharma y colaboradores en 2016, a pesar de que los neutrófilos provenientes de pacientes con leishmaniosis visceral expresan MHCII, CD80 y CD86, estos no son capaces de presentar antígeno.

Una de las principales funciones efectoras de los neutrófilos es la liberación de ROS, moléculas ampliamente relacionadas con la genotoxicidad y daño tisular durante procesos que involucran la respuesta inmune exacerbada. Se observó que, a las ocho semanas de infección, el número de neutrófilos que producen ROS disminuye (Fig. 17). Sin embargo, es importante comprobar que implicaciones tiene



esta reducción, ya que autores como Schmielau y Finn en 2001 relacionan a las ROS con la oxidación de la cadena  $\zeta$  del receptor CD3, lo que deriva en la inhibición de la proliferación de las células T CD8.

Una vez establecidas las diferencias entre los neutrófilos de los diferentes tiempos de la infección con *T. crassiceps* y la peritonitis estéril, se aislaron los neutrófilos mediante un gradiente de densidad como lo reportaron Sagiv y colaboradores en 2015, donde, de igual forma se encontraron dos fracciones, la de baja densidad (LDN) y la de alta densidad (HDN). Sin embargo, en la infección con *T. crassiceps* las proporciones de estas fracciones varía de acuerdo al tiempo de la infección, destacando que existe un mayor porcentaje de células HDN en la infección durante dos días (Fig. 18). Por otra parte, Sagiv y colaboradores en 2015 reportan que entre el 82 y 98 % de células presentes en las fracciones HDN y LDN, son neutrófilos. Sin embargo, en el presente estudio se observó que el máximo grado de pureza obtenido fue de 60 %, debido a la presencia de monocitos (Fig. 19).

Nuevamente se evaluaron las moléculas anteriormente analizadas para comprobar si existían diferencias entre fracciones, los cambios más evidentes se observaron en PDL-2, donde la porción HDN de la infección durante 8 semanas presenta mayor cantidad de dicha molécula. Sin embargo, es importante destacar que no se expresa simultáneamente con PDL-1, al contrario de los neutrófilos de la porción LDN (Fig. 20), esto sugiere que como reportan Sagiv y colaboradores en 2015, los neutrófilos de la porción HDN pudieran estar atravesando por un proceso de polarización, lo cual puede ser comprobado mediante la evaluación de la producción de TGF- $\beta$ , tal como lo reportan Houghton y colaboradores en 2010 y Sagiv y colaboradores en 2015.

Los cambios en la producción de ROS fueron más drásticos, destacando la reducción en la porción LDN de las células reclutadas por la infección con *T. crassiceps* (Fig.21), lo que sugiere una menor actividad inflamatoria, sin embargo, es necesario realizar los ensayos pertinentes para comprobarlo.



Una vez comprobadas las diferencias fenotípicas entre los neutrófilos de ambas fracciones, se evaluó la funcionalidad de estos. Debido a sus características, se decidió trabajar sólo con la porción LDN, ya que, la presencia de moléculas de supresión en su superficie, sugieren que son neutrófilos con perfil N2. La purificación de neutrófilos se realizó mediante citometría de flujo y como lo reportó Sagiv y colaboradores en 2015 la fracción LDN puede contener neutrófilos inmaduros con núcleo en banda y neutrófilos maduros con núcleo segmentado (Fig. 22).

Cómo pudo observarse, únicamente los neutrófilos de la infección con *T. crassiceps* fueron capaces de suprimir la proliferación de las células T (Fig. 23). Por otra parte, resulta de gran importancia dilucidar el mecanismo de supresión por el cual estos están actuando, ya que como han reportado varios autores, esto puede ser por liberación de ROS (Schmielau y Finn, 2001), NO (Egelston *et al.*, 2012), Arginasa-1 (Rotondo *et. al* 2009) o por expresión de PDL-1 (Sharma *et.al*, 2016).

Se evaluaron distintas citocinas características de las repuestas Th1 como TNF- $\alpha$  y de la respuesta Th2 como IL-10 que contrario a lo reportado por Chen y colaboradores en 2015, este se encuentra en menor proporción en neutrófilos provenientes de la infección, sin embargo, es importante destacar que se evaluó el RNA mensajero, lo que hace necesario la evaluación de estas citocinas mediante una técnica más exacta.

