



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**PAPEL DE LAS CÉLULAS T
REGULADORAS INDUCIDAS POR
ANTÍGENOS EXCRETADOS/SECRETADOS
DE *Taenia crassiceps* EN EL DESARROLLO
DE COLITIS EXPERIMENTAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ALEJANDRA AURORA MEZA ALCALÁ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. YADIRA LEDESMA SOTO



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2019



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.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la **Doctora Yadira Ledesma Soto**.

Fue revisado por los siguientes miembros del jurado:

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés.

Dr. José Luis Reyes Hernández.

Dra. Yadira Ledesma Soto.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dr. Luis Chávez Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

A la FES Iztacala por ser parte importante para mi formación profesional.

A mi directora de tesis, la Dra. Yadi. Gracias por todo el apoyo que me has dado durante este tiempo, por los consejos, la confianza y por todo el conocimiento que me has compartido.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio y por todo el apoyo para poder realizar este proyecto.

A mis sinodales el Dr. José Luis Reyes Hernández., el Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy y el Dr. Luis Chávez Sánchez por su apoyo y orientación en la revisión del proyecto.

A la Dra. Leticia Olga Flores por proporcionarnos los animales necesarios para la realización de este trabajo.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, Nimsi, Ilse y Lidia. Gracias por la ayuda dentro y fuera del lab, gracias por escucharme y por ser parte de mi vida, por los consejos, y las risas. Las quiero mucho.

A mis amigos de la carrera Sandy, Jenny, Enrique, Edith, Alma y Shari. Gracias por todas las aventuras y vivencias durante todo este tiempo

A mis amigas, Brenda y Nelly. Gracias por ser mi familia, por estar en todo momento conmigo, por aguantar mis quejas y a veces (casi siempre) mi falta de tiempo para vernos, gracias permitirme ser parte de sus vidas desde que estábamos en secundaria. Las amo mucho.

DEDICATORIAS

Para mi mamá *Aurora* y mi papá *Roberto*. Gracias por ayudarme a ser la persona que soy, por confiar en mí. Todos mis logros se los debo a ustedes. Todo esto es para ustedes.

Mami, te amo muchísimo. Gracias por amarme tanto, por cuidarme tanto. Eres una mujer increíble y una mamá súper poderosa. Gracias por no dejarme caer, por abrazarme siempre, por escucharme y por levantarme cada que sentía que ya no podía más. Gracias por todo lo que has hecho por mí

Para mis abuelitos *Aurora*, *Genaro*, *Carmen* y *Rafael*. Los amo.

Para *Juan Antonio*. Gracias por estar y por compartir tu vida conmigo. Gracias por apoyarme tanto, por cuidarme, por escucharme, por ser mi compañero de aventuras. Gracias por darme tantos consejos y por impulsarme a ser una mejor persona todos los días. Eres muy importante para mí. Gracias a tus papás y a tu tía, por hacerme sentir parte de su familia y darme tantos ánimos.

“Con frecuencia las dificultades preparan a personas ordinarias para un destino extraordinario” - C.S Lewis.

CONTENIDO

	Página
1. Abreviaturas.	1
2. Resumen.	4
3. Introducción.	5
3.1. Enfermedades Inflamatorias Intestinales.	5
3.1.1. Enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa.	5
3.2. Colitis ulcerativa.	7
3.2.1. Factores de riesgo.	7
3.3. Respuesta inmunitaria del intestino.	8
3.4. Respuesta inmunitaria de intestino con colitis ulcerativa.	9
3.5. Linfocitos T.	12
3.5.1. Células T reguladoras.	12
3.5.2. Ontogenia y desarrollo de linfocitos T reguladores.	13
3.5.3. Mecanismos de supresión.	14
3.5.4. Interleucina 2.	16
3.5.5. Producción de Interleucina 10 y Factor de Crecimiento Tumoral- β .	17
3.5.6. Moléculas supresoras.	18
3.5.7. Linfocitos T reguladores y parásitos.	21
3.6. Parásitos moduladores.	22
3.6.1. <i>Taenia crassiceps</i> .	23
3.6.2. Modulación de la respuesta inmunitaria generada por <i>Taenia crassiceps</i> .	24
3.6.3. Células inducidas por <i>Taenia crassiceps</i> .	25
3.6.4. Antígenos excretados/secretados de <i>Taenia crassiceps</i> .	25
4. Justificación.	27
5. Hipótesis.	28
6. Objetivos.	28
6.1. Objetivo general.	28
6.2. Objetivos particulares.	28
7. Materiales y métodos.	29
7.1. Material biológico.	29
7.2. Infección de ratones con <i>Taenia crassiceps</i> .	29
7.3. Obtención de antígenos excretado/secretados de <i>Taenia crassiceps</i> .	29
7.4. Cuantificación de antígenos excretado/secretados de <i>Taenia crassiceps</i> por método de Bradford.	29
7.5. Integridad de antígenos excretado/secretados de <i>Taenia crassiceps</i> por electroforesis.	30
7.6. Inducción de colitis experimental.	30
7.7. Evaluación del modelo de colitis experimental.	30

7.8. Obtención de células de circulación.	30
7.9. Obtención de células de peritoneo.	31
7.10. Obtención de células de bazo.	31
7.11. Obtención de células de ganglios linfáticos mesentéricos.	31
7.12. Obtención de células de lámina propia.	31
7.13. Citometría de flujo.	32
7.14. Histología de intestino.	34
7.15. Tinción Hematoxilina-Eosina.	35
7.16. Tinción de células caliciformes.	35
7.17. Extracción de ácido ribonucleico de intestino.	35
7.18. Reacción en cadena de la polimerasa punto final de intestino.	36
7.19. Análisis estadístico.	37
8. Resultados.	38
8.1. Evaluación del desarrollo de colitis experimental.	38
8.2. Longitud de colon.	38
8.3. Evaluación del daño histopatológico.	39
8.4. Estrategia de análisis de citometría de flujo.	40
8.5. Citometría de linfocitos de circulación.	41
8.6. Análisis del reclutamiento de linfocitos T CD4+ CD8+ y T reguladoras de cavidad peritoneal.	42
8.7. Determinación de linfocitos T CD4+ CD8+ y T reguladoras de bazo.	46
8.8. Linfocitos T CD4+ CD8+ y T reguladoras de ganglios linfáticos mesentéricos.	49
8.9. Células de lámina propia.	50
8.10. Expresión de los genes GAPDH, MUC2 y TGF- β en intestino.	53
9. Discusión.	55
10. Conclusiones.	59
11. Referencias bibliográficas.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y prevalencia de enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa.	6
Figura 2. Patología de la colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn.	7
Figura 3. Respuesta inmune del intestino sano y en condiciones de inflamación.	11
Figura 4. Ontogenia de linfocitos T reguladores.	14
Figura 5. Mecanismos de supresión de linfocitos T reguladores.	16
Figura 6. Infección de <i>Taenia crassiceps</i> .	25
Figura 7. Modulación de la respuesta inmune por los antígenos excretados/secretados de <i>Taenia crassiceps</i> .	26

Figura 8. Porcentajes de pérdida de peso y evaluación del Índice de Actividad de la Enfermedad.	38
Figura 9. Cambios macroscópicos de colon.	39
Figura 10. Efecto de los antígenos excretados/secretados de <i>Taenia crassiceps</i> .	40
Figura 11. Estrategias de análisis para linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos T reguladores activados.	41
Figura 12. Evaluación de poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y T reguladoras de circulación.	42
Figura 13. Linfocitos T CD4+ y CD8+ de peritoneo.	43
Figura 14. Tendencia de población de linfocitos T reguladores a aumentar en presencia de TcES en cavidad peritoneal.	44
Figura 15. T reguladoras CD103+, PD-1+ y Tim-3+ de peritoneo.	44
Figura 16. Linfocitos T CD8+ CD103+, PD-1+ y Tim-3+ de peritoneo.	45
Figura 17. Linfocitos T CD4+ y CD8+ de bazo.	47
Figura 18. Linfocitos T reguladores y T reguladores naturales de bazo.	47
Figura 19. PD-1 y Tim-3 en T reguladoras de bazo.	48
Figura 20. Expresión de PD-1 y Tim3 en linfocitos T CD8 de bazo.	48
Figura 21. Linfocitos T CD4+ y CD8+ de ganglios linfáticos mesentéricos.	49
Figura 22. Linfocitos T reguladores y T reguladores naturales de ganglios linfáticos mesentéricos.	50
Figura 23. Linfocitos T CD4+ y CD8+ de lámina propia.	51
Figura 24. Linfocitos T reguladores y T reguladores naturales de lámina propia.	52
Figura 25. Moléculas supresoras de linfocitos T reguladores de lámina propia.	52
Figura 26. Linfocitos T CD8+ CD103+, PD-1+ y Tim-3+ de lámina propia.	53
Figura 27. Reacción en cadena de la polimerasa punto final de intestino.	54

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Parásitos involucrados en modulación de distintas respuestas inmunitarias.	
Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la tinción de células de circulación.	
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la tinción de células de bazo.	
Tabla 4. Anticuerpos utilizados para la tinción de células de lámina propia.	
Tabla 5. Mezcla de reacción para reacción en cadena de a polimerasa punto final de intestino.	

1. Abreviaturas

Abreviatura

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Célula presentadora de antígeno
BSA	Albúmina de suero bovino
CD	Grupo de diferenciación
Células NK	Células asesinas naturales
CTLA-4	Antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos-4
CU	Colitis ulcerativa
DNAasa I	Desoxirribonucleasa I
DSS	Dextran sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EII	Enfermedad intestinal inflamatoria
Foxp3	Factor de transcripción “forkhead/winged-helix box p3”
GALT	Tejido linfoide asociado con intestino
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
g	gramos
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
H-E	Hematoxilina-Eosina

IAE	Índice de actividad de la enfermedad
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
ip	Intraperitoneal
IPEX	Síndrome de inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía ligado a x
KO	Deficiente
LAG-3	Gen de activación de linfocitos-3
LP	Lámina propia
MDSCs	Célula mieloides supresoras
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MUC2	Mucina 2
NOD	Receptor tipo proteínas de oligomerización de nucleótidos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Muerte celular programada 1
PD-L	Ligando de muerte celular programada 1
PBS	Regulador fosfato salino
PECs	Células de exudado peritoneal

PM	Peso molecular
ARN	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SBF	Suero bovino fetal
TcES	Antígenos excretados/secretados de <i>Taenia crassiceps</i>
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral β
Th	Célula T cooperadora
Tim-3	Inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3
TLR	Receptor tipo toll
Tregs	Células T reguladoras
X	Media aritmética

2. Resumen

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son atribuidas a respuestas inmunes desreguladas contra bacterias intestinales en individuos susceptibles. Helmintos y sus antígenos poseen importantes actividades inmunomoduladoras como es *Taenia crassiceps*, cuyos antígenos excretados/secretados (TcES) tienen la capacidad de modular respuestas inflamatorias y la inducción de linfocitos T reguladores (Treg) para el mantenimiento de homeostasis, así mismo la deficiencia de estas células se asocia con la predisposición a padecer colitis. Por lo que se planteó determinar si los TcES alteran reclutamiento y activación de Tregs en colitis experimental. Se procedió a realizar la inducción de colitis con DSS 4% e inoculación diaria de TcES a ratones hembra FOXP3, la severidad de la colitis se evaluó por pérdida de peso e IAE. Al finalizar la inducción de colitis, se extrajo colon para evaluar daño histopatológico HE. Se realizó citometría de flujo de células de cavidad peritoneal, bazo, circulación, ganglios linfáticos mesentéricos y lámina propia. Encontramos que los ratones con colitis pierden peso más rápido que los ratones tratados con los TcES y presentan mayor daño histopatológico (pérdida de estructura intestinal y una notoria presencia de infiltrado inflamatorio) comparando con los ratones tratados. Interesantemente, los TcES incrementan el porcentaje y número absoluto de células Treg en la cavidad peritoneal además de aumentar la expresión de CD103, PD-1 y Tim3, indicando que las células Treg generadas por la administración de los TcES tienen una mayor capacidad supresora. Además encontramos que los TcES pueden modular poblaciones de linfocitos CD8 incrementando la expresión de CD103. Sin embargo, en circulación no se presentan cambios en Tregs, una tendencia a aumentarlas en bazo, nódulos linfáticos mesentéricos y lámina propia. Los resultados demostraron el efecto benéfico de TcES relacionado con la estimulación de las células Treg en presencia de colitis así como supresión de las células T proinflamatorias. De igual forma se indica el potencial de los antígenos excretados/secretados de helmintos para la terapia de colitis ulcerativa.

3. Introducción.

3.1. Enfermedades Inflammatorias Intestinales.

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) incluyen dos afecciones: enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerativa (CU), las cuales son un problema con gran incidencia a nivel global, que afecta a personas de diferentes edades incluida la población pediátrica. Ambas enfermedades tienen características inmunológicas, histopatológicas y clínicas distintas y superpuestas. Son enfermedades crónicas del tracto gastrointestinal, comúnmente atribuidas a una respuesta inmune desregulada contra las bacterias intestinales y/o estímulos ambientales en individuos genéticamente susceptibles.

Los factores ambientales han sido implicados en el inicio de la enfermedad, ya que emerge en países en desarrollo con estilos de vida occidentalizados e industrializados; así mismo otros factores que afectan tanto positiva como negativamente en su desarrollo son apendicectomías, tabaquismo, la dieta, medicamentos y contaminantes (Perše y Cerar, 2012).

Estas enfermedades están caracterizadas por el desarrollo de inflamación intestinal resultado de un infiltrado de neutrófilos, linfocitos, monocitos y/o macrófagos, así como células plasmáticas, sobreproducción de radicales libres de oxígeno conduciendo a la disrupción de la mucosa y ulceración.

A pesar de que estas enfermedades fueron consideradas como raras hace 50 años, en la actualidad en Europa se reportan 505 casos por cada 100000 personas, en Norte América 286 casos por cada 100000 personas (Ng *et al.* 2018).

3.1.1. Enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa.

El diagnóstico de la EII se ha dado en todos los continentes, en todas las etnias y las diversas clases socioeconómicas. Sin embargo, es más prevalente en personas con ascendencia europea que viven en las regiones de Asia, Medio Oriente, África y América del Sur (Molodecky *et al.* 2012) y a medida de que aumenta la prevalencia en estas regiones, sucede lo mismo con la incidencia, que en caso de la CU tiende a presentarse en países desarrollados (López-Serrano *et al.* 2010).

De forma general las EII poseen una baja mortalidad y se diagnostica principalmente en individuos jóvenes, por lo que su prevalencia aumenta (Kaplan y Ng, 2017).

En 2018 Ng y colaboradores mostraron que durante el periodo de 1990 a 2016 tanto la incidencia como la prevalencia de ambos trastornos ha ido incrementando principalmente en el norte de América, Oceanía y en algunos países europeos (Figura 1).

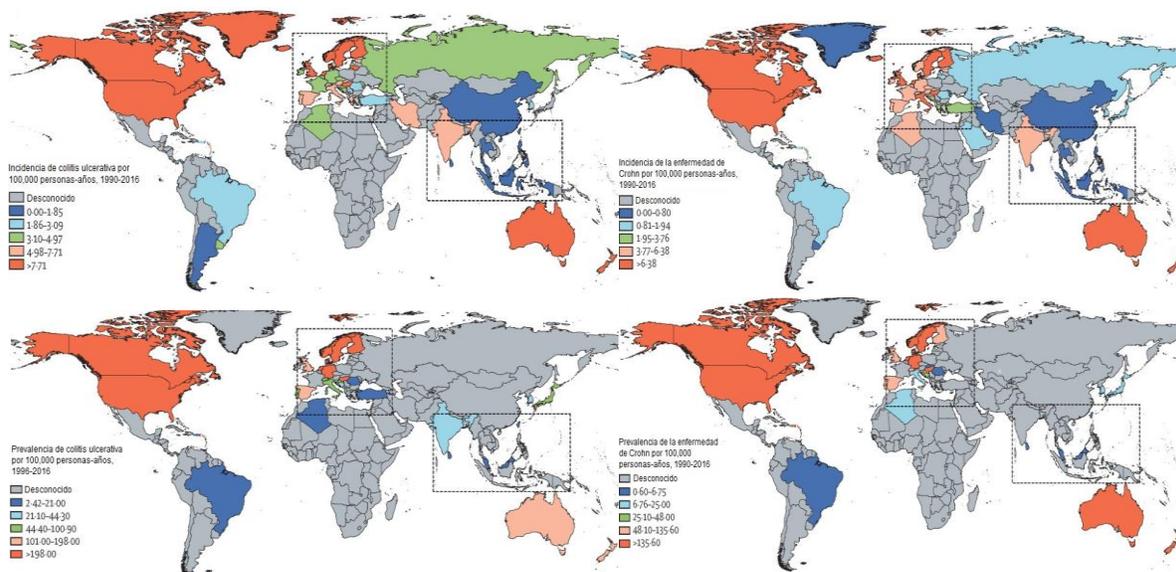


Figura 1.- Incidencia y prevalencia de colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn. La incidencia y la prevalencia de ambas EII son mayor en Norteamérica, en algunos países de Europa y en Oceanía. (Modificado de Ng *et al.* 2018)

En México, las EII son enfermedades históricamente raras. Sin embargo, en un estudio epidemiológico realizado por Bosques-Padilla y colaboradores en 2010 encontraron que la frecuencia de nuevos pacientes con colitis ulcerativa crónica idiopática incrementó en el periodo transcurrido entre 2004 y 2008; mientras que la frecuencia de la EC se mantuvo estable y la CU emerge cuando se da la modernización e industrialización. Así mismo encontraron que la edad más frecuente de pacientes con la enfermedad se encuentra entre la tercera y quinta década de vida.

La EC se caracteriza por inflamación transmural que puede afectar cualquier región del tracto gastrointestinal de forma discontinua, por lo general la parte terminal del íleon y la región perianal, así mismo se encuentra relacionada con complicaciones como abscesos o fístulas. Se caracteriza por generar una respuesta de tipo Th1. Mientras tanto, la CU se caracteriza por inflamación superficial en mucosa y submucosa que se limita al colon (Abraham y Cho, 2009); presenta un infiltrado celular en lámina propia, así como pérdida total de la estructura de las criptas. Se caracteriza por una respuesta tipo Th1 la cual es conducida a una respuesta tipo Th2, incluyendo niveles elevados de IL-3 e IL-5 en el intestino (Abraham y Cho, 2009; Heller *et al.* 2005; Fuss *et al.* 1996; Danese y Fiocchi, 2011) (Figura 2).

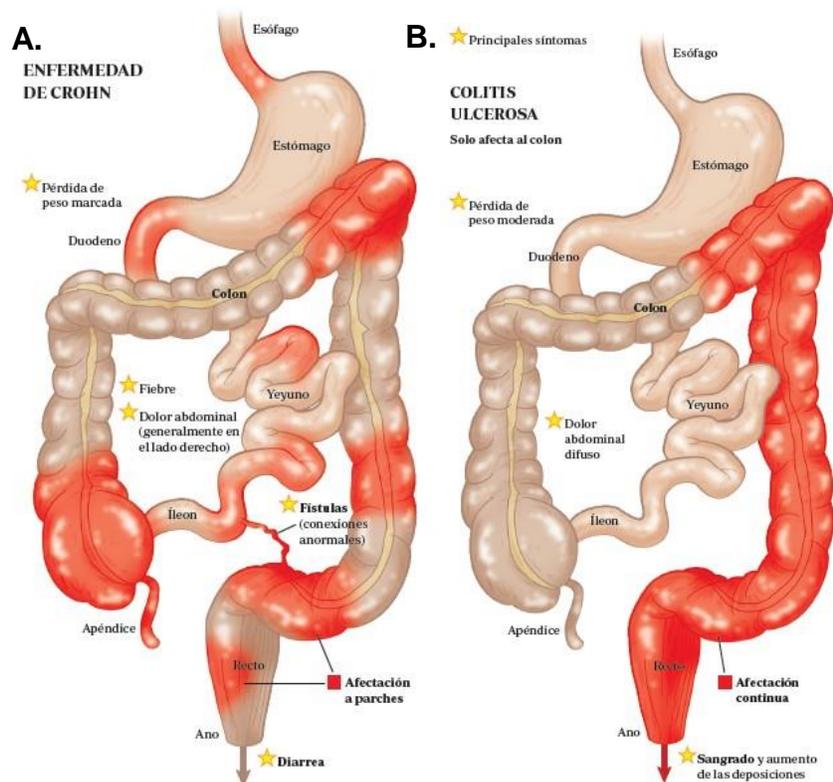


Figura 2.- Patología de Enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa. A) La enfermedad de Crohn afecta cualquier zona del tracto gastrointestinal, de forma discontinua. B) La colitis ulcerativa se caracteriza por inflamación que se limitan a colon. (Clínica Universidad de Navarra, 2019).

3.2. Colitis ulcerativa.

Como se mencionó anteriormente la CU se caracteriza por la reincidencia y remisión de la inflamación en la mucosa intestinal, que inicia en el recto y se va extendiendo en las regiones proximales del colon (Úngaro, 2017).

3.2.1. Factores de riesgo.

La causa precisa de la CU es desconocida, sin embargo, se ha asociado a factores ambientales y genéticos por ejemplo individuos genéticamente susceptibles poseen una respuesta inmune desregulada en las mucosas hacia la microbiota intestinal, lo que resulta en inflamación de la misma.

Se sabe que la CU se presenta con mayor incidencia en países de primer mundo, en los que existe un mayor acceso al cuidado de la salud, registros médicos, así como una reducida exposición a infecciones intestinales en la infancia, restringiendo la maduración

del sistema inmunitario de la mucosa y una respuesta inmunitaria inapropiada al momento de haber una exposición a microorganismos (López-Serrano *et al.* 2010).

Se estima que entre el 8 y el 14% de pacientes con CU tienen antecedentes familiares de EII (Halme *et al.* 2006). Así mismo se han realizado estudios de asociación del genoma identificando 200 loci de riesgo para la EII, donde la mayoría de los genes contribuyen tanto a CU como a EC (Jostins *et al.* 2012), por lo que la predisposición genética (que conduce a distintas anomalías inmunológicas), disbiosis de la microbiota intestinal y las influencias ambientales, por lo que se entiende que ningún factor por sí mismo puede ocasionar que se desarrolle la enfermedad y debe de haber interacción entre los mismos (Ananthkrishnan, 2015).

3.3. Respuesta inmunitaria del intestino.

Las células epiteliales intestinales que recubren los intestinos delgado y grueso forman parte integral del sistema inmune innato del aparato digestivo, implicado en las respuestas a los microorganismos patógenos, la tolerancia a los microorganismos comensales y la captura de antígeno para su entrega al sistema inmunitario adaptativo en el intestino (Abbas *et al.* 2015).

El sistema inmune innato y adaptativo en el tracto gastrointestinal tiene características que son diferentes de las funciones inmunitarias adaptativas en otros organismos entre las que destaca la diferenciación de linfocitos Tregs (Abbas *et al.* 2015).

El intestino posee mecanismos de defensa que limitan el acceso de sustancias nocivas al organismo. Esta barrera intestinal está integrada por diversos elementos como enzimas digestivas pancreáticas, epitelio intestinal y las bacterias que constituyen la microbiota. Sin embargo, la barrera más efectiva está constituida por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Ramiro-Puig *et al.* 2008).

Las funciones reguladoras de la respuesta inmune intestinal ocurren en dos tipos de compartimentos: tejidos linfoides organizados en forma de folículos asociados a las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos, o los tejidos linfoides difusos distribuidos en la lámina propia de la mucosa o en el epitelio intestinal (linfocitos intraepiteliales). En todas las zonas del intestino, el sistema inmunológico está continuamente procesando antígenos del lumen intestinal, por lo que los folículos linfoides de la mucosa presentan un alto grado de activación. Una vez activados por el contacto con los antígenos, los linfocitos T y B de las placas de Peyer adyacentes a las células M proliferan en forma de un clon antígeno-específico, pasan a la sangre y desde ahí migran nuevamente a lámina propia (Borrue, 2003).

La lámina propia aloja a los linfocitos T CD4+ y es el lugar donde los linfocitos B se transforman en células plasmáticas productoras de IgA secretora específica contra diferentes antígenos (MacDonald, 2001). En la superficie mucosa existe una gran

producción de IgA secretora, que a diferencia de la IgA circulante, es resistente a proteólisis intraluminal y no activa la vía del complemento impidiendo la inducción de una respuesta inflamatoria (Borruel, 2003).

En personas sanas, en lámina propia usualmente se encuentran mediadores inflamatorios como TGF- β e IL-10, que regulan a la baja las respuestas inmunitarias, así como mediadores proinflamatorios de células del sistema inmunitario tanto innatas como adaptativas que limitan la entrada excesiva de microbiota intestinal y se defienden contra los patógenos. Las defensas no inflamatorias, como la fagocitosis ayudan a defenderse contra la entrada de bacterias en lámina propia mientras se minimiza la lesión tisular, procurando mantener la homeostasis entre células T reguladoras (Treg) y células T efectoras (Th1, Th2 y Th17) (Abraham y Cho, 2009).

El epitelio intestinal contribuye a la defensa del hospedero produciendo péptidos antimicrobianos (defensinas) que limitan la invasión bacteriana.

Normalmente el sistema inmunitario intestinal mantiene el equilibrio entre la tolerancia a la microbiota comensal, antígenos dietéticos, y la capacidad de responder adecuadamente a patógenos entéricos, por lo que se considera a la CU como resultado de la pérdida de la homeostasis. Las células dendríticas expresan un amplio rango de receptores de reconocimiento de patrón, incluyendo TLRs que se encuentran presentes en el epitelio como TLR3 y TLR5, mientras que TLR2 y TLR4 se encuentran escasos o ausentes, y receptores NOD que proveen defensa contra patógenos y protección en el daño epitelial, por lo que también contribuyen en la homeostasis intestinal y el mantenimiento de la barrera epitelial. (Cario y Podolski, 2000) (Figura 3).

3.4. Respuesta inmunitaria de intestino con colitis ulcerativa.

La exposición de la mucosa intestinal a antígenos microbianos, desde el inicio y durante la amplificación de la enfermedad es de suma importancia ya que se promueve la generación de anticuerpos hacia esos antígenos, por lo que se produce un daño en tejido, ya que la respuesta es atípica (Targan y Karp, 2005).

En personas con presencia de colitis ulcerativa, diversos factores contribuyen al aumento de la exposición bacteriana, incluyendo la irrupción de la capa de moco, la desregulación de las uniones epiteliales, aumento de permeabilidad intestinal y aumento de la adherencia bacteriana a células epiteliales. Se caracteriza por un infiltrado de células del sistema inmune innato en lámina propia como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células T NK, y células del sistema inmune adaptativo como células B y células T, por lo que el aumento en número y activación de todas estas células en la mucosa intestinal elevan niveles locales del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , interferón- γ y citocinas de la vía de la IL-23-Th17 (Abraham y Cho. 2009).

La barrera epitelial, cubierta de una capa de mucina es la primer línea de defensa del sistema inmunitario de la mucosa intestinal ya que provee de una separación física entre las células del sistema inmunitario del hospedero y microorganismos lumbinales, y sintetiza péptidos antimicrobianos. Durante la CU se ve disminuida la síntesis y alteración de la sulfatación de varios subtipos de mucina del colon (específicamente mucina 2) (Van Klinken, *et al.* 1999). El daño en la barrera epitelial lleva al incremento de permeabilidad, posiblemente debido a una regulación defectuosa de las uniones estrechas, por lo que la barrera permite una mayor absorción de antígenos lumbinales (Rahman, *et al.* 2007). La expresión de beta defensinas humanas se sobrerregula en muestras de pacientes con CU, pero no es claro si este aumento es inducido en respuesta a microorganismos, a citocinas inflamatorias o ambos (Rahman, *et al.* 2007 y 2011).

A su vez, los antígenos activan la respuesta inmune innata a través de la interacción con macrófagos y células dendríticas, que son las encargadas de enviar dendritas al exterior del epitelio para obtener "muestras" de las bacterias y otros antígenos lumbinales (Niess *et al.* 2005). La lámina propia se encuentra poblada de macrófagos y células dendríticas que presentan antígenos a células B y T, lo que lleva a la activación de la respuesta inmune adaptativa. En pacientes con CU, el número de células dendríticas maduras y activadas aumenta (Hart *et al.* 2005), así como un incremento de TLR4 en lámina propia. La activación de TLRs desencadena las respuesta inmunes innata y adaptativa, llevando a la activación de distintos factores de transcripción como el factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B), importantes en la activación de la cascada inflamatoria. NF- κ B regula funciones proinflamatorias y de supervivencia celular tanto en macrófagos como en células T, pero también protege a células epiteliales, por lo que su función depende del tipo celular (Spehlmann y Eckmann, 2009).

También se observa que hay un desequilibrio entre proporciones de las células T reguladoras y efectoras (Th1, Th2 y Th17). Se sabe que la CU está asociada con una respuesta Th2 atípica mediada por células T NK que producen IL-5 e IL-13. IL-13 ejerce funciones citotóxicas en contras de células epiteliales, incluyendo la inducción de apoptosis y la alteración de proteínas que componen las uniones estrechas (Heller *et al.* 2008). Las células T NK se incrementan en lámina propia del colon inflamado y son capaces de producir distintas citocinas Th2, como IL-4 que es suprimida rápidamente por IL-13, que puede ejercer un efecto de retroalimentación positivo en las células T NK, amplificando el daño al tejido, por lo que se considera que junto con IL-13 juegan un papel importante en la patogénesis de la CU (Heller *et al.* 2002 y 2008). También hay un aumento del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en sangre, heces y mucosa en pacientes con CU (Masuda *et al.* 1995).

Para la respuesta proinflamatoria es importante el reclutamiento de leucocitos del sistema circulatorio hacia la mucosa inflamada mediante la liberación de quimioatrayentes como CXCL8 (sobreexpresado en pacientes con CU) (Matsuda *et al.* 2009).

Se ha observado en diferentes estudios que una desregulación de la población de células T CD4+, así como sus distintas subpoblaciones, podrían llevar a inflamación intestinal, donde en casos de colitis ulcerativa hay un incremento de interleucina 17 y las citocinas Th2 (Abraham y Cho, 2009) (Figura 3).

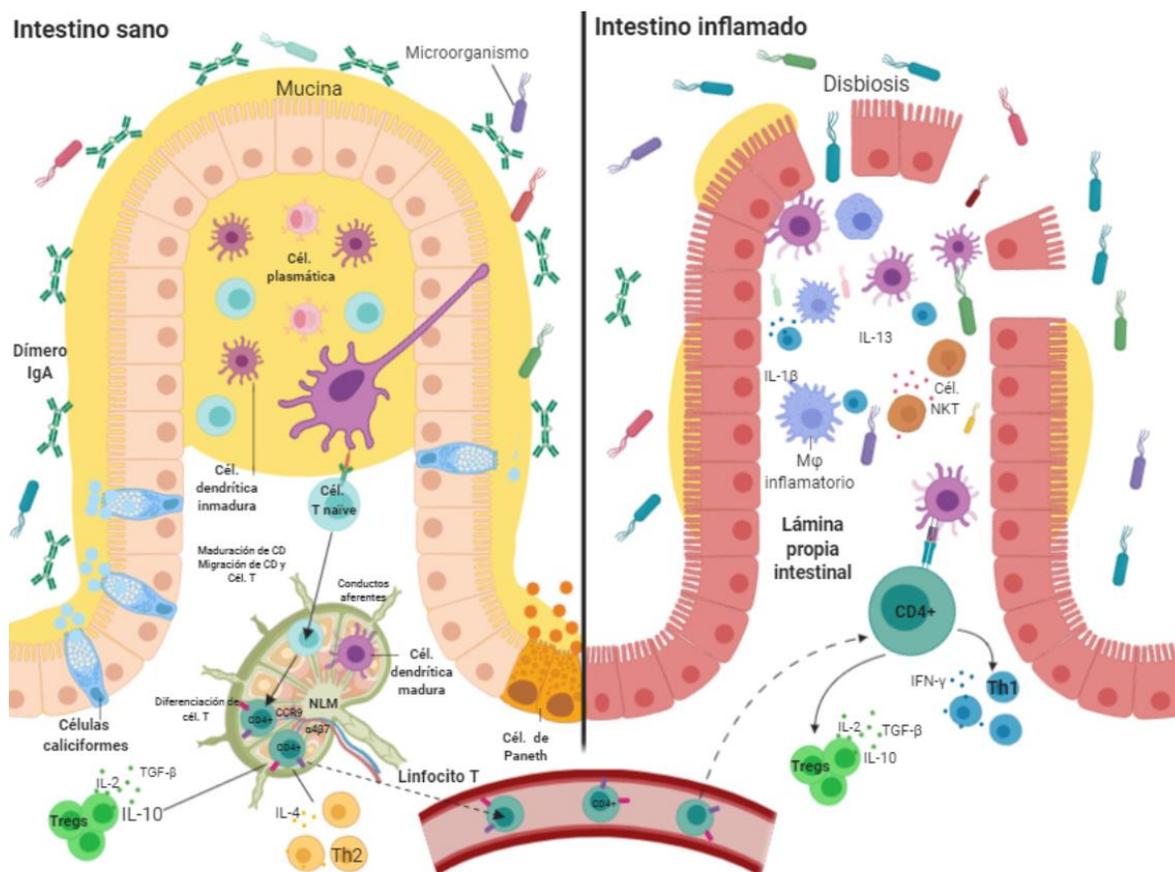


Figura 3.- Respuesta inmune del intestino sano y en condiciones de inflamación. La tolerancia inmunológica en el intestino implica tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa para mantener el intestino en homeostasis. En el intestino sano podemos observar células dendríticas que inducen la activación de linfocitos CD4+ a linfocitos Treg para el mantenimiento de la homeostasis intestinal, mientras que en el intestino inflamado a causa de colitis ulcerativa, vemos que bacterias patógenas cruzan la capa de mucina, provocando disrupción de la barrera epitelial y permitiendo su entrada a la mucosa intestinal, que desencadena una respuesta proinflamatoria liberando citocinas como TNF- α IL-1 β o producción de ROS. Así mismo, observamos la presentación de antígeno a linfocitos T CD4+ y la sucesiva diferenciación a linfocitos T efectoras (Modificado de Úngaro, 2017).

3.5. Linfocitos T.

El sistema inmune de los mamíferos protege al hospedero de distintos microorganismos patógenos evitando que haya respuestas excesivas que podrían ser perjudiciales, esto se encuentra mediado principalmente por células B y T.

Los linfocitos T son células del sistema inmune adaptativo encargadas de reconocer un amplio espectro antígenos derivados de microorganismos celulares y destruyen así a células infectadas y los microbios. Esta población celular cuenta con 2 subgrupos CD4+ y CD8+ y diferentes subpoblaciones: linfocitos T cooperadores encargados de secretar citocinas que estimulan y ayudan a la diferenciación del propio linfocito T. Los citotóxicos (CTL) que matan células infectadas que expresan antígenos extraños en el contexto del MHC de clase 2 que ayudan inhibiendo respuestas inmunitarias (Abbas *et al.* 2015).

3.5.1. Células T reguladoras.

Entre los años 1970-1980, distintos grupos de investigadores (Gershon y Kondo, 1971; Okumura y Tada, 1971 y Hall *et al.* 1984) reportaron que los linfocitos T podían actuar como células supresoras, sin embargo, hasta la década de 1990 la investigación sobre linfocitos T reguladores comenzó a tener auge después del descubrimiento de distintos marcadores que distinguen la población supresora de otras células T, así mismo, se identificó que la población de linfocitos T CD4+CD25+ posee potentes propiedades reguladoras en autotolerancia y supresión autoinmune (Sakaguchi *et al.* 1995).

Las células T reguladoras (Tregs) son linfocitos T CD4+ que son requeridos para el mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica y la homeostasis inmune mediante la supresión activa de respuestas inmunes patológicas y fisiológicas (Ohkura *et al.* 2013). En estudios recientes se ha visto que estas células poseen funciones heterogéneas que van más allá de los mecanismos de supresión, incluyendo su trabajo en la reparación de folículos pilosos (Ali *et al.* 2017), la preservación de la homeostasis intestinal y la reparación de tejidos (Arpaia *et al.* 2015).