Se analizaron marcadores alternativos como Ym-1 y Arg-1, cuya presencia fue reportada por Ma y colaboradores en 2015 y que coincide con lo obtenido en el presente estudio. Además, los resultados obtenidos refuerzan la posibilidad de que el mecanismo de supresión de estos neutrófilos sea a través de Arginasa-1, tal como lo reportó Rotondo en 2009.

Se evaluó el mensajero para TGF- $\beta$ , marcador de neutrófilos N2 reportado por Houghton y colaboradores en 2010 y Sagiv y colaboradores en 2015 y se encontró una mayor presencia del mensajero en neutrófilos provenientes de la infección durante ocho semanas, lo que indica que estos neutrófilos pudieran estar polarizados a su perfil N2.



Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la infección con *Taenia crassiceps* recluta neutrófilos que expresan diferentes moléculas de supresión y activación de la respuesta inmune adaptativa. Además, fue posible identificar una población de neutrófilos de baja densidad capaz de suprimir la proliferación de células T. Por otra parte, resulta de gran relevancia la ausencia de estas células durante las dos y cuatro semanas de infección. Por lo que se hace necesaria la explicación de diversos fenómenos. Además, se proponen nuevos marcadores para la caracterización de una población supresora de neutrófilos como PDL-2, inducido en una infección parasitaria.



## X. CONCLUSIONES

1. La infección con *T. crassiceps* recluta neutrófilos a los dos días y ocho semanas.
2. *T. crassiceps* induce la expresión de PDL-1 en neutrófilos reclutados a los dos días de infección, mientras que en los reclutados a las ocho semanas induce la expresión de PDL-1 y PDL-2.
3. Los neutrófilos reclutados a los dos días de infección con *Taenia crassiceps* expresan MHCII y CD86, mientras que los reclutados a las ocho semanas solo expresan MHCII
4. En comparación con la infección a los dos días y la peritonitis estéril, la infección durante ocho semanas con *T. crassiceps* recluta un menor porcentaje de neutrófilos que producen especies reactivas del oxígeno.
5. Las proporciones de las fracciones HDN y LDN varía entre los dos días de infección y ocho semanas de infección con *T. crassiceps*.
6. Los neutrófilos purificados de la infección de dos días y ocho semanas tienen la capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T, en comparación con los neutrófilos reclutados en la peritonitis estéril.
7. Los neutrófilos reclutados por la infección con *Taenia crassiceps* presentan cambios en el RNA mensajero de TNF- $\alpha$ , IL-10, Ym-1, Arg-1 y TGF- $\beta$ .



---

## XI. PERSPECTIVAS

1. Evaluar marcadores de apoptosis y reclutamiento de neutrófilos para explicar el fenómeno observado a las dos y cuatro semanas de infección con *T. crassiceps*.
2. Analizar la funcionalidad de las moléculas MHCII y CD86 en neutrófilos reclutados durante la infección con *T. crassiceps*.
3. Explicar el mecanismo de supresión de los neutrófilos reclutados por la infección con *T. crassiceps*.
4. Comprobar si los antígenos excretados/secretados de *T. crassiceps* (TcES) tienen el mismo efecto sobre los neutrófilos.
5. Realizar estudios que evalúen el comportamiento de los neutrófilos en modelos que involucren la modulación de enfermedades inflamatorias mediante la infección con *T. crassiceps* y sus TcES.



## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A., A. Litchman, y Pallai S. 2006. *Inmunología Celular y Molecular*. 6ta ed. Elsevier. España: 552pp.

Arazna, M., Pruchniak M. P. y Demkow U. 2015. Reactive oxygen species granulocytes and NETosis. *Medicine Biology* 2015 (1): 1–7.

Balbín, M., Fueyo A., Tester A. M., Pendás A. M., Pitiot A. S., Astudillo A., Overall C. M., Shapiro S. D. y López-Otín C. 2003. *Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice*. *Nature Genetics* 35 (3): 252–57.

Bankey, P. E., Banerjee S., Zucchiatti A., De M., Sleem R. W., Lin F. L., Miller-Graziano C. L. y De A. K. 2010. *Cytokine induced expression of programmed death ligands in human neutrophils*. *Immunology Letters*. 129 (2): 100–107.