Los factores que contribuyen a su generación incluye a las células dendríticas CD103+, la producción local de ácido retinoico (que promueve la expresión de Foxp3) y la producción local de TGF- β (que también promueve la expresión de Foxp3 e inhibe la generación de linfocitos Th1 y Th2). Diversas citocinas, como TGF- β , IL-10 e IL-2 parecen desempeñar funciones fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis en el sistema inmunitario intestinal, y las deficiencias en estas citocinas o en sus receptores dan lugar a una inflamación intestinal patológica (Abbas *et al.* 2015). Una característica importante del fenotipo de los ratones con deficiencias provocadas del

TGF- β , IL-10, IL-2 y sus receptores, es una inflamación incontrolada del intestino (Abbas *et al.* 2015).

El factor de transcripción FoxP3, es fundamental para el desarrollo y función de las células Treg (Abbas *et al.* 2015). El gen Foxp3 fue identificado en 2001 como el gen causante de la enfermedad en los ratones Scurfy, que desarrollan espontáneamente autoinmunidad e inflamación severa, debido a una mutación genética única en el cromosoma X (Brunkow *et al.* 2001). Se encontró que mutaciones en el gen humano *FOXP3*, eran las causas de una enfermedad humana similar llamada IPEX (síndrome de inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al cromosoma X) caracterizada por enfermedad autoinmune en múltiples órganos del sistema endócrino (como diabetes tipo 1 y tiroiditis), presencia de alergias severas y en EII (Wildin *et al.* 2001; y Bennett *et al.* 2001).

Las células Treg regulan una amplia variedad de respuestas inmunes (incluyendo alergias, autoinmunidad, inflamación y reacciones contra microbios y tumores). Pueden controlar las actividades de los distintos tipos celulares del sistema inmune adaptativo e innato (Josefowicz *et al.* 2012; Panduro *et al.* 2016).

3.5.2. Ontogenia y desarrollo de linfocitos T reguladores.

En la ontogenia de los linfocitos T en timo, algunos linfocitos T CD4+ autorreactivos, al encontrarse con antígenos propios en timo, no son eliminados por selección negativa, sino que se diferencian linfocitos T reguladores específicos frente a estos antígenos propios, la mayoría de estos linfocitos T CD4+ reguladores expresan cantidades altas de la cadena α del receptor para la interleucina 2 (IL-2) (CD25) (Abbas *et al.* 2015).

Las Tregs pueden ser clasificadas en 2 subpoblaciones principales, las Tregs más convencionales derivadas del timo originadas de forma natural (nTregs o tTregs ya que se derivan del timo) y las Treg inducidas (iTreg) que representan una población de Tregs supresoras que se diferencian de las células T CD4+ en periferia (pTregs) (Bilate y Lafaille, 2012).

Existen otras células T CD4+ reguladoras, incluidas las células T reguladoras tipo 1 (Tr1) y las células Th3, que exhiben funciones supresoras pero sin expresar FOXP3, incluso en algunos estudios se ha mencionado que esta expresión es transitoria (Vieira *et al.* 2004) (Figura 4).

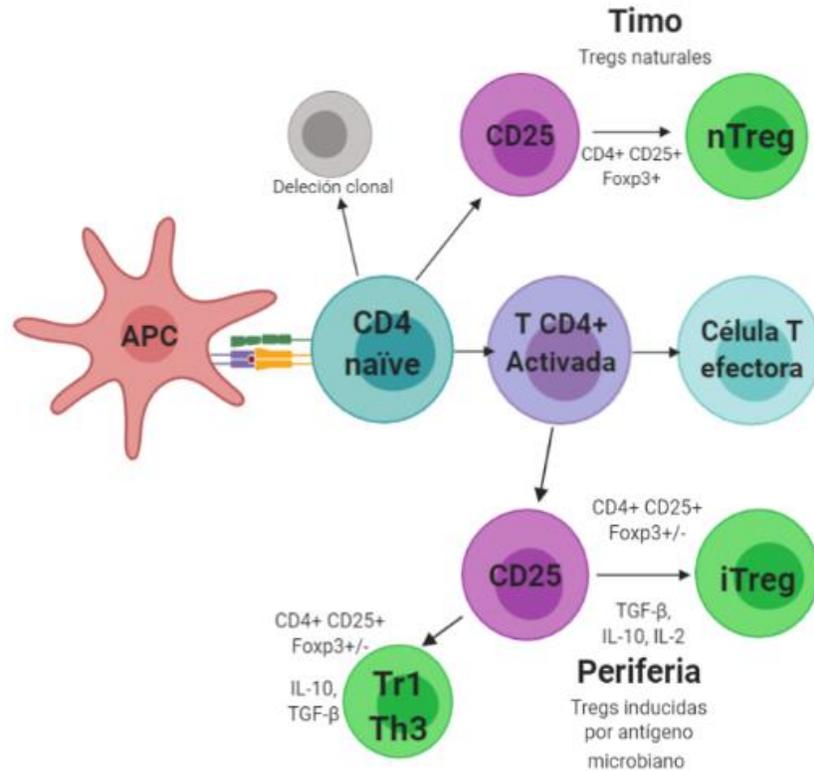


Figura 4.- Ontogenia de linfocitos T reguladores. La generación de células Treg provienen de manera natural del timo y son llamadas células T reguladoras naturales o tímicas (nTreg), Los linfocitos T CD4+ que salen a la periferia mediante diferentes estímulos como antígenos microbianos, TGFβ, IL-2, ácido araquidónico etc. pueden generar células T reguladoras inducidas o periféricas (iTreg). Otra población de células T reguladoras son las células Tr1 y Th3 que pueden o no expresar de manera transitoria FoxP3, dependiendo de la secreción de TG-Fβ o IL-10, pero posee características supresoras (Modificado de Miyara y Sakaguchi, 2007).

3.5.3. Mecanismos de supresión.

Las Tregs presentan una gran variedad en sus mecanismos de supresión que dependen del entorno inmunitario, el estado de activación de éstas células y el tipo de célula objetivo (Andolfi *et al.* 2012). Los mecanismos de supresión de respuestas inmunes usado por las células T reguladoras incluyen: la inducción del catabolismo de triptófano y citotoxicidad a través de CTLA-4, modulación de moléculas coestimuladoras en CPA e interacción de LAG3 con moléculas MHC de clase II, la secreción de citocinas inmunosupresoras, citotoxicidad y la inhibición de la expresión de IL-2 (Miyara y Sakaguchi, 2007):

- Modulación de la función o maduración de las células dendríticas: Las células Treg mediante CTLA-4 (supresión por contacto), evita la interacción de CD28 con CD80 y

CD86 en células dendríticas, evitando así la activación de células T efectoras (Taylor *et al.* 2003).

- Inducción del catabolismo del triptófano: Las células Treg pueden inducir en las células dendríticas la expresión de la enzima indoleamina degradante de triptófano indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que convierte triptófano en kynurerine, molécula tóxica para células T (Schmidt *et al.* 2012).
- Otra molécula importante expresada en las T reguladoras es LAG-3, que se une a moléculas del MHC-II para suprimir la maduración de células dendríticas (Vignali *et al.* 2008).
- Liberación de citocinas reguladoras: TGF- β , IL-10 e IL-35, se encuentran involucradas en tareas como la supresión directa de la señalización de las células T efectoras, la regulación de IFN- γ , inducción de las mismas Treg y el mantenimiento de la expresión de FOXP3 (Schmidt *et al.* 2012) (Marie *et al.* 2005).
- Las Tregs pueden ejercer supresión mediante la expresión de granzimas que inducen muerte celular programada, suprimiendo y matando células B y probablemente dificultando la función de las células T efectoras por apoptosis (Gondek *et al.* 2008).
- Eliminación de IL-2: Las células Treg expresan altas cantidades de CD25, permitiendo privar a las células T efectoras de IL-2 y con ello evitar la proliferación celular de las células efectoras. (Pandiyan *et al.* 2007).
- Expresión de moléculas supresoras en la superficie de linfocitos T reguladores (por contacto) como PD-1, CD103 y Tim-3 (Miyara y Sakaguchi, 2007) (Figura 5).

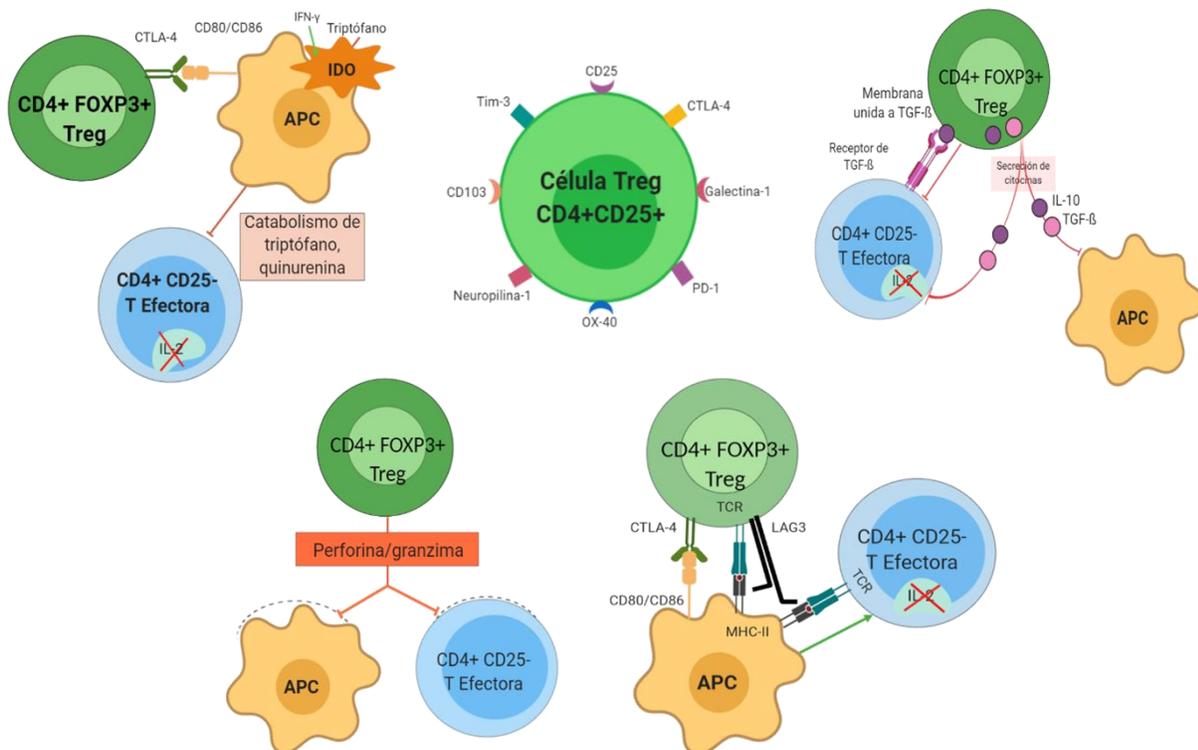


Figura 5.- Mecanismos de supresión de linfocitos T reguladores. Las células Treg cuentan con diferentes mecanismos de supresión para las células T efectoras, dentro de estos mecanismos encontramos la expresión de CTLA-4 y LAG3, inhibiendo la maduración de dendríticas y la coestimulación de estas células. Mecanismo por liberación de TGF- β , IL-10. Inducción de IDO para el metabolismo del triptófano y la generación de quinurenina tóxica para las células efectoras. Depleción de IL-2 por sobreexpresión de CD25 en las células Treg y depleción de IL-2 en las células efectoras (Modificado de: Miyara y Sakaguchi, 2007).

3.5.4. Interleucina 2.

Las señales producidas por IL-2 pueden influir en diversos conjuntos de linfocitos durante su diferenciación, respuestas inmunitarias y el mantenimiento de la homeostasis al mantener la población de células T reguladoras y se ha visto que ratones deficientes en IL-2 o CD25 desarrollan autoinmunidad sistémica debido al deterioro en sus desarrollo, supervivencia y la función de las Tregs (Malek, 2008)

Después de que las Tregs son activadas, todas expresan la cadena α del receptor de IL-2 o mejor conocido como CD25 (Huber *et al.* 2004).

Es indispensable para el mantenimiento de las Tregs naturales en la periferia ya que en ratones deficientes de IL-2, éstas células se reducen significativamente, de acuerdo al trabajo de Fontenot y colaboradores en 2005 y para lo que Setoguchi *et al.* (2005) dicen que la principal fuente de IL-2 para la supervivencia de las Tregs son otras células T. Así mismo, al experimentar en pacientes linfopénicos e inyectarles IL-2 Zhang *et al.* en 2005

observan que hay una inducción de la interleucina. Por lo anterior IL-2 es considerada una citocina esencial para la supervivencia, función, y para controlar el mantenimiento de las Tregs.

3.5.5. Producción de interleucina 10 y de Factor de crecimiento transformante- β .

La interleucina 10 es una proteína producida por la células Tr1, sin embargo no es restringida a este linaje celular, ya que se ha visto que tanto monocitos, células dendríticas, neutrófilos, otros linfocitos T también son capaces de liberarla, sin embargo las Tr1 son las únicas células reguladoras capaces de producirla (Saraiva y O'Garra, 2010; Couper *et al.* 2008).

IL-10 inhibe la producción de citocinas proinflamatorias como IL-12, causando así una disminución de la respuesta Th1 y la producción de IFN- γ , así mismo promueven la actividad fagocítica, aumentando la eliminación de residuos celulares en el sitio de la inflamación (Lobbermann *et al.* 2012).

Se ha mencionado en experimentos *in vivo* el importante papel de IL-10 para la supresión de las Tregs, como lo es su requerimiento para el control de colitis y el mantenimiento de la homeóstasis del número de células T por parte de las células T reguladoras. Annacker y colaboradores en 2001 observan que las Tregs CD4+CD25+CD45+RB^{low} aisladas de ratones KO para IL-10 no logran prevenir la colitis y la proliferación homeostática de linfocitos T CD4+ en ratones deficientes de RAG (gen activador recombinante); así mismo, en 2006 Uhlig y colaboradores demostraron que las Tregs FOXP3+ de lámina propia intestinal pueden controlar la colitis mediante secreción local de IL-10.

Por otro lado, se sabe que la citocina factor de crecimiento transformante β (TGF- β) está involucrada en procesos celulares como hematopoyesis, proliferación celular, angiogénesis, diferenciación, migración y apoptosis celular, por lo que es fundamental durante la embriogénesis y el desarrollo. Se ha informado sobre la expresión a nivel de membrana de TGF- β en Tregs murinas y humanas haciendo posible la relación de la expresión TGF- β con la supresión dependiente de contacto con la célula. Huber y colaboradores en 2004 (Huber *et al.* 2004) vieron que ratones KO para TGF- β presentaban cantidades reducidas de Tregs CD4+CD25+ afirmando así que el mantenimiento de las Tregs naturales requieren de TGF- β .

La superfamilia de ligandos de TGF- β (que incluye a la proteína morfogénica ósea (BMPs), factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), la hormona antimulleriana (AMH), activina y nodal) se une a un receptor, usualmente el receptor TGF- β 2 (receptor Serina/Treonina cinasa) que cataliza la fosforilación del receptor TGF- β 1. Este receptor fosforila a su vez los receptores Smad (R-Smad) que se pueden unir a otra proteína: coSMAD SMAD4. Los complejos R-SMAD/coSMAD se acumulan en núcleo celular

donde actúan como factores de transcripción y participan en el control de expresión de genes blanco.

El R-Smad fosforilado tiene alta afinidad para el coSmad Smad4, con el que formará un complejo de unión, que entra de esta forma a núcleo donde se une a promotores de transcripción/cofactores y causa la transcripción de ADN.

Las BMPs causan la transcripción de mRNA implicado en osteogénesis y neurogénesis. Las TGF- β s causan transcripción de mRNAs asociados con apoptosis, neogénesis de matriz extracelular e inmunosupresión, así como el arresto en G1 del ciclo celular. La activina causa la transcripción de mRNA implicados en el crecimiento gonadal, la diferenciación del embrión y la formación de la placenta. La proteína nodal causa la transcripción de mRNA implicado en la correcta especificación del eje derecho e izquierdo del cuerpo, inducción del mesodermo e inducción del endodermo (Abbas *et al.* 2015).

3.5.6. Moléculas supresoras.

Una amplia variedad de moléculas se encuentran involucradas en la actividad supresora mediada por Tregs, incluyendo a la proteína 4 citotóxica asociada al linfocito T (CTLA-4), IL-2, IL-10, TGF- β , IL-35, el receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR), gen 3 de la activación del linfocito (LAG3), granzyma B, adenosina y AMP cíclica (cAMP) (Nishizuka y Sakakura, 1969).

- PD-1 o CD279: se expresa principalmente en células T CD4+ activadas y en células T CD8+, así como en las células B de la periferia, monocitos, células NK y células dendríticas (Agata *et al.* 1996; Yamazaki *et al.* 2002 y Keir *et al.* 2008). En 1992 se identificó como una molécula cuya expresión fue fuertemente inducida por estímulos apoptóticos (Ishida *et al.* 1992).

El estudio realizado por Ha y colaboradores en 2016 con relación Tregs PD-1 demuestran que esta población celular se caracteriza por una función supresora más fuerte durante una infección viral crónica. Así mismo Francisco *et al.* en 2009 describen que en sinergia con TGF- β , PD-1 regula a la baja las señales mediadas por TGF- β , induciendo así la citodiferenciación de células T naïve hacia células iTregs inducidas, y después PD-L1 restringe las respuestas de las células T efectoras al aumentar la población de iTregs, de la misma manera mantiene la expresión de Foxp3 y hace más eficaz de su función supresora.

PD-1 se une con su ligando PD-L1 modulando así la activación y función de células T, generando una señal en éstas, que inhibe la producción de interleucina 2 (IL-2) dependiente del receptor del linfocito T (TCR) y su proliferación. Cuando se activa la señal de TCR, PD-1/PD-L1 se fosforila y se activa. PD-1 recluta SHP-1 Y SHP-2 al ITSM (motivo de cambio basado en inmunoreceptores de tirosina) C-terminal que

desfosforila señales de TCR de ZAP70 y su asociación con CD3 ζ , inhibiendo señalización de PI3K/AKT río abajo, lo que provoca la regulación negativa de la expresión del gen de supervivencia celular Bcl-xl y promueve apoptosis en linfocitos T y la secreción de citocinas (Hofmeyer *et al.* 2011).