Beauvillain, C., Delneste Y. y Scotet M. 2007. *Neutrophils efficiently cross-prime naive t cells in vivo*. *Blood* 110 (8): 2965–2973

Borregaard, N. 2010. *Neutrophils, from marrow to microbes*. *Cell Immunity* 33 (5): 657–70.

Bowers, N. L., Helton E. S., Huijbregts R. P. H., Goepfert P. A., Heath S. L. y Hel Z. 2014. *Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1 / PD-1 pathway*. *PLoS Pathogens* 10 (3): 1–9.

Bugl, S., Wirths S., Martin R. M. y Radsak M. P. 2012. *Current insights into neutrophil homeostasis*. *Annals New York Academy of Sciences* 1266 (2): 171–78.

Brincks, E. L., Risk M. C. y Griffi T. S. 2013. *PMN and antitumor immunity the case of bladder cancer immunotherapy*. *Seminars in Cancer Biology* 23 (3): 183–189.

Chen, F., Wu W., Millman A., Craft J. F., Chen E, Patel N., Boucher J. L., Jr J. F. U., Kim C. C y Gause W. C. 2014. *Neutrophils prime a long-lived effector*



*macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion.* Nature Immunology 15 (10): 938–48.

Chin, A. C. y Parkos C. A. 2006. *Neutrophil transepithelial migration and epithelial barrier function in IBD.* Annals New York Academy of Sciences 287 (3): 276–87.

Coussens, L. M., Tinkle C. L., Hanahan D. y Werb Z. 2000. *MMP-9 supplied by bone marrow – derived cells contribute to skin carcinogenesis.* Cell Press 103 (1): 481–90.

Cowland, J. B. y Borregaard N. 2016. *Granulopoiesis and granules of human neutrophils.* Immunological Reviews 273 (5): 11–28.

Cuartero, M. I., Ballesteros I., Moraga A., Nombela F., Vivancos J., Hamilton J. A., Corbí A.L., Lizasoain I. y Moro M. A. 2013. *N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke.* Stroke 44 (1): 3498–3508.

Dallegri, F., Ottonello L. y Ballestrero A. 1991. *Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil delivered oxidative attack and role of leukocyte function associated antigen 1.* Inflammation 15 (1): 15–30.

Delgado-Rizo, V.; Martínez-Guzmán A., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Narro A. y Fafutis-Morris M. 2017. *Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview.* Frontiers Immunology. 8 (81): 1–20.

Dimasi, D., Sun W. Y. y Bonder C. S. 2013. *International immunopharmacology neutrophil interactions with the vascular endothelium.* International Immunopharmacology 17 (4): 1167–75.

Egelston, C., Kurkó J., Besenyei T., Trynieszewska B., Rauch T. A., Glant T. T. y Mikecz K. 2012. *Suppression of dendritic cell maturation and t cell proliferation by synovial fluid myeloid cells from mice with autoimmune arthritis.* Arthritis Rheum 64 (10): 3179–88.



El-Benna, J., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Jean-Claude M., Gougerot-Pocidaló M. A. y Dang P. 2016. *Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation*. *Immunological Reviews* 273 (1): 180–93.

Faurischou, M. y Borregaard N. 2003. *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. *Microbes and Infection* 5 (1): 1317–27.

Fridlender, Z. G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G. S. y Albelda S. M. 2009. *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN*. *Cancer Cell* 16 (3): 183–94.

Gerrard, T. L., Cohen D. J. y Kaplan A. M. 1981. *Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells*. *Journal of the National Cancer Institute* 66 (3): 483–488

Goren, I., Ka H., Mu E., Schiefelbein D., Pfeilschifter J. y Frank S. 2006. *Oncostatin M Expression Is Functionally Connected to Neutrophils in the Early Inflammatory Phase of Skin Repair: Implications for Normal and Diabetes-Impaired Wounds*. *Journal of Investigative Dermatology* 126 (1): 628–637.

Grommes, J. y Soehnlein O. 2011. *Contribution of neutrophils to acute lung injury*. *Molecular Medicine* 17 (4): 293–307.

Houghton, A. M., Rzymkiewicz D. M., Ji H., Gregory A. D., Egea E. E., Metz H. E. y Stolz D. B. 2010. *Neutrophil elastase – mediated degradation of irs-1 accelerates lung tumor growth*. *Nature Medicine* 16 (2): 219–23.

Imai, Y., Kubota Y., Yamamoto S., Tsuji K., Shimatani M., Shibatani N., Takamido S., Matsushita M. y Okazaki K. 2005. *Neutrophils enhance invasion activity of human cholangiocellular carcinoma and hepatocellular carcinoma cells: an in vitro study*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 20 (1): 287–93.

Katano, M. y Torisu M. 1982. *Neutrophil-mediated tumor cell destruction in cancer ascites*. *Cancer* 50 (1): 62–68.

Kleijn, S. D., Langereis J. D., Leentjens J., Kox M., Netea M. G., Koenderman L., Ferwerda G., Pickkers P. y Hermans P. W. 2013. *IFN- $\gamma$ -stimulated neutrophils*



*suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1.* PLoS Pathogens 8 (8): 1–8.

Kobayashi, S. D. y Deleo F. R. 2009. *Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach.* WIREs Systems Biology and Medicine 1 (12): 309–33.

Kobayashi, Y. 2015. *Neutrophil biology: an update.* EXCLI Journal 14 (1): 220–27.

Kruger, P., Saffarzadeh M., Alexander N., Weber R., Rieber N., Radsak M., Von Bernuth H., Benarafa C., Roos D. y Skokowa J. 2015. *Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury.* PLoS Pathogens 11 (3): 1–23.

Ledesma-Soto, Y., Callejas B. E., Terrazas C. A., Reyes J. L., Espinoza-Jiménez A., González M. I. y León-Cabrera S. 2015. *Extraintestinal helminth infection limits pathology and proinflammatory cytokine expression during DSS-induced ulcerative colitis: a role for alternatively activated macrophages and prostaglandins.* BioMed Research International 2015 (1): 1–17.

León-Cabrera, S., Callejas B. E., Ledesma-Soto Y., Coronel J., Gutiérrez-Cirlos E. B., Ávila-Moreno F. y Rodríguez-Sosa M. 2014. *Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis.* International Journal of Biological Sciences 10 (1): 948–56.

Luo, Q., Huang Z., Ye J., Deng Y., Fang L., Guo Y., Jiang H., y Ju B. 2016. *PD-L1-expressing neutrophils as a novel indicator to assess disease activity and severity of systemic lupus erythematosus.* Arthritis Research & Therapy 18 (47): 1–11.

Ma, Y., Yabluchanskiy A., Lyer R. P., Cannon P. L., Flynn E. R., Jung M., Henry J., Cates C. A., Deleon-Pennel K. Y. y Lindsey M. L. 2017. *Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction.* Cardiovascular Research 110 (9): 51–61.



Mallary, C. y Greenlee-Wacker. 2016. *Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation*. Immunological Reviews 273 (1): 357–70.

Mathieu-Benoit, Voisin y Nourshargh S. 2013. *Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular*. Journal of Innate Immunity 5 (1): 336–47.

Mayadas, T. N., Cullere X. y Lowell C. A. 2015. *The multifaceted functions of neutrophils*. Annual Review Pathologic 9 (1): 181–218.

Mayani, H., Flores-Figueroa E., Pelayo R., Montesinos J. J., Flores-Guzmán P. y Chávez-González A. 2007. *Hematopoyesis*. Cancerología 2 (1): 95–107.

Miles, K.; Clarke D. J., Lu W., Beaumont P. E., Davidson D. J., Tom A. y Campopiano D. J. *Dying and necrotin neutrophil are anti-inflammatory secondary to the release of  $\alpha$ -defensins*. The Journal of Immunology 183 (1): 2122–32.

Nauseef, W. M. y Borregaard N. 2014. *Neutrophils at work*. Nature Immunology 15 (7): 602–11.

Peón, A. N., Espinoza-Jiménez A. y Terrazas L. I. 2013. *Immunoregulation by Taenia crassiceps and its antigens*. BioMed Research International 2013 (1): 1–13.

Peón, A. N., Ledesma-Soto Y., Olgún J. E., Bautista-Donis M., Scitutto E. y Terrazas L. I. 2017. *Helminth products potently modulate experimental autoimmune encephalomyelitis by downregulating neuroinflammation and promoting a suppressive microenvironment*. Mediators of Inflammation 2017 (1): 1–16.