Así mismo, se atenúa la fosforilación de PKC- Θ , necesaria para la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, así como la producción de IL-2 como resultado del reconocimiento de antígeno por parte del TCR. Además, PD-1 puede inhibir activación de la vía de señalización RAS-ERK1/2 para inhibir la proliferación de linfocitos T. PD-1 también se ha sugerido para activar PTEN, inhibiendo así la activación de PI3K / AKT mediada por TCR (Abbas *et al.* 2015).

- CD103: la integrina α E β 7 se expresa principalmente en linfocitos epiteliales de intestino, pulmón y piel, en subconjuntos de mastocitos de mucosa, células dendríticas de mucosa y dérmicas (Kilshaw, 1999; Schön *et al.* 2002). Es un marcador específico de subconjuntos nTreg CD4+ en ratón y existe evidencia de que actúa como una molécula de retención, permitiendo así la acumulación de Tregs CD4+ CD25+ en sitios con inflamación (Suffia *et al.* 2005).

Se expresa en bajas cantidades por células del sistema inmune en bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (Feng *et al.* 2002). Principalmente se puede detectar en poblaciones de células T junto con mucosa epitelial del intestino y en leucocitos de la lámina propia intestinal (Kilshaw y Murant, 1990). Contribuye a la retención de linfocitos en tejidos epiteliales a través de la interacción con su receptor E-caderina, expresado por células epiteliales (Cepek *et al.* 1994). Se ha visto que las Treg CD103+ inhiben con mayor fuerza a proliferación de linfocitos T CD4+ que las Treg convencionales, por lo que CD103 es una molécula de superficie que marca a linfocitos intestinales y a linfocitos Treg (Lehman *et al.* 2002 y Chen *et al.* 2008). Se ha observado que helmintos pueden inducir la expresión de CD103 y otros marcadores de activación las Treg, ejerciendo una función mayormente supresora (Taylor *et al.* 2012). La integrina α E β 7 desempeña un papel crucial en la secreción de citocinas mediada por TCR y la actividad citotóxica al interactuar con su ligando, el marcador de células epiteliales E-cadherina, en las células diana.

- Tim-3: fue descubierta en 2002 como una molécula expresada en células Th1 CD4+ productoras de IFN- γ y en linfocitos T CD8+ citotóxicos tipo 1 (Tc1) (Monney *et al.* 2002), y la lectina de tipo S, galectina-9 (Gal-9) se identificó como uno de sus ligandos, es una molécula soluble expresada ampliamente y es sobre regulada por IFN- γ , demostrando que al activarse en células Th1 se induce la muerte celular (Zhu *et al.* 2005). La expresión de la inmunoglobulina 3 de células T se limita a linfocitos, especialmente con alto nivel en células T reguladoras y células NK (Lozano *et al.* 2012). Ha sido denominada como una molécula reguladora negativa de respuestas

Th1 y es indispensable en la tolerancia inmune y su expresión se da a la alza en tejidos inflamados (Anderson *et al.* 2016). Se ha demostrado que Tim-3 puede regular autoinmunidad al modular la capacidad de células Treg para amortiguar respuesta inflamatorias (Sánchez-Fueyo *et al.* 2003) y se sabe que las Tregs Tim3+ cuentan con una actividad inmunosupresora superior en comparación con las Tregs Tim3-, presentando moléculas supresoras como IL-10, granzimas y perforinas (Sakuishi *et al.* 2013).

Las colas citoplasmáticas de Tim-3 contienen 5 residuos de tirosina conservados, entre los cuales Y256 e Y263 pueden ser fosforilados por Src quinasas que están involucrados en la unión de Bat3 (transcripción asociada a HLA-B 3), p85 PI3K, Fyn y Lck a la cola C-terminal de Tim-3. En ausencia de señalización Tim-3 mediada por ligando, Bat3 se une a Tim-3 y bloquea los sitios de unión al dominio SH2 en la cola Tim-3. En este estado, Bat3 recluta la forma catalíticamente activa de Lck, formando así un complejo molecular intracelular con Tim-3 que preserva y potencialmente promueve la señalización de las células T. La unión de Galectina-9 y Ceacam-1 a Tim-3 conduce a la fosforilación de Y256 e Y263 y la liberación de Bat-3 de la cola de Tim-3, promoviendo así la inhibición de células T mediada por Tim-3 al permitir la unión de Src quinasas que contienen el dominio SH2 y la posterior regulación de la señalización del TCR. Curiosamente, Fyn se une a la misma región en la cola Tim-3 que Bat3. Fyn ha sido implicado en la inducción de anergia de células T y se sabe que es una quinasa tecla para activar fosfoproteína asociada a glicoesfingolípidos microdominios (PAG), que recluta Csk para suprimir la función de Lck (Abbas *et al.* 2015)

- LAG3: Debido a que el gen de activación de linfocitos 3 o CD223 posee una estructura altamente homóloga a CD4, también puede unirse a moléculas MHC-II con una mayor afinidad y se va regulando por incremento varios días después de su activación (Sierro *et al.* 2011) y se expresa en las Tregs, iTregs y las Tr1 (Anderson *et al.* 2016).
- ICOS: Coestimulador inducible. Experimentos *in vitro* han confirmado que la capacidad de producir citocinas es diferente en presencia o ausencia de ICOS en las Tregs, donde en presencia se secretan grandes cantidades de IL-10 y cantidades moderadas de TGF- β y son consideradas altamente supresoras (Kornete *et al.* 2012).
- OX-40: Su función principal es para mejorar proliferación y supervivencia de células T CD4 y CD8, así mismo se observó defectos en el desarrollo de Tregs en ratones KO de OX40 (Takeda *et al.* 2004), así como defectos en su mantenimiento, supervivencia y proliferación (Piconese *et al.* 2010)
- CTLA-4: El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos o CD152 se considera un inhibidor del punto de control "líder", ya que elimina células T potencialmente

autorreactivas en una etapa más temprana en contraste con PD-1. Se encuentra involucrado en el “freno intrínseco” de la proliferación de las Tregs, ya que al eliminarlo se obtuvo como resultado una multiplicación de las Tregs mejorada de acuerdo con Schmidt y colaboradores en 2009.

- IL-35: Es una citocina recientemente descubierta con importantes propiedades inflamatorias. Se encuentra conformada por las cadenas α y β , ambas altamente expresadas en las Tregs a comparación de las APCs o las células efectoras (Leclerc *et al.*, 2016). De acuerdo a Collinson y colaboradores en 2007, es considerada como una citocina inmunosupresora y se cree que las Tregs son la principal fuente de IL-35 y es indispensable para su máxima capacidad supresora.

3.5.7. Linfocitos T reguladores y parásitos.

Las Tregs también se encuentran en enfermedades inflamatorias, pero su papel difiere entre los patógenos. En algunos casos, las Tregs modulan la respuesta inmune exacerbada, favoreciendo la supervivencia tanto del huésped como del patógeno (Belkaid y Tarbell, 2009; Maizels y Smith, 2011; Sanchez y Yang, 2011).

Muchos agentes patógenos han desarrollado estrategias de evasión inmune contra el hospedero, generando así condiciones que aseguran su supervivencia durante un periodo prolongado de tiempo, y en particular, los microorganismos inducen una gran variedad de células reguladoras para el mismo fin, lo que implica que la inducción de las Tregs es resultado de la respuesta del hospedero al proceso infeccioso en un intento por mantener o restaurar un entorno homeostático (Belkaid, 2007).

De acuerdo a Belkaid *et al.* en 2002 existe evidencia explícita de que los parásitos estimulan poblaciones supresoras de células T, como es el caso de las Tregs. Así mismo en algunos casos esta población celular parece prolongar la supervivencia del patógeno, mientras que en otros las respuestas inmunitarias potencialmente patógenas se regulan a la baja.

En 2003 Powrie y colaboradores observaron que las Tregs activadas logran controlar eficazmente a las células T y respuesta innata en modelos murinos de colitis, minimizando el daño colateral en tejido y de igual forma destacan que las Tregs previenen respuestas exacerbadas contra la flora y mantienen la integridad en el intestino.

Los parásitos helmintos ha desarrollado estrategias e inducen respuestas inmunes similares a pesar de su gran divergencia evolutiva, denominadas respuestas de tipo Th2 estereotipadas, caracterizadas por la secreción de altos niveles de citocinas antiinflamatorias como IL-6, IL-9, IL-10, IL-25, IL-33, TGF- β y principalmente IL-4 e IL-13 (Anthony *et al.* 2007), y como consecuencia/origen de esta secreción de citocinas, hay

alteraciones como altos niveles de linfocitos T CD4+ diferenciados en subconjuntos reguladores Th2 y Tregs, entre otros (Maizels *et al.*, 2004).

3.6. Parásitos moduladores.

En la actualidad los helmintos y sus antígenos son reconocidos por poseer importantes actividades inmunomoduladoras, pero sigue sin estar claro como la infección helmíntica causa estos efectos inmunoreguladores (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003). Una característica clave de las infecciones por helmintos es la inducción de respuestas inmunes Th2 en sus huéspedes (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003; Maizels *et al.* 2004). Los parásitos helmintos han desarrollado mecanismos complejos y efectivos para evadir las respuestas inmunitarias de sus hospederos, utilizando estrategias inmunorreguladoras para evitar mecanismos efectores inmunes y de forma general, estos procesos son necesarios para que los parásitos completen sus largos ciclos de vida o para favorecer la supervivencia del huésped (Schmid-Hempel, 2009; Herbert *et al.* 2004) (Tabla 1).

La infección crónica con *Schistosoma mansoni* en ratones igualmente ilustra el papel protector de las células T reguladoras, ya que en la eliminación de la población celular, aumenta el daño al hígado (Hesse *et al.* 2004). Ante la presencia de una infección crónica con *Heligmosomoides polygyrus* se da la expansión y activación de células Treg CD4+ CD25+, estimulando la expresión de CD103 (Finney *et al.* 2007). La infección por el helminto *Brugia malayi* aumenta la expansión de las Treg con expresión de CD103 y CTLA-4 (McSorley, *et al.* 2008). Respecto a la regulación de inflamación intestinal, durante las infecciones con *Trichuris muris* y *H. polygyrus* (Rausch *et al.* 2009), al eliminar las Treg conduce a un incremento en el daño e hiperplasia de las criptas, aunque la producción de moco no se ve afectado, en humanos tiende a haber una expresión reducida de Foxp3, CTLA-4 y TGF- β y un aumento de las respuestas Th1 y Th17 (Babu *et al.* 2009).

Parásito y productos	Modulación	Autor
<i>Fasciola hepatica</i>	Vesículas extracelulares del helminto modulan respuesta inmune durante colitis	Roig <i>et al.</i> 2018
<i>Schistosoma japonicum</i>	Infección reduce susceptibilidad a colitis. Antígeno soluble en células dendríticas atenúa severidad de colitis	Liu <i>et al.</i> y Wang <i>et al.</i> 2017
<i>Trichuris muris</i> y <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Treg son importantes en la protección contra inflamación intestinal	Rausch <i>et al.</i> 2009
<i>H. polygyrus</i> y <i>Brugia malayi</i>	Expansión y activación de Treg CD4+ CD25+, estimulando la expresión de CD103	McSorley, <i>et al.</i> 2008 Finney <i>et al.</i> 2007
<i>S. mansoni</i>	Al eliminar Treg hay aumento de daño hepático	Hesse <i>et al.</i> 2004
<i>T. crassiceps</i>	Induce respuesta inmune tipo Th2	Terrazas <i>et al.</i> 1998

Tabla 1.- Parásitos involucrados en modulación de la respuesta inmune. Debido a las distintas estrategias de evasión, determinados parásitos cuentan con una importante actividad inmunomoduladora.

3.6.1. *Taenia crassiceps*.

Otro de los helmintos importantes con capacidades inmunoregulatoras incluye a *Taenia crassiceps*, éste parásito helminto pertenece al filo Platyhelminthes, clase Cestoda (Goeze y Zeder, 1800) con la habilidad de modular el sistema inmune del hospedero, generando en él un ambiente que le permita sobrevivir (Becerra-Díaz y Terrazas, 2014).

T. crassiceps presenta actividad inmunomoduladora mediante la inducción de la respuesta inmune del tipo Th2 (Terrazas *et al.* 1998).

La mayoría de estos cambios se deben a la capacidad del parásito para excretar/secretar antígenos con propiedades inmunorreguladoras (Gómez-García *et al.* 2006; Hewitson *et al.* 2009).

Se considera que este organismo es útil para el diagnóstico inmunológico en humanos infectados por *Taenia solium*, ya que se ha comprobado su similitud antigénica con *Taenia crassiceps*, siendo que pacientes con neurocisticercosis reconocen su antígeno de forma positiva (Terrazas *et al.* 1998 y Sciutto *et al.* 1990) (Figura 11).

Los mecanismos mediante los cuales los helmintos parásitos adquieren este efecto inmunomodulador no se conocen por completo, pero lo que sí se sabe es que desarrollan estos mecanismos de forma satisfactoria y sofisticada para mantener el ambiente regulatorio sin ocasionar daños secundarios (Pearce y Reiner, 1995; Maizels *et al.* 2004). Así mismo se ha analizado la población de linfocitos Treg durante distintas fases de la infección de *T. crassiceps* pero no se han encontrado cambios en los porcentajes de la población celular (Adalid-Peralta *et al.* 2013).

3.6.2. Modulación de la respuesta inmunitaria generada por *Taenia crassiceps*

T. crassiceps induce una respuesta tipo Th1 rápida que se asocia con la eliminación del parásito, ya que la administración de IFN- γ exógena genera inmunidad contra *T. crassiceps* (Terrazas *et al.* 1999), probablemente a través de la producción de óxido nítrico, ya que este último se asocia a la protección (Alonso-Trujillo *et al.* 2007) durante las dos primeras semanas, que conforme avanza el tiempo se vuelve más difícil de detectar, mientras que a partir de la semana 4 se genera una respuesta tipo Th2 (Terrazas *et al.* 1998), que puede ser replicada *in vivo* mediante la inyección de extracto de antígenos soluble, donde la estructura intacta de los glicanos juega un papel clave (Gómez-García *et al.* 2006) (Figura 6).

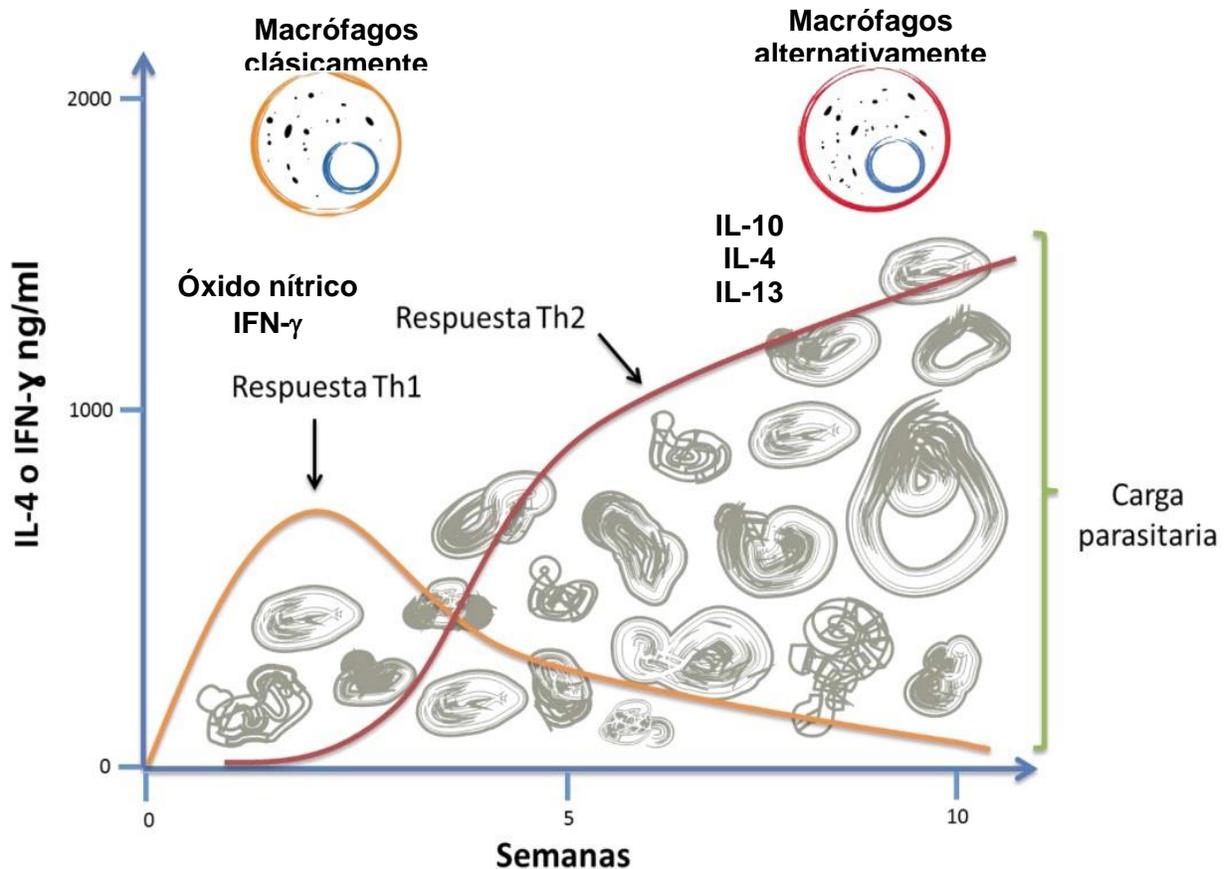


Figura 6.- Infección de *T. crassiceps*. La infección con metacestodos de este parásito en peritoneo de roedores induce el modelo de cisticercosis experimental, donde podemos observar una respuesta tipo Th1 en las primeras semanas de infección, presentando baja cantidad de carga parasitaria, altos niveles de IFN- γ , IL-1 β , NO entre otros, después de 4 semanas, la infección se vuelve crónica y la respuesta se polariza al tipo Th2 donde hay reclutamiento de eosinófilos y citocinas como IL-10 o IL-4 favoreciendo así el aumento de la carga parasitaria. (Tomado de N.Peón *et al.* 2013).

3.6.3. Células inducidas por *T. crassiceps*.

La etapa crónica de la infección caracterizada por la presencia de citocinas Th2, tales como IL-4, IL-13, IL-5 e IL-10, generan células con perfil supresor como macrófagos alternativamente activados (M2). Sin embargo, se desconoce si otras poblaciones celulares se están induciendo como células T reguladoras (Duque y Rojas. 2007).

3.6.4. Antígenos excretados/secretados de *T. crassiceps*.

Se sabe que la inhibición de respuesta proinflamatorias y la inducción de inmunidad Th2 durante las infecciones helmínticas dependen de la capacidad del parásito de

excretar/secretar antígenos con propiedades inmunorreguladoras con efectos importantes en las células mieloides supresoras (MDSCs), reclutamiento de eosinófilos y basófilos deterioro en la maduración de células dendríticas, macrófagos alternativamente activados y en algunos casos la inducción de células T reguladoras (Gómez-García *et al.* 2006; Hewitson *et al.* 2009; Harnett y Harnett 2010).

Por otro lado se ha reportado que la inoculación vía intraperitoneal de antígenos excretados/secretados de *T. crassiceps* puede generar linfocitos T CD4+ efectores que secretan altos niveles de citocinas Th2, así como en la infección (Gómez-García *et al.* 2005), así como la inducción del reclutamiento de células mieloides supresoras que pueden inhibir la proliferación de linfocitos T activados, así como células dendríticas con un perfil inmaduro y tolerantes a LPS (Terrazas *et al.* 2011) capaces de responder eficientemente contra agonistas que podrían inducir citocinas proinflamatorias (Figura 7).

Sin embargo no se tiene evidencia si los TcES puedan generar poblaciones de linfocitos Treg que a su vez modulen procesos inflamatorios como la colitis, mediante la expresión de moléculas supresoras, evitando así la activación de linfocitos T con un perfil inflamatorio

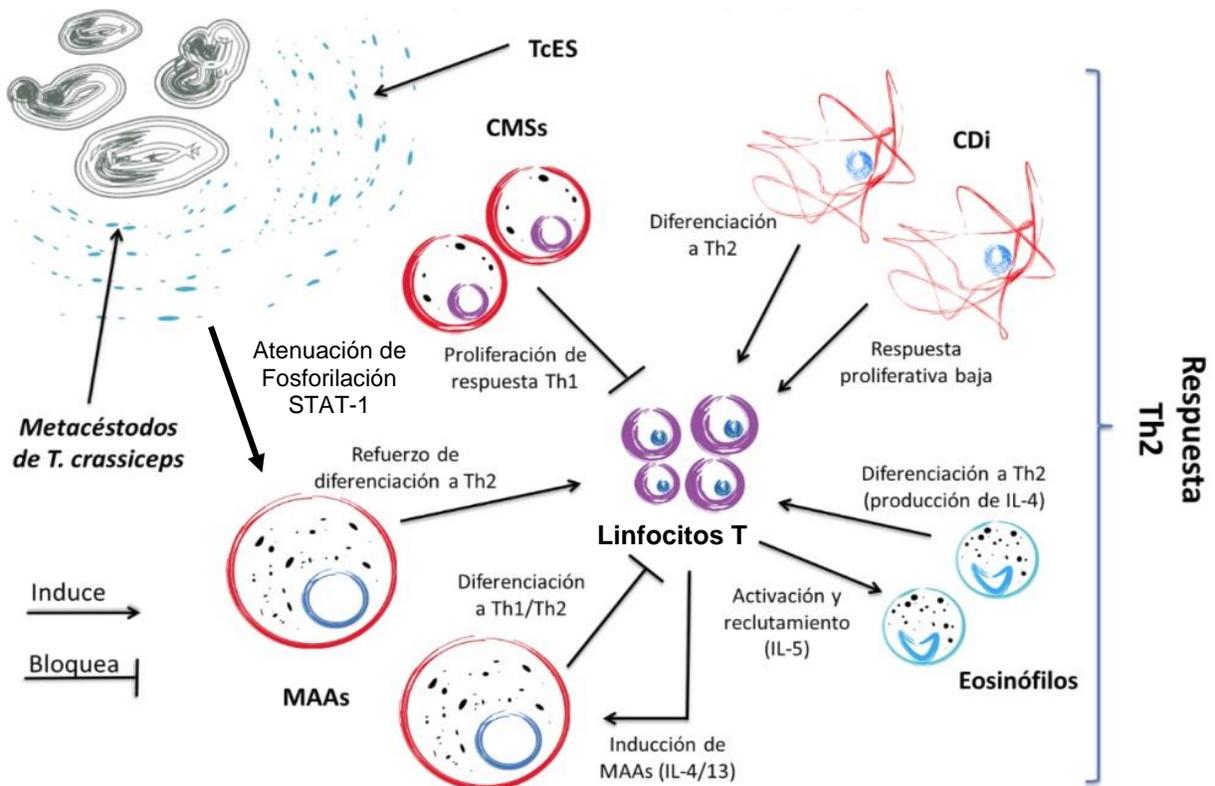


Figura 7.- Modulación de la respuesta inmune por antígenos excretados/secretados de *T. crassiceps*. Poblaciones celulares moduladas por los productos de *T. crassiceps*, (Tomado de N.Peón *et al.* 2013).

4. Justificación.

Las enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa han incrementado con el paso del tiempo, lo que también ha llevado a aumentar los casos de cáncer de colon asociado a colitis. La causa de las EII permanece desconocida sin embargo, se sabe que la inflamación juega un papel muy importante. La colitis es un desorden inflamatorio crónico con disrupción en la función de la barrera epitelial. Por otro lado, la exacerbada inflamación generada durante el desarrollo de la colitis podría ser controlada con mecanismos inmunosupresores generados por una variedad de células con propiedades reguladoras y supresoras como las células Tregs. Sakaguchi y colaboradores, en 1995 describen que la tolerancia a los autotantígenos y a las bacterias comensales del intestino es mantenida por las células Treg al inhibir la proliferación y las funciones de otras células T.

Eastaff-Leung y colaboradores en 2010, encontraron una sobreexpresión de Foxp3 en la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, lo que sugiere que las Tregs pueden reclutarse activamente en la mucosa intestinal con el fin de suprimir la respuesta inmune proinflamatoria.

Antecedentes en el laboratorio indican que la administración de TcES a ratones con colitis genera una gran cantidad de IL-10 en colon, siendo esta citocina una de las principales producidas por células Tregs, monocitos y macrófagos alternativamente activados (M2) y células Treg. Se desconoce si estas moléculas producidas por el parásito pueden generar poblaciones de células Treg y si los TcES pueden modificar la expresión de moléculas de activación celular. Por lo que este trabajo se centró en evaluar si los antígenos producidos por *Taenia crassiceps* generan células T reguladoras con diferente grado de activación como células supresoras de procesos inflamatorios para modular el desarrollo de la colitis experimental.

5. Hipótesis.

Los antígenos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* modulan el reclutamiento y activación de linfocitos T reguladores como un mecanismo modulador del desarrollo de la colitis experimental.

6. Objetivos.

6.1. Objetivo general.

Determinar si los antígenos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* alteran el reclutamiento y la activación de células T reguladoras en colitis experimental.

6.2. Objetivos particulares.

- Evaluar el modelo de colitis experimental mediante el IAE, pérdida de peso y daño histopatológico en los diferentes tratamientos.
- Determinar presencia de Tregs en circulación, bazo, peritoneo, ganglios linfáticos mesentéricos y lámina propia de ratones con colitis y tratados con TcES.
- Analizar la expresión de moléculas como CD103, PD1 y Tim-3 en células Treg de los diferentes grupos experimentales.
- Evaluar la expresión de los genes MUC2 y TGF- β en colon de los grupos de estudio.

7. Materiales y métodos.

7.1. Material biológico.

Se utilizaron ratones hembras de la cepa C.Cg-FoxP3^{tm1Tch/j} de 7 a 8 semanas de edad, divididos en 4 grupos experimentales: Control, DSS (administración vía oral de Dextran Sulfato de Sodio al 4%), DSS+TcES (administración de DSS al 4% e inoculación vía intraperitoneal de 200µg de TcES) y TcEs (inoculación de 200µg de TcES).

7.2. Infección ratones con *T. crassiceps*.

Se indujo cisticercosis experimental en ratones hembras de la cepa BALB/c de 4 a 6 semanas de edad, con 20 metacéstodos de *T. crassiceps* (cepa ORF), con un tamaño de 2-3mm, redondos y sin gemaciones. Los cisticercos se obtuvieron después 8-10 semanas de infección. Se lavaron 4 veces con solución salina y se inocularon vía intraperitoneal con 0.5ml de solución salina (PISA) con jeringas de 1ml.

7.3. Obtención de antígenos excretados/secretados de *T. crassiceps*.

Los metacéstodos se obtuvieron de cavidad peritoneal de ratones BALB/c infectados de ocho a diez semanas en condiciones estériles, se lavaron con solución salina 4-5 veces y posteriormente se incubaron por 24 y 48 horas con solución salina en botellas de cultivo con filtro en una proporción 1:2 a 37°C con 5% de CO₂.

Una vez transcurridos los tiempos, se recuperaron los sobrenadantes con las excreciones y secreciones de los parásitos, se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se desecharon los detritos.

Posteriormente se concentró el sobrenadante en tubos AMICON (Ultra Filter Millipore) con una membrana de 50 kDa, se centrifugaron durante 40-50 minutos a 4000rpm y una vez que bajó todo el sobrenadante, se recuperó la fracción >50kDa y se desechó la porción restante.

Posteriormente se le agregó inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich) en una proporción de 1µl/ml. Se homogenizó y se pasó por un filtro de 0.20µm y por último se hicieron alícuotas en tubos eppendorf estériles de 1.5ml para almacenarse a -70°C hasta su uso.

7.4. Cuantificación de proteínas de TcES por método de Bradford.

La concentración de las proteínas del TcES se realizó por el método de Bradford, donde en una placa de 96 pozos se realizó una curva tipo ocupando como estándar BSA 100µg/ml, haciendo diluciones seriadas 1:2 hasta una concentración de 1.56µg/ml por duplicado. Las muestras de TcES se diluyeron a partir de una dilución 1:10 hasta 1:80.

A cada pozo se le adicionó 100µl de reactivo de Bradford (Sigma Aldrich) y se mezcló suavemente evitando burbujas. Se determinó la absorbancia a 570nm en un lector de ELISAS (Thermo LabSystems Multiskan Ascent 354) y calcular la concentración de TcES.

7.5. Integridad de TcES por electroforesis.

Para determinar el peso molecular y verificar la integridad de los TcES, se realizó una electroforesis de proteínas en SDS-PAGE con geles de poliacrilamida al 10%, se colocaron 30 µg de las proteínas y marcador de peso molecular (Thermo scientific), el corrimiento se realizó a 90V, 150mA por dos horas, para posteriormente teñir las proteínas con azul de Comassie durante 15 minutos en agitación. Posteriormente se retiró el colorante y para eliminar su exceso en el gel se agregó solución desteñidora para visualizar las bandas del TcES.

7.6. Inducción de colitis experimental.

Se formaron 4 grupos: Control, DSS, DSS+TcES y TcES, (n=5 ratones por grupo). Se indujo colitis mediante la administración oral de Dextran Sulfato de Sodio (DSS) (DSS P.M. 40000, Alfa Aesar, Canadá) al 4% diluido en agua potable estéril a los grupos de ratones DSS y DSS+TcES, durante un periodo de 9-11 días. El grupo control y TcES solo recibieron agua potable.

Los ratones de los grupos DSS+TcES y TcES fueron inoculados vía intraperitoneal con 200µg de TcES diariamente, a partir del segundo día de inducción de colitis experimental hasta un día antes del sacrificio.

7.7. Evaluación del modelo de colitis experimental.

Para determinar el grado de severidad de la colitis ulcerativa, se registró diariamente el peso de cada uno de los ratones de los cuatro grupos, así como el IAE para el cual se tomaron los criterios siguientes: moco, diarrea, presencia de sangre en heces y sangrado rectal, siendo 0 ausente o sano y 4 el valor máximo de daño.

Después del sacrificio se extrajo el colon de cada ratón para registrar su longitud.

7.8. Obtención de células de circulación.

Los ratones fueron sangrados de la cola previo al sacrificio, obteniendo 100µl de sangre en un tubo eppendorf de 1.5ml con 100µl de EDTA al 1%.

La sangre fue mezclada con el anticoagulante para posterior determinación de las poblaciones celulares por citometria de flujo.

7.9. Obtención de células de peritoneo.

En condiciones estériles, se inyectaron 10ml de solución salina vía intraperitoneal (Pisa) 5 veces para realizar lavados de la cavidad y así obtener las células con ayuda de una jeringa y se colocaron en tubos estériles de 15ml. Posteriormente se centrifugaron a 2500rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1ml de buffer de tinción. Después se contaron las células en cámara de Neubauer con colorante azul Tripano para asegurar la viabilidad de las células.

7.10. Obtención de células de bazo.

Se extrajo el bazo, éste se colocó en un tubo estéril de 15ml, después fue perfundido con 10ml de solución salina con ayuda de una jeringa de 10ml y una aguja de tuberculina, sobre el mismo tubo para obtener los esplenocitos.

A continuación, las células fueron centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos el sobrenadante se decantó se resuspendió el paquete celular, al cual se le agregó 5ml de solución hemolizante durante 10 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo con 5ml de solución salina. Posteriormente las células fueron lavadas a 1500rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 3ml de buffer de tinción.

Se contaron las células con el colorante azul Tripano en una cámara de Neubauer.

7.11. Obtención de células de ganglios linfáticos mesentéricos.

Se extrajeron los 3 ganglios linfáticos mesentéricos cercanos a la zona proximal del ciego intestinal, posteriormente fueron macerados con ayuda de tela de organza y lavados con medio de cultivo RPMI, se colocaron las células obtenidas en tubos de 15ml. Se centrifugaron las células a 1500rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 1ml de medio de cultivo RPMI. Las células fueron contadas con el colorante azul Tripano.

7.12. Obtención de células de lámina propia.

Una vez obtenidas las porciones de intestino para histologías, se utilizó el resto de tejido para la obtención de células de lámina propia. El intestino se abrió longitudinalmente y se lavó con HBSS + Antibiótico 1x frío para retirar restos de heces, se realizaron 4 lavados en agitación por 2 minutos cada uno. Posteriormente se lavó con HBSS + EDTA 2mM (J.T.Baker, México) + SBF 2% + Antibiótico 1x para retirar la mayor parte de mucosa intestinal y se incubó a 37°C en agitación a 250rpm. Se lavaron con HBSS + SBF 2% + Antibiótico 1x.

Con ayuda de una navaja de bisturí se cortó el colon en pedazos no mayores a 2mm. El intestino se puso a digerir en medio RPMI + SBF 10% + 40µl/ml de desoxirribonucleasa I de páncreas bovino (DNAasa I) (Sigma, EUA) + antibiótico 1x + 0.5mg/ml de Colagenasa D de *Clostridium histolyticum* Clostridiopeptidasa liofilizada (Roche, Alemania), manteniéndolas en agitación a 250rpm a 37°C por 30 minutos.

Posteriormente se pasaron las células por un filtro de 100µm y después por uno de 40µm (BD, Falcon, EUA) para retirar restos de tejido. Las muestras de tejido fueron centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos. Para quitar restos de colagenasa, las células fueron lavadas con medio RPMI completo (Antibiótico 1x + SBF 10%) por 10 minutos a 1500rpm y se resuspendieron en 5ml de medio RPMI.

Las células fueron separadas mediante un gradiente de Percoll al 30 y 70% (GE Healthcare, EUA) con una densidad de 1.130b/ml formando dos fases y centrifugando a 2000rpm durante 30 minutos sin freno. Se recuperó la fase media de los gradientes, posteriormente fueron lavadas 2 veces con buffer de tinción.

Una vez finalizada la extracción de células de lámina propia, se colocaron en tubos para citometría, se contaron las células con una cámara de Neubauer con el colorante azul Tripano.

7.13. Citometría de flujo.

- Tinción de células de circulación.

Se colocaron 50µl células de sangre más 50µl de buffer de tinción en tubos para citometría (BD Falcon) y posteriormente se agregaron 100µl de la mezcla de anticuerpos: como se indica en la tabla 2.

Anticuerpo	Fluorocromo	Título del anticuerpo (µl)	Catálogo	Marca
CD4	PB	0.1	558107	BD
CD8	BV605	0.3	563152	BD
CD25	APCy7	0.5	102026	Biolegend

Tabla 2.- Anticuerpos utilizados para la tinción de células de circulación. PB (Pacific Blue), BV605 (Brilliant Violet 605) y APC (Aloficocianina).

Se incubaron por 30 minutos a 4°C protegidas de la luz y una vez transcurrido el tiempo, las muestras se procesaron con 3ml de solución hemolizante durante 13 minutos a temperatura ambiente y cubiertas de la luz. La reacción se detuvo con 1ml de buffer de

tinción y se lavaron a 1500rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados más con buffer de tinción.

Para finalizar, las células fueron resuspendidas en 500µl del mismo buffer.

- Tinción de células de bazo.

Se colocaron 1×10^6 células de la muestra más 1ml de buffer de tinción en tubos para citometría (BD Falcon), se centrifugaron a 1500rpm por 5 minutos, se decantó el exceso de buffer de tinción y se homogenizaron las muestras. Después se agregaron 100µl de la siguiente mezcla de anticuerpos:

Anticuerpo	Fluorocromo	Título del anticuerpo (µl)	Catálogo	Marca
CD4	PE	0.1	558107	BD
CD8	BV 605	0.3	563152	BD
CD25	APCy7	0.5	102026	Biolegend
PD-1	PECy7	0.7	135216	Biolegend
Tim-3	PE	1	134003	Biolegend

Tabla 3.- Anticuerpos utilizados para la tinción de células de bazo. PB (Pacific Blue), BV605 (Brilliant Violet 605), APC (Aloficocianina), PE (Ficoeritrina).

Se incubaron por 30 minutos a 4°C protegidas de la luz y una vez transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción con 1ml de buffer de tinción y las células fueron centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 500µl buffer de tinción.

- Tinción de células de peritoneo, ganglios linfáticos mesentéricos y lámina propia.