Ramaiah, S. K. y Jaeschke H. 2007. *Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury*. Toxicologic Pathology 35 (3): 757–66.

Ray R. y Shah A. M. 2005. *NADPH oxidase and endothelial cell function*. Clinical Science. 109(1): 217-226.



Reyes, J. L., Terrazas C. A., Alonso-Trujillo J., Rooijen N. V., Satoskar A. R. y Terrazas L. I. 2010. *Early removal of alternatively activated macrophages leads to Taenia crassiceps cysticercosis clearance in vivo.* International Journal for Parasitology 40 (6): 731–42.

Rodríguez-Sosa, M., Satoskar A. R., Calderon R., Gomez-Garcia L., Saavedra R., Bojalil R. y Terrazas L. I. 2002. *Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability.* Infection and Immunity 70 (7): 3656–64.

Rose, S., Misharin A. y Perlman H. 2012. *A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment.* Cytometry 81 (4): 343–50.

Rotondo, R., Barisione G., Mastracci L., Grossi F., Orengo A. M., Costa R., Truini M., Fabbi M., Ferrini S. y Barbieri O. 2009. *IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer.* International Journal of Cancer 125 (1): 887–93.

Sagiv, J. Y., Michaeli J., Fridlender Z. G. y Granot Z. 2015. *Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer article phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer.* Cell Reports 10 (4): 562–73.

Schmielau, J. y Finn O. J. 2001. *Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced.* Cancer Research 61 (6): 4756–60.

Sharma, S., Davis R. E., Srivastva S., Nylén S., Sundar S. y Wilson M. E. 2017. *A subset of neutrophils expressing markers of antigen-presenting cells in human visceral leishmaniasis.* The Journal Of Infectious Diseases 214 (9): 1531–38.

Smith, C. K. y Kaplan M. J. 2015. *The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* Rheumatology 27 (5): 448–53.



Strydom, N. y Rankin S. M. 2013. *Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease*. Journal of Innate Immunity 5 (2): 304–14.

Teng, Tie-shan, Ai-ling Ji, Xin-ying Ji y Yan-zhang Li. 2017. *Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered*. Journal of Immunology Research 2017 (1): 1–14.

Terrazasa, L. I., Bojalil R., Govezensky T. y Larralde C. 1998. *Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2- type response in murine cystisercosis Taenia crassiceps*. The Journal of Parasitology 84(1): 74-81

Uribe-Querol, E. y Rosales C. 2015. *Neutrophils in cancer: two sides of the same coin*. Journal of Immunology Research 2015 (1): 1–21.

Wagner, C., Iking-Konert C., Deneffle B., Stegmaier S., Hug F. y Ha G. M. 2017. *Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils*. Blood Journal 103 (3): 1099–1105.

Wéra, O., Lancellotti P. y Oury C. 2016. *The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases*. Journal of Clinical Medicine 118 (5): 1–24.

Willms, K. y Zurabian R. 2017. *Taenia crassiceps: in vivo and in vitro models*. Parasitology 137 (5): 335–46.

Wirhth, S., Bugl S. y Hans-Georg Kopp. 2017. *Neutrophil homeostasis and its regulation by danger signaling*. Blood Journal 123 (23): 3563–67.

Youn, J. I., Nagaraj S., Collazo M. y Gabrilovich D. I. 2008. *Subsets of myeloid derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. Journal of Immunology 181(8): 5791–5802.

Yuan, S. Y., Shen Q., Rigor R. R. y Wu M. H. 2012. *Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function*. Microvascular Research 83 (1): 82–88.



---

Yui, S., Osawa Y., Ichisugi T. y Morimoto-Kamata R. 2014. *Neutrophil cathepsin G, but not elastase induces aggregation of MCF-7 mammary carcinoma cells by a protease activity-dependent cell-oriented mechanism.* Mediators of Inflammation 2014 (1): 1–12.

Zhang, Y., Chung Y., Bishop C., Daugherty B., Chute H., Holst P., Kurahara C., Lott F., Sun N., Welcher A. A. y Dong C. 2006. *Regulation of T cell activation a tolerance by PDL2.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (31): 11695-11700.