Se colocaron 1×10^6 células de la muestra más 1ml de buffer de tinción en tubos para citometría (BD Falcon), se centrifugaron a 1500rpm por 5 minutos, se decantó el exceso de buffer de tinción y se homogenizaron las muestras. Después se agregaron 100µl de la siguiente mezcla de anticuerpos:

Anticuerpo	Fluorocromo	Título del anticuerpo (µl)	Catálogo	Marca
CD4	PB	0.1	558107	BD
CD8	BV 605	0.3	563152	BD
CD25	APCy7	0.5	102026	Biolegend
PD-1	PECy7	0.7	135216	Biolegend
Tim-3	PE	1	134003	Biolegend
CD103	Alexa647	1	121410	Biolegend

Tabla 4.- Anticuerpos utilizados para la tinción de células de lámina propia, peritoneo y ganglios linfáticos mesentéricos. PB (Pacific Blue), BV605 (Brilliant Violet 605), APC (Alofococianina), PE (Ficoeritrina).

Se incubaron por 30 minutos a 4°C protegidas de la luz y una vez transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción con 1ml de buffer de tinción y se lavaron las células a 1500rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 500µl buffer de tinción.

Para finalizar, todas las muestras se leyeron en el citómetro Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) tomando 250µl. A su vez, los datos obtenidos fueron analizados con el software FlowJo v10.1r7.

7.14. Histología de intestino.

Los colon fueron lavados con solución salina (Pisa) y se cortó de la parte distal una porción de aproximadamente 0.5cm, se conservó en 5ml de etanol al 100% a 4°C no más de 7 días, después los tejidos se colocaron en casetes de inclusión para pasarlos por etanol absoluto 1, 2 y 3, dejando los tejidos 1 hora en cada uno. A continuación pasaron a xilol 1, 2 y 3, dejándolos 40 minutos en cada uno. Finalmente pasaron por parafina 1, 2 y 3, durante 1 hora en cada una a una temperatura de 56°C. Los tejidos se incluyeron en una consola de inclusión (Lupetec, Brasil) y se realizaron cortes histológicos de 4µm de grosor con un microtomo (Leica, Alemania), que fueron montados en portaobjetos previamente tratados con poly-L-lisina (Sigma, EUA). Para la extensión del tejido se utilizó un baño de flotación (Gesellschaft für Labortechnik, Alemania) con agua destilada a 56°C. Para retirar el exceso de parafina, los portaobjetos se incubaron a 58°C por 1 hora.

7.15. Tinción Hematoxilina - Eosina.

Se realizó la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) (Sigma, EUA.) para determinar la estructura del colon, observar infiltrado celular, grosor de la lámina propia, estructura de las criptas, vellosidades y microvellosidades. Los tejidos pasaron por xilol absoluto, alcohol-xilol, alcohol absoluto, alcohol al 90, 80 y 70%, posteriormente por hematoxilina durante 1 minuto y se enjuagó con agua corriente para poder pasarlos a alcohol-ácido y se volvieron a lavar en agua corriente. Después pasaron por eosina durante 1 minuto y se lavaron con agua corriente. Finalmente se colocaron en alcohol 70, 80, 90 100% durante 3 minutos y en xilol.

Las laminillas se montaron con entellán (Merck Millipore) y se observaron en microscopio óptico (Zeiss, Alemania), utilizando el programa AxioVisionRel 4.6n (Zeiss, Alemania), las fotos fueron tomadas con la cámara AxioCam ICc3 (Zeiss, Alemania) con objetivos 10x y 20x.

7.16. Tinción de células caliciformes.

Así mismo se llevó a cabo una tinción de Alcian Blue (Sigma, EUA) para determinar la presencia de células caliciformes, mediante xilol durante 10 minutos, alcohol-xilol por tres minutos, alcohol absoluto, 90, 80 y 70% por 2 minutos y se lavaron con agua corriente. Luego se les colocó el colorante Alcian Blue 1:100 durante 30 segundos con una pipeta pasteur directamente en los tejidos y se lavaron con agua corriente. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina por 1 minuto y se lavaron con agua corriente, para colocarse después en ácido clorhídrico al 0.25% durante 25 segundos y lavarse en agua corriente. Después se colocaron en agua amoniacal al 0.25% por 3 segundos y se volvieron a lavar. Se pasaron por alcohol al 70% durante 1 minuto y luego se tiñeron con eosina durante 15 segundos. Para finalizar, pasaron por alcohol al 95 y al 100% durante 1 minuto cada uno y por xilol durante 5 minutos.

Las laminillas se montaron con entellán (J. T. Baker, México) y se observaron en microscopio óptico (Zeiss, Alemania), utilizando el programa AxioVisionRel 4.6n (Zeiss, Alemania), las fotos fueron tomadas con la cámara AxioCam ICc3 (Zeiss, Alemania) con objetivos 10x y 20x.

7.17. Extracción de RNA de intestino.

La extracción de proteínas de intestino se realizó con el kit RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (Norgen Biotek Corp. Product #47700). Se transfirió el tejido a un mortero para macerar con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se colocó en un tubo eppendorf con 300 µl de buffer SKP para lisar el tejido, posteriormente el tejido ya lisado se pasó 5 veces

por una aguja de 25 Gs y se dio un spin a 2500 rpm durante 2 minutos. Se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf y se ensambló la columna gDNA Purification en el tubo Collection del mismo kit, y se agregaron 600 µl del lisado para centrifugarse a 8000 rpm por 1 minuto hasta que todo el volumen pasó por la columna y así conservar sólo RNA y proteínas.

Para la purificación de RNA se ensambló la columna en tubo Collection, y a cada 100 µl del flujo se le agregó 60 µl de etanol absoluto. Después se ensambló la columna de RNA/Protein Purification con el tubo Collection y se agregó 600 µl del lisado con etanol para centrifugarse a 6000 rpm por 2 minutos hasta que todo el volumen pasó por la columna. A su vez se agregó 0.5 µl de inhibidor de fosfatasas (Sigma) y 3 µl de inhibidor de proteasas, por cada 300 µl de flujo.

Posteriormente para el lavado de RNA, se ensambló la columna en tubo Collection y se le agregó 400 µl de Wash Solution A y se centrifugó a 6000 rpm por 1 minuto, se descartó el flujo y se volvió a ensamblar la columna con tubo Collection, este paso se realizó 3 veces. Se descartó el flujo después del último lavado, se ensambló columna con tubo Collection y se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos, después se descartó el tubo Collection.

Para la elución de RNA se colocó la columna en los tubos de elución del kit de 1.7 ml y se agregó 50 µl de Elution Solution A, se centrifugó a 2000 rpm por 2 minutos y luego a 14000 rpm por 1 minuto.

Finalmente el RNA se conservó a -70°C.

Se realizó la cuantificación del RNA obtenido con espectrofotómetro (Epoch 2 Biotek, EUA) y se realizó su conversión a cDNA con el termociclador () usando 4µl de buffer 5x, 1 µl de Ribolock, 2 µl de dNTPs 10mM y 1 µl de R Transcriptasa con las condiciones... Posteriormente se realizó la cuantificación de cDNA y se realizaron los cálculos para cargar 4 µl del mismo para cada muestra.

7.18. PCR punto final de intestino.

Se realizó PCR de punto final de tejido de intestino para determinar la expresión del gen constitutivo GAPDH (Tm 54°C 201 Pb) y los genes MUC2 (Tm 60°C 531Pb) y TGF-β (Tm 60 °C 195Pb), utilizando 6.25 µl de la polimerasa Mg Taq Go y 1 µl de los primers forward y reverse respectivamente para cada uno de los genes. IDT INTEGRAL DNA TECHNOLOGIES

Mezcla de reacción	µl/muestra
Mg Taq Go	6.25
Primer F	1
Primer R	1
Agua	12.75

Tabla 5.- Mezcla de reacción para PCR punto de final. Intestino para los genes GAPDH, MUC2 y TGF- β .

El producto obtenido en cada uno de los genes se electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1x y Bromuro de Etidio (Amresco, EUA) en cámara molde. Una vez gelificado se agregó buffer de carga juice 1x (Invitrogen, EUA) y se colocaron 10 µl del producto. En el primer carril se colocó marcador de peso molecular. Las muestras se corrieron durante 30 minutos a 100 volts y se observaron en un transiluminador de luz UV. Las imágenes se capturaron con el programa BioSens SC 645.

7.19. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 6, desarrollando una análisis con la prueba paramétrica ANOVA de un factor para obtener las diferencias significativas y con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples y así determinar entre qué grupos existían dichas diferencias. Se consideró estadísticamente significativos valores con $p < 0.05$.

8. Resultados.

8.1. Evaluación del progreso de colitis experimental.

Durante 9 días de inducción de colitis e inoculación de TcES se registró el peso en cada uno de los grupos de ratones de los diferentes grupo (Control, DSS 4%, DSS 4%+TcES y TcES). A partir del día 6 se determinó una disminución en el peso de los ratones tratados únicamente con DSS 4%, mientras que los otros tres grupos mantuvieron su peso (X). En el día 8, el grupo de DSS tuvo una pérdida significativa de peso (X) como se muestra en la figura 8A.

Por otra parte, se obtuvo el IAE, para determinar la severidad de la enfermedad, evaluando mediante la presencia de factores como sangre, diarrea y moco, considerando los valores de 0 a 4, donde 0 es ausencia o estado normal y sano, 1 moderado, 2 abundante, 3 más abundantes y 4 valor máximo de enfermedad.

En la figura 8B se observa el avance de la enfermedad a lo largo de los días de inducción de colitis ulcerativa y es notorio que en el grupo tratado con DSS aumenta el daño durante el paso del tiempo a comparación del grupo con colitis tratado con TcES.

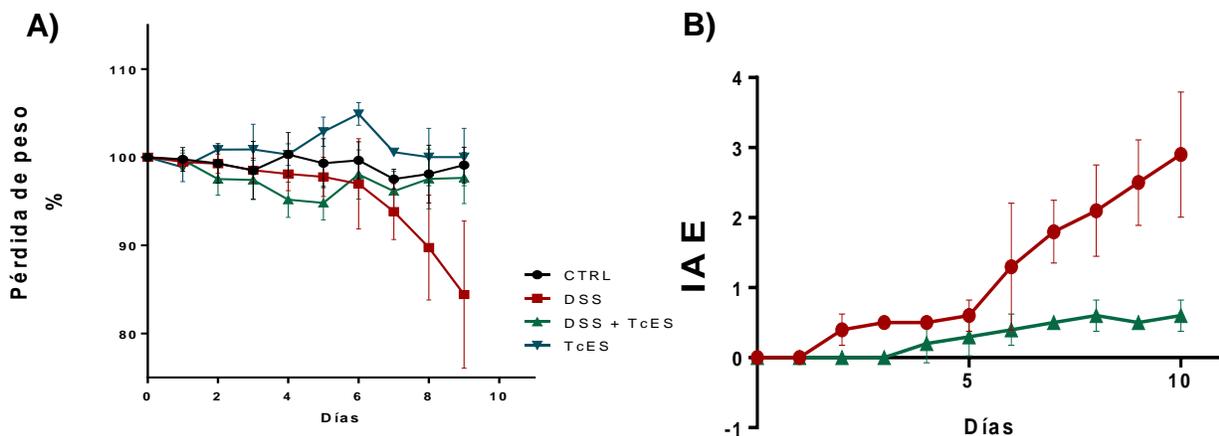


Figura 8.- Porcentajes de pérdida de peso y evaluación del Índice de Actividad de la Enfermedad. A) Cambios diarios en el peso corporal durante los distintos tratamientos (Ctrl, DSS, DSS+TcES, TcES) se expresan como porcentajes. B) Cambios en el IAE sobre el curso de los tratamientos DSS, DSS+TcES y TcES. Datos de 2 experimentos independientes de cuatro grupos de ratones. Los valores se consideraron estadísticamente significativos con una $p < 0.05$.

8.2. Longitud del colon.

El grupo control mostró una longitud de colon de 7.12cm, mientras que con el tratamiento de DSS la longitud del colon disminuyó a $X=4.74$ cm . Con el tratamiento de DSS+TcES

aumentó la longitud del colon en $X=5.94\text{cm}$, resultados similares fueron encontrados con el tratamiento con los TcES (Figura 9).

Indicando que los TcES disminuyen el desarrollo de la colitis.

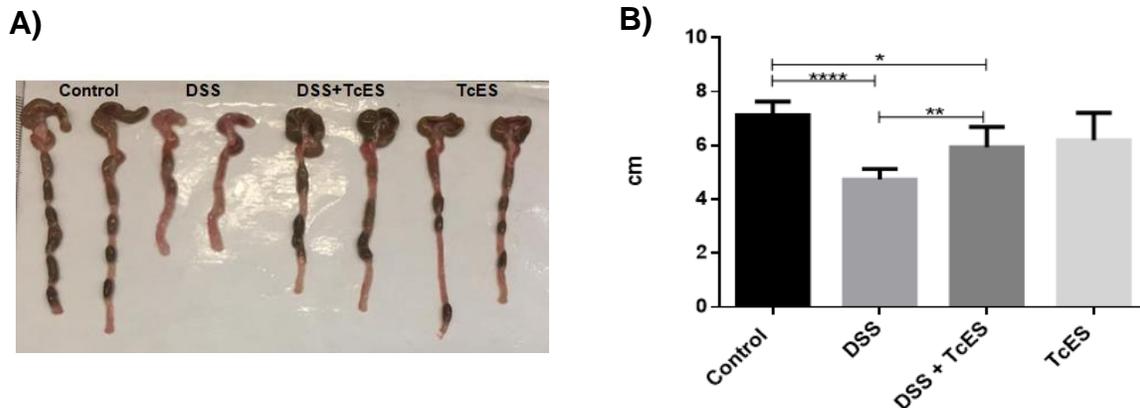


Figura 9.-Cambios macroscópicos en el colon. A) Imagen representativa de cambios macroscópicos y longitud de colon B) Los cambios de la longitud del colon y ciego se determinaron en los cuatro grupos de estudio. Datos de 2 experimentos independientes de cuatro grupos de ratones. Los valores se consideraron estadísticamente significativos con una $p<0.05$.

8.3. Evaluación del daño histopatológico.

Se realizaron cortes transversales en la región distal del intestino para evaluar el daño a nivel histopatológico y se procedió a realizar tinción de H-E y Alcian Blue. En la figura 10 se demostró que el grupo de ratones tratados con DSS presentaron una disrupción de la barrera epitelial, así como una alteración en la estructura normal del colon, es decir, pérdida de criptas y vellosidades e infiltrado, mientras que en el grupo tratado con DSS+TcES el daño histopatológico fue menor ya que se observa la estructura intestinal de las criptas y la integridad de la barrera epitelial más conservada y con menor infiltrado inflamatorio.

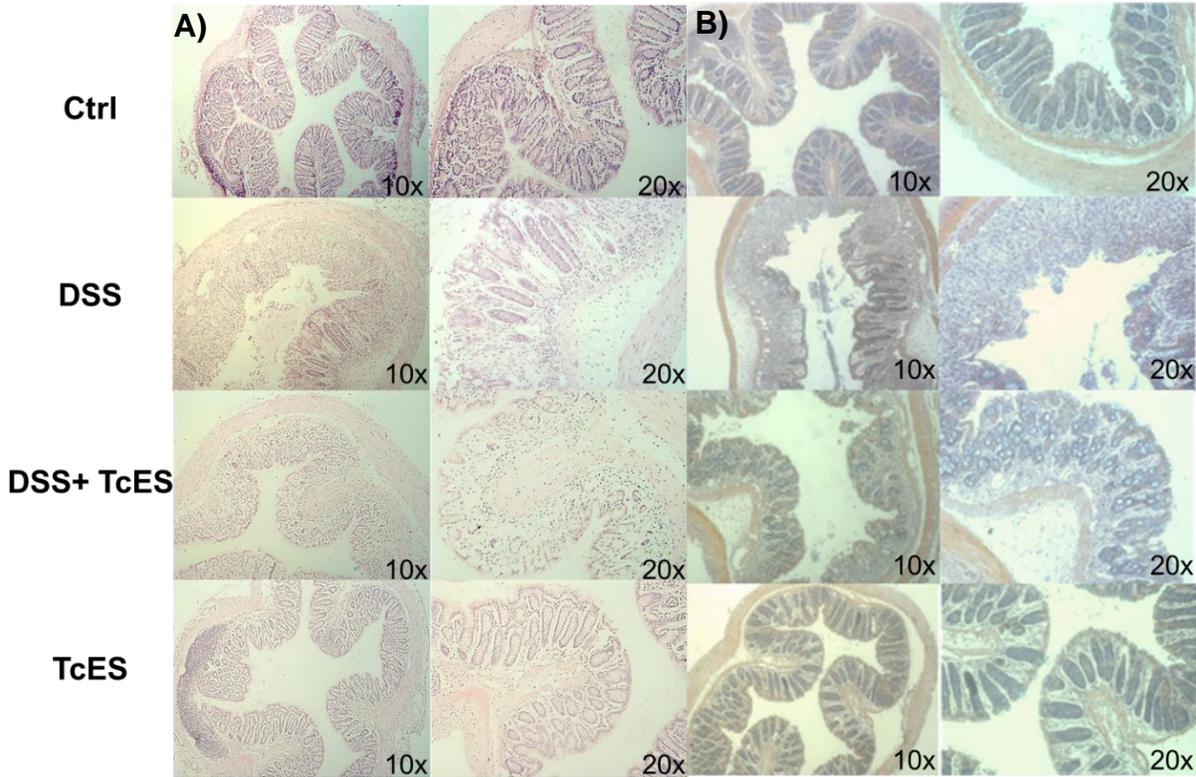


Figura 10.- Efecto del TcEs en la colitis inducida por DSS. A) Secciones histológicas de colon se prepararon y tiñieron con H-E (aumento de 10x y 20x). La histología muestra mayor daño en el grupo de ratones con DSS con una alta densidad de infiltrado inflamatorio, pérdida de barrera epitelial y de la estructura intestinal. Grupo tratado con DSS+TcES conserva estructura e integridad de barrera epitelial, así como una disminución en el infiltrado inflamatorio. B) La tinción de Alcian Blue (aumento 10x y 20x) muestra pérdida de células caliciformes en el grupo tratado con DSS. El tratamiento con TcES muestra integridad y permanencia de las células en el tejido.

8.4. Estrategia de análisis de citometría de flujo.

Para evaluar las distintas poblaciones celulares se siguió la siguiente estrategia de análisis: descartamos dobles eventos celulares escogiendo singuletes para seleccionar la población de linfocitos, a partir de los cuales se ubicaron las poblaciones de células T CD4+ y CD8+. De la población de linfocitos T CD4+ se analizaron las células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ así como las moléculas supresoras que pudieran estar expresando en su superficie. De igual forma a partir de células T CD4+ se evaluaron las células T reguladoras naturales (CD4+FOXP3+) y a su vez las T reguladoras activadas con CD25. Por último se realizó análisis para linfocitos T CD8+ y las moléculas supresoras que pudieran estar expresando (Figura 11).

Esta estrategia se utilizó para ensayos posteriores.

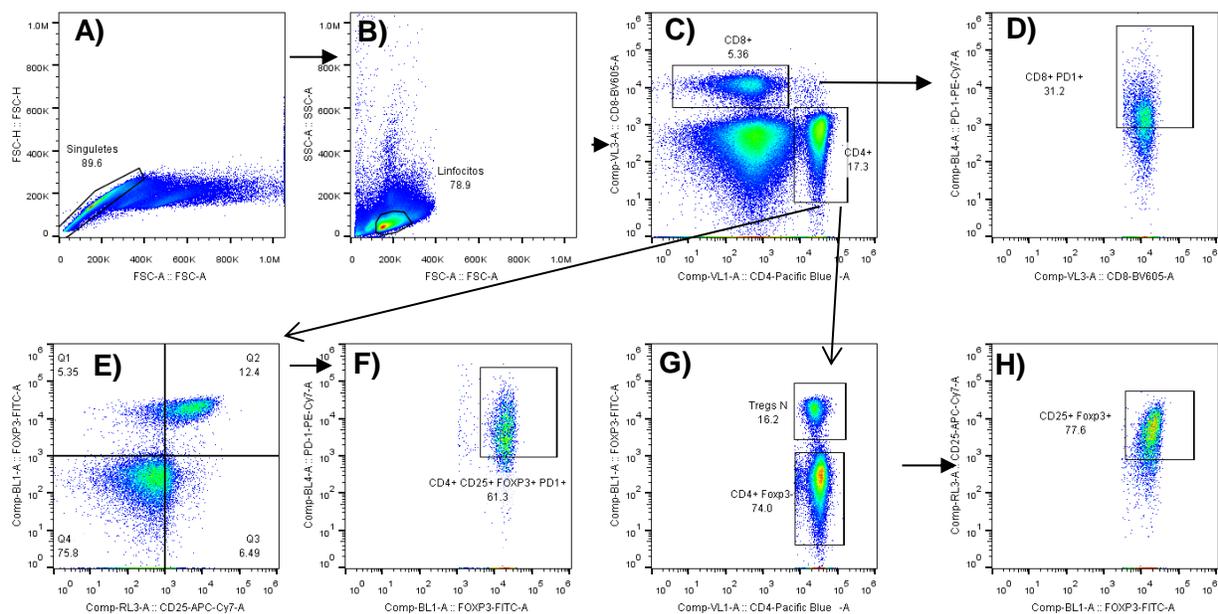


Figura 11.- Estrategia de análisis para los linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos Treg activados. A) Partiendo de una gráfica de singuletes (FSC-A vs FSC-H) se excluyeron aquellos eventos dobles. B) Usando SSC-A y FSC-A se realizó la región de linfocitos. C) Se seleccionaron linfocitos T CD4+ y CD8+. D) A partir de los linfocitos T CD8+ se analizaron las moléculas supresoras E) A partir de linfocitos T CD4+ se analizó la población de Treg CD25+ Fopx3+ y F) posteriormente se analizó la expresión de las moléculas supresoras CD103, PD-1 y Tim-3. G) Población de Treg naturales H) y linfocitos efectores.

8.5. Citometría de linfocitos de circulación.

En circulación se determinaron los linfocitos T CD4+, CD8+ y Treg al término de la inducción de colitis, encontrando que la administración de los TcES durante el desarrollo de la colitis, reduce de manera significativa el porcentaje de linfocitos T CD8+ ($X=3.49\%$) en comparación con el grupo DSS ($X=6.58\%$), en cuanto a los linfocitos T CD4+ (figura 12A) y Treg no encontramos diferencias significativas en ninguno de los grupos (figura 12E), solo tendencia a disminuir la población de Treg naturales en el grupo DSS+TcES ($X=0.96\%$) al comparar con DSS ($X=2.38\%$) (Figura 12G).

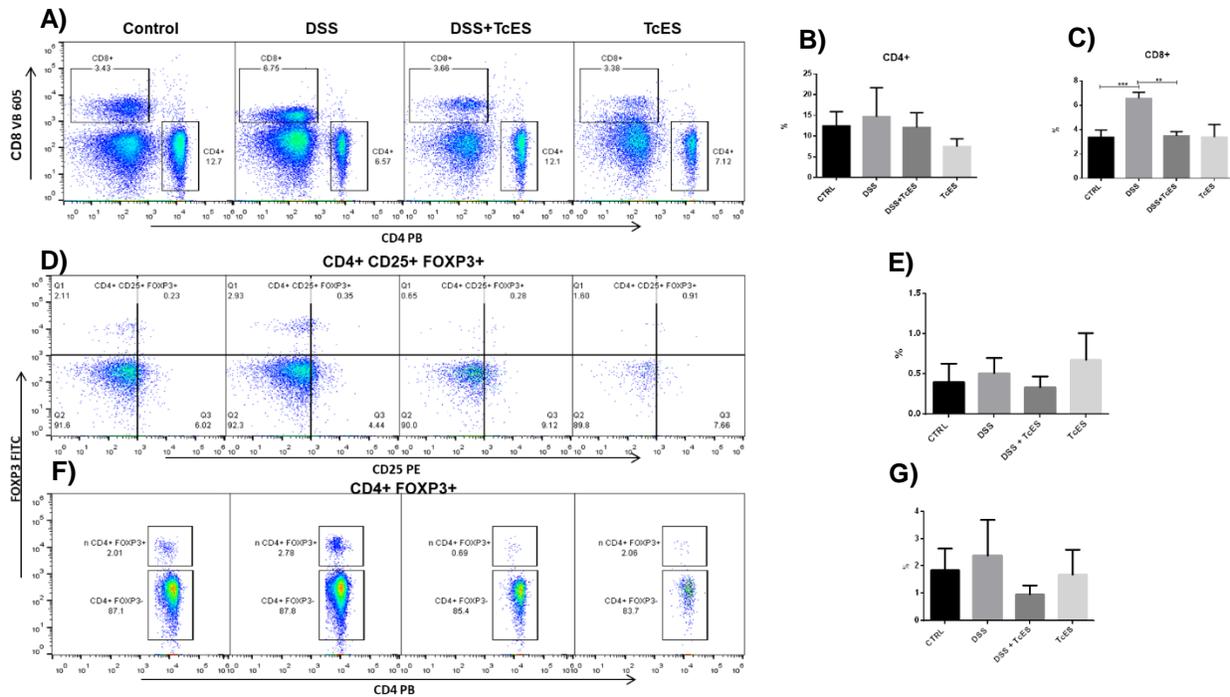


Figura 12.- Evaluación de las poblaciones de linfocitos T CD4+, T CD8+ y Tregs en circulación. De circulación se analizaron los porcentajes de linfocitos T CD4+, T CD8+, Tregs y nTregs de los grupos control, DSS, DSS+TcES y TcES por citometría de flujo. Las gráficas de puntos muestran la estrategia de análisis y en las gráficas de barras se describen los porcentajes de cada población celular. Los valores se consideraron estadísticamente significativos con una $p < 0.05$.

8.6. Análisis del reclutamiento de linfocitos T CD4+, CD8+ y Treg en cavidad peritoneal.

Posteriormente se evaluaron las distintas poblaciones celulares en la cavidad peritoneal. El grupo de ratones con TcES muestran un incremento significativo de linfocitos T CD4+ ($X=5.58\%$) y CD8+ ($X=1.53\%$) comparado con el grupo tratado con DSS ($X=2.45\%$ y $X=0.78\%$ respectivamente) en las gráficas de puntos. Al evaluar los números absolutos de ambas poblaciones celulares se encontró que el antígeno (TcES) por si solo induce el aumento de linfocitos T CD4+ y CD8+ como se muestra en la figura 13. El TcES aumenta el porcentaje de Treg pero no es significativo. Sin embargo, al calcular el número absoluto de esta población celular incrementó significativamente con el tratamiento de TcES comparado con el grupo control; resultados similares fueron determinados en la población de las nTregs (Figura 14). Estos resultados indican que el TcEs induce un incremento de células reguladoras en el colon inflamado por DSS. Los linfocitos son células del sistema inmune adaptativo que modulan la respuesta inflamatoria a través de diversas moléculas de superficie. En este sentido, al evaluar la expresión de CD103 y PD-1 determinamos que la presencia de TcEs en los grupos de

estudio, se incrementa el porcentaje células Tregs positivas a ambas moléculas. Los niveles de expresión de PD-1 no se ven afecta por el antígeno TcES; sin embargo, células Tregs incrementan significativamente los niveles de las moléculas de CD103 en presencia del antígeno, así como el número absoluto de estas células (Figura 15B y 15C). El grupo de ratones con TcES incrementan los porcentajes de Tim3+ en linfocitos TCD8+ (Figura 16), así como sus números absolutos en los ratones con DSS+TcES en relación con el grupo de DSS, al igual que los linfocitos T CD8+ CD103+. Las células Tregs derivadas de ratones con el tratamiento de TcEs no presentan cambios en la expresión de las moléculas PD-1 y Tim3+ en porcentajes con respecto a los demás grupos estudiados como se muestra en la figura 15B. Sin embargo, el número absoluto de células Tregs se encuentra aumentado (figura 15C).

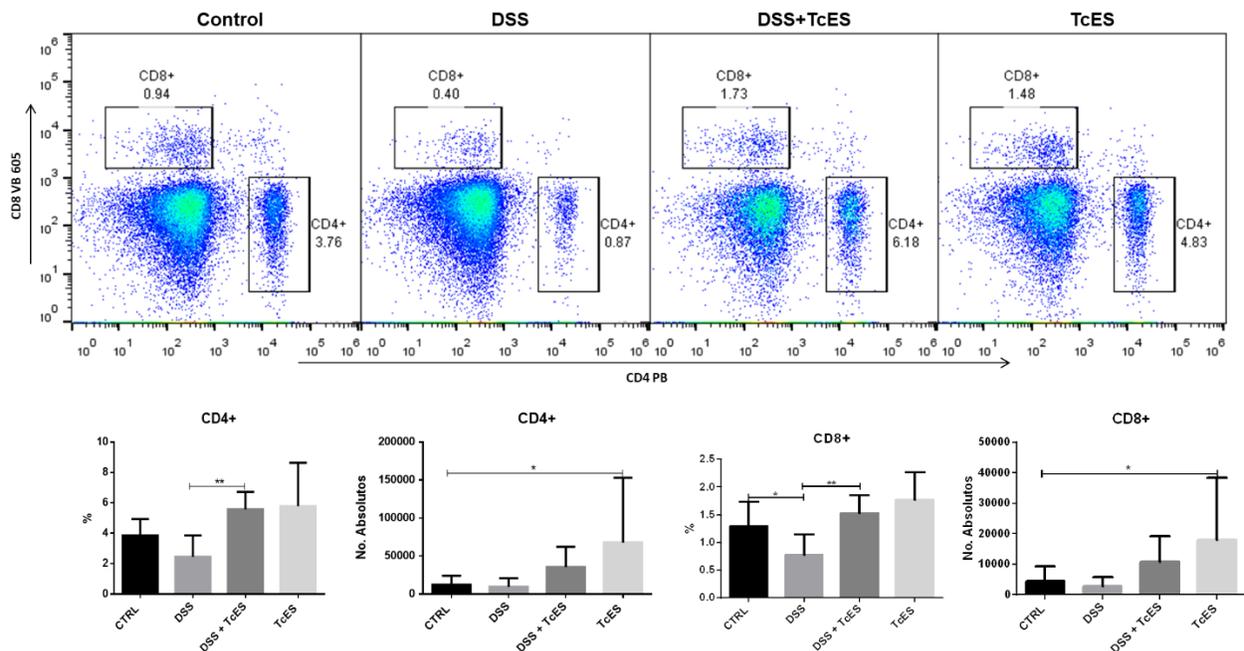


Figura 13.- Linfocitos T CD4+ y CD8+ de peritoneo. Se analizaron los porcentajes y número absoluto de linfocitos T CD4+ y T CD8+ de los grupos control, DSS, DSS+TcES y TcES por citometría de flujo. Las gráficas de puntos muestran el porcentaje de las poblaciones celulares y las gráficas de barras los números absolutos de linfocitos T CD4+ y T CD8+. Los valores se consideraron estadísticamente significativos con una $p < 0.05$.

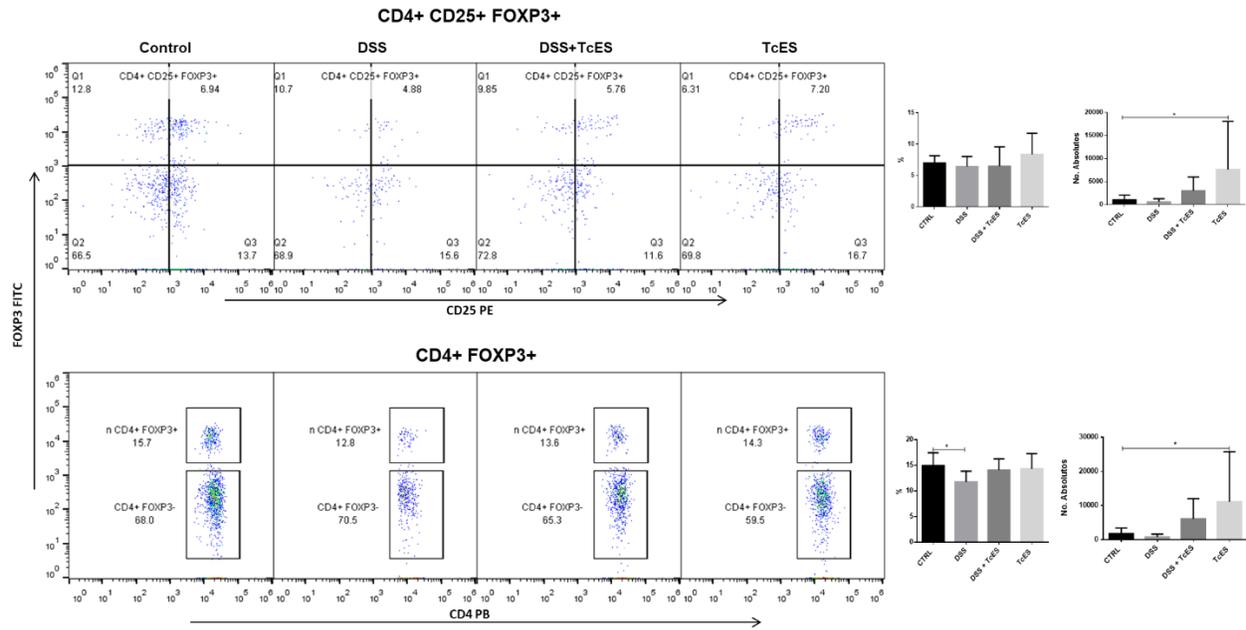


Figura 14.- Tendencia de población de linfocitos T reguladores a aumentar en presencia de TcES en cavidad peritoneal. Sin diferencias significativas en porcentajes. En números absolutos se observan diferencias significativas en presencia de TcES, es decir, el antígeno está induciendo esta población celular. Se observa lo mismo respecto al TcES en las Tregs naturales.

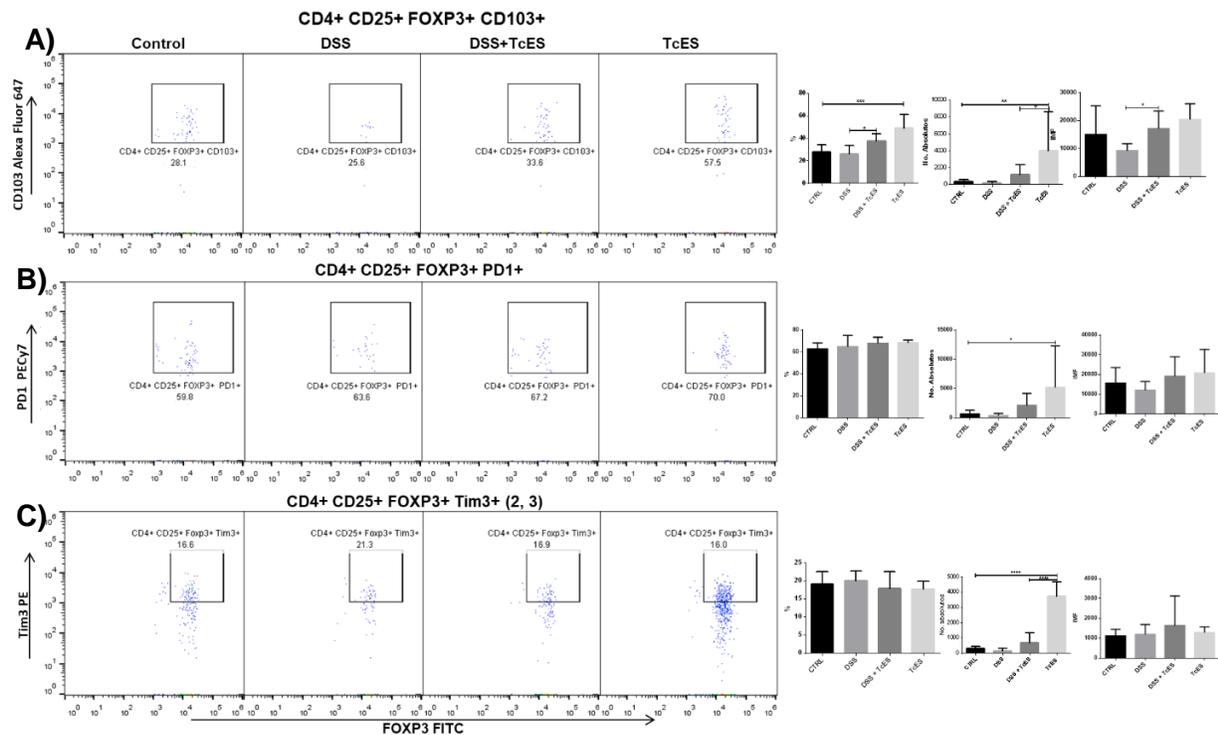


Figura 15.- T reguladoras CD103+, PD-1+ y Tim3+ de peritoneo. A) Se muestra diferencia significativa en el aumento de Tregs expresando la molécula CD103 en los

grupos tratados con TcES, es decir, son células T reguladoras altamente supresoras. Mismo efecto en la IMF de CD103, aumentando en presencia del antígeno. Los números absolutos demuestran que hay un aumento significativo de Tregs expresando CD103 que están siendo inducidas por el TcES. B) Los porcentajes de la expresión de Tregs expresando PD-1 no presentan cambios significativos, pero en número absoluto sí al haber un aumento de esta población celular PD-1 positiva inducidas por TcES. La IMF no se ve alterada más que por una ligera tendencia a aumentar en presencia de los TcES. C) En la expresión de Tim3 no se observan cambios en los porcentajes de Tregs, ni en su IMF, pero sí hay aumento significativo en el grupo TcES, indicando que los antígenos por sí solos inducen Tregs Tim3+.

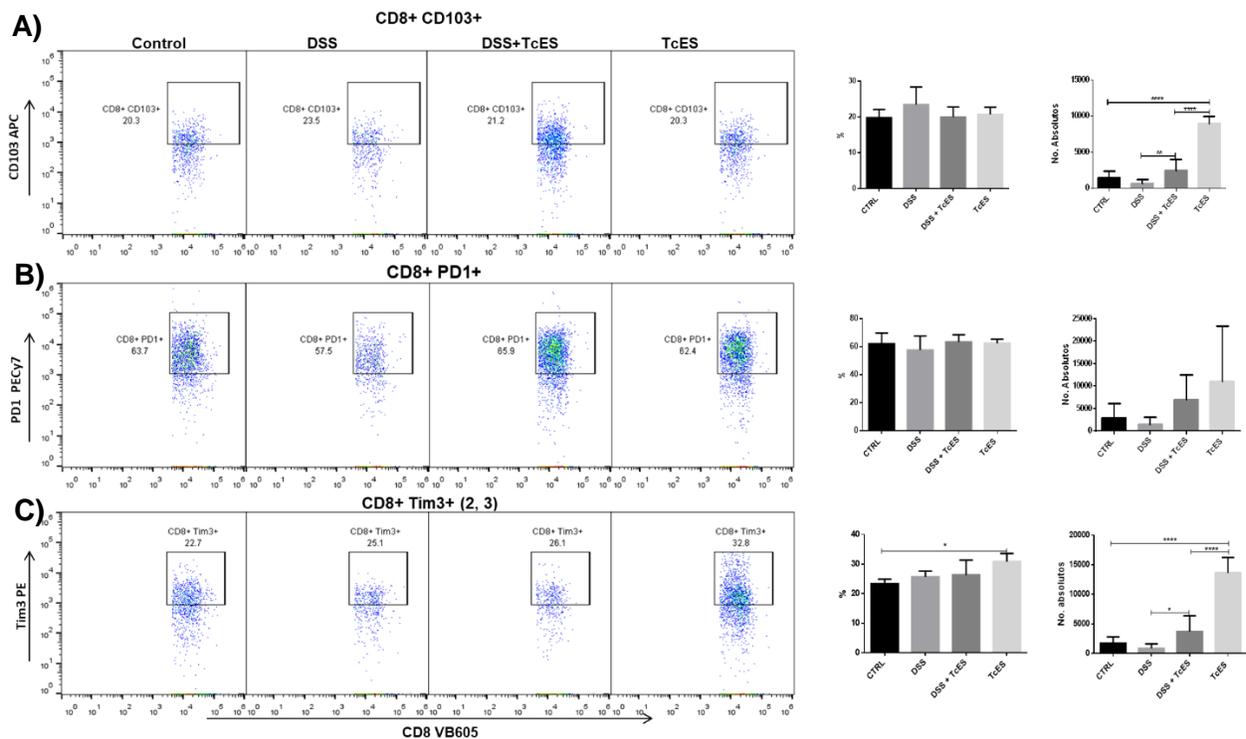


Figura 16.- Linfocitos T CD8+ CD103+, PD-1+ y Tim3+ de peritoneo. A) Los porcentajes de CD103 no presentan diferencias significativas, siendo que en números absolutos hay un aumento significativo en presencia de TcES, diciendo que por sí mismos como en presencia de un proceso inflamatorio, se inducen CD8+ CD103+. B) No hay cambios de la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8 tanto en porcentajes como en números absolutos. C) Porcentajes de CD8+ Tim3+ presentan tendencia a aumentos en esta población en el grupo de TcES, mientras que en los números absolutos sí hay diferencia entre los grupos DSS y DSS+TcES, donde se aumenta la población en presencia de los antígenos.

8.7. Determinación de linfocitos T CD4+, CD8+ y Tregs en bazo.

Posteriormente a la evaluación en células de peritoneo, donde se observó la inducción de células T reguladoras supresoras, se decidió evaluar a nivel sistémico en otros órganos primordiales para el sistema inmunitario las mismas poblaciones celulares, así como la expresión de moléculas supresoras.

En la figura 17 se observa que, tanto en los porcentajes como en los números absolutos de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ de bazo no hay diferencias significativas, sin embargo se observa que para ambas poblaciones de linfocitos T hay tendencia a disminuir en presencia de TcES.

Después se evaluó la población de T reguladoras y T reguladoras naturales en esplenocitos, donde no hubo cambios en porcentajes ni en números absolutos, sólo una ligera tendencia a que estas poblaciones celulares aumenten en presencia de TcES (Figura 18).

Posteriormente se evaluó la expresión de las moléculas supresoras PD-1 y Tim3 en las Tregs. Se encontró que para PD-1 en porcentajes no hay diferencias significativas ni cambios entre los cuatro grupos y en números absolutos solo tendencia a aumentar en presencia del antígeno. El porcentaje de su IMF no presentó ningún cambio (Figura 19).

Los porcentajes de Tim3 no presentan diferencias significativas, sin embargo los números absolutos muestran un aumento significativo en el grupo tratado con TcES, indicando que las pocas Tregs que pudieran estar siendo inducidas tienen un perfil supresor. Los porcentajes de IMF reflejan que hay tendencia a disminuir en presencia de TcES (Figura 19).

La expresión de PD-1 en linfocitos T CD8+ no refleja ningún cambio tanto en porcentajes como en números absolutos (Figura 20A). Sucede lo mismo con la expresión de Tim3, no se observan cambios significativos en porcentajes ni en números absolutos, sin embargo estos últimos reflejan tendencia a aumentar la expresión de Tim3 en presencia de TcES (Figura 20B).

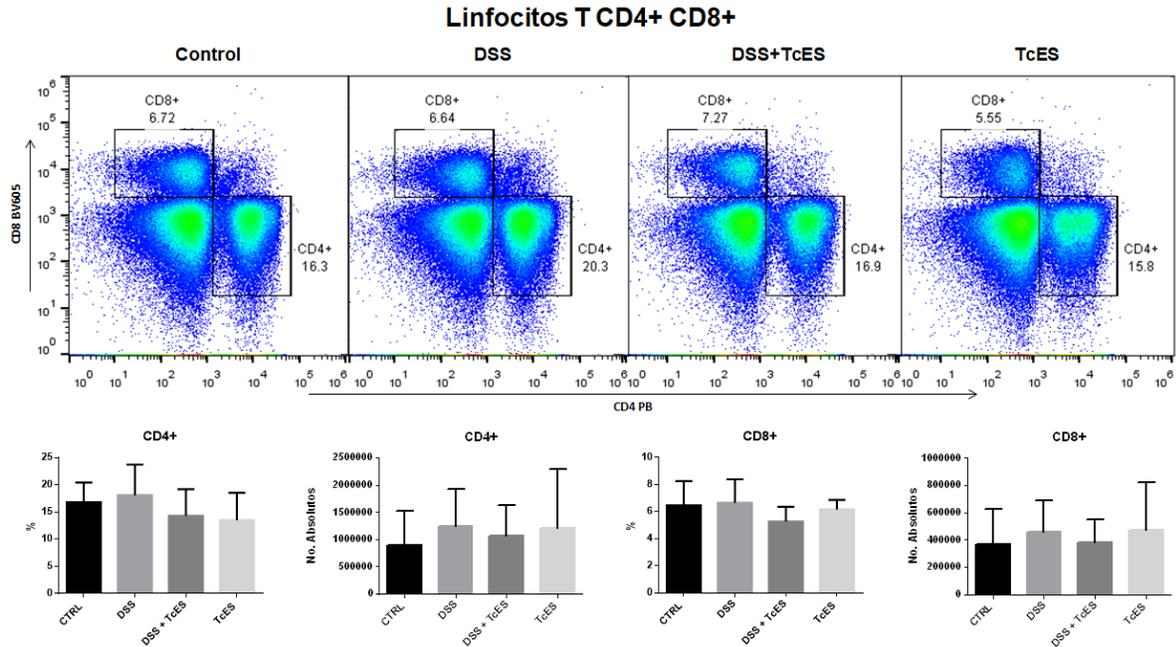


Figura 17.- Linfocitos T CD4+ y CD8+ de bazo. Tanto en porcentajes como en números absolutos de ambas poblaciones de linfocitos T no hay diferencias significativas, sin embargo se observa que hay tendencia a disminuir en presencia de TcES.

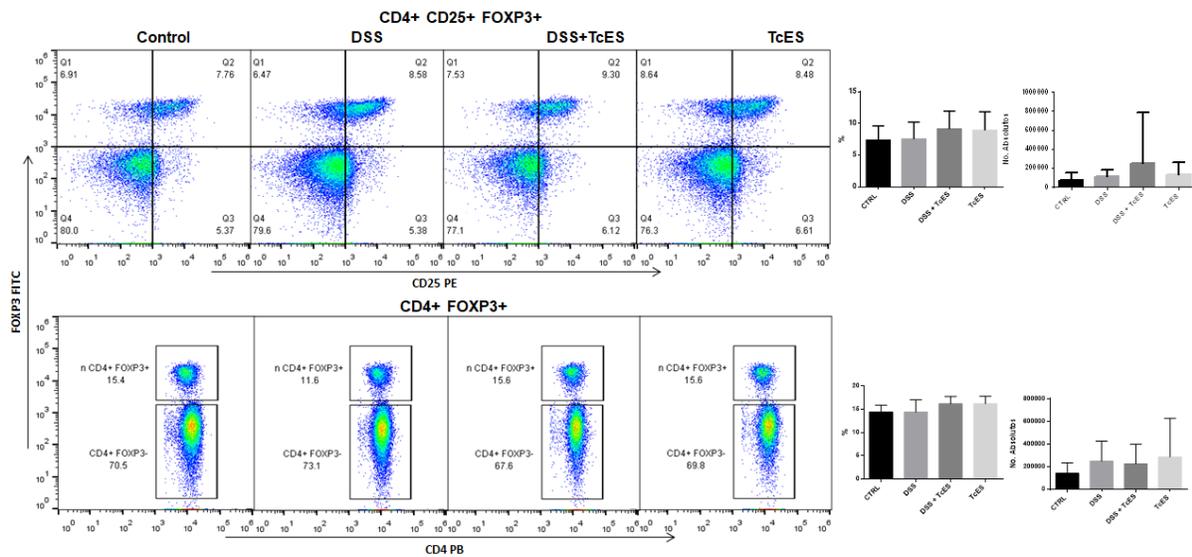


Figura 18.- Linfocitos T reguladores y T reguladores naturales de bazo. No se presentan cambios en porcentajes ni en números absolutos, sólo una ligera tendencia a que estas poblaciones celulares aumenten en presencia de TcES.

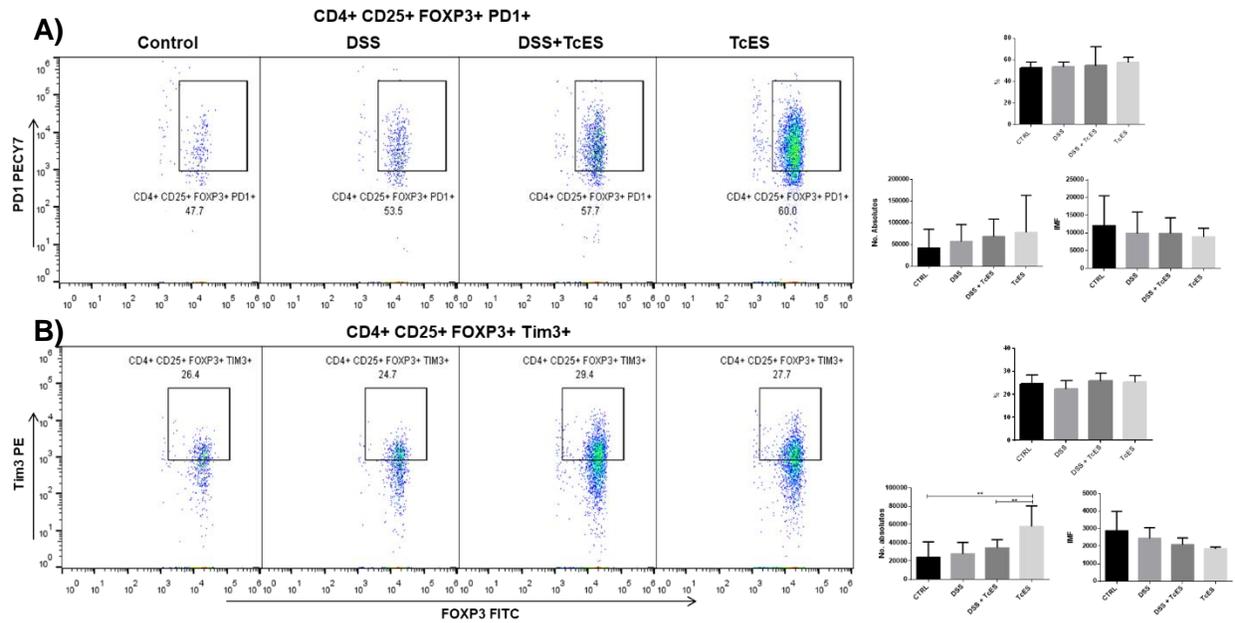


Figura 19.- PD-1 y Tim-3 en linfocitos T reguladores de bazo. A) Los porcentajes de PD-1 en no muestran diferencias significativas ni cambios entre los cuatro grupos, los números absolutos solo reflejan tendencia a aumentar en presencia del antígeno. El porcentaje de su IMF no presentó ningún cambio. B) No se presentan diferencias significativas en porcentajes de Tim3, sin embargo en los números absolutos hay aumento significativo en el grupo tratado con TcES. Los porcentajes de IMF reflejan que hay tendencia a disminuir en presencia de TcES.

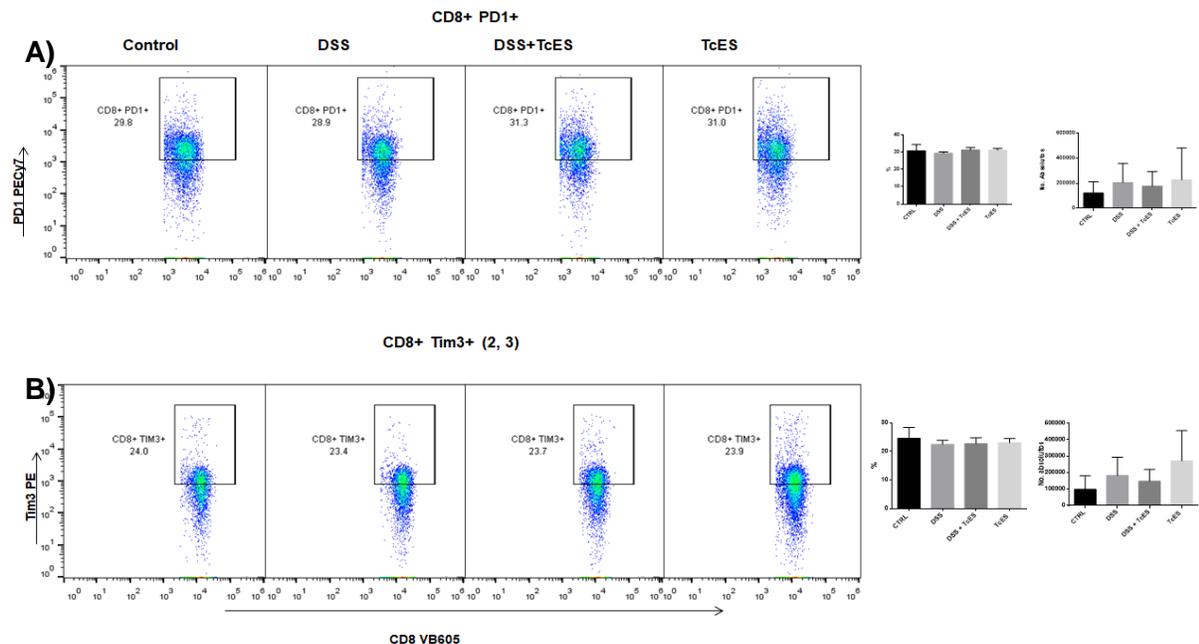


Figura 20.- Expresión de PD-1 y Tim-3 en linfocitos T CD8 de bazo. A) Expresión de PD-1 en linfocitos T CD8+ no refleja ningún cambio en porcentajes ni en números

absolutos. B) En la expresión de Tim-3 no se observan cambios significativos en porcentajes ni en números absolutos, sin embargo estos últimos reflejan tendencia a aumentar la expresión de Tim3 en presencia de TcES.

8.8. Linfocitos T CD4+, CD8+ y Tregs de ganglios linfáticos mesentéricos.

De igual forma se decidió evaluar el efecto de los antígenos excretados/secretados de *T. crassiceps* en los nódulos linfáticos mesentéricos, región con importancia ya que es el medio de comunicación entre los diferentes antígenos que pudieran entrar en el organismo y órganos relacionados al sistema inmune.

En la figura 21 podemos observar que el porcentaje de los linfocitos T CD4+ y CD8+ no presenta cambios significativos, salvo la tendencia a que las células T CD4+ aumentan en presencia de antígeno y se mantienen en los linfocitos T CD8+. Los números absolutos presentan resultados similares.

Se analizó la población de células T reguladoras, en las cuales no hay cambios significativos en porcentajes o números absolutos, sólo la tendencia a aumentar en presencia de TcES. Así mismo se analizó la porción de T reguladoras naturales, donde se observa el mismo efecto de los TcES sobre esta población celular (Figura 22).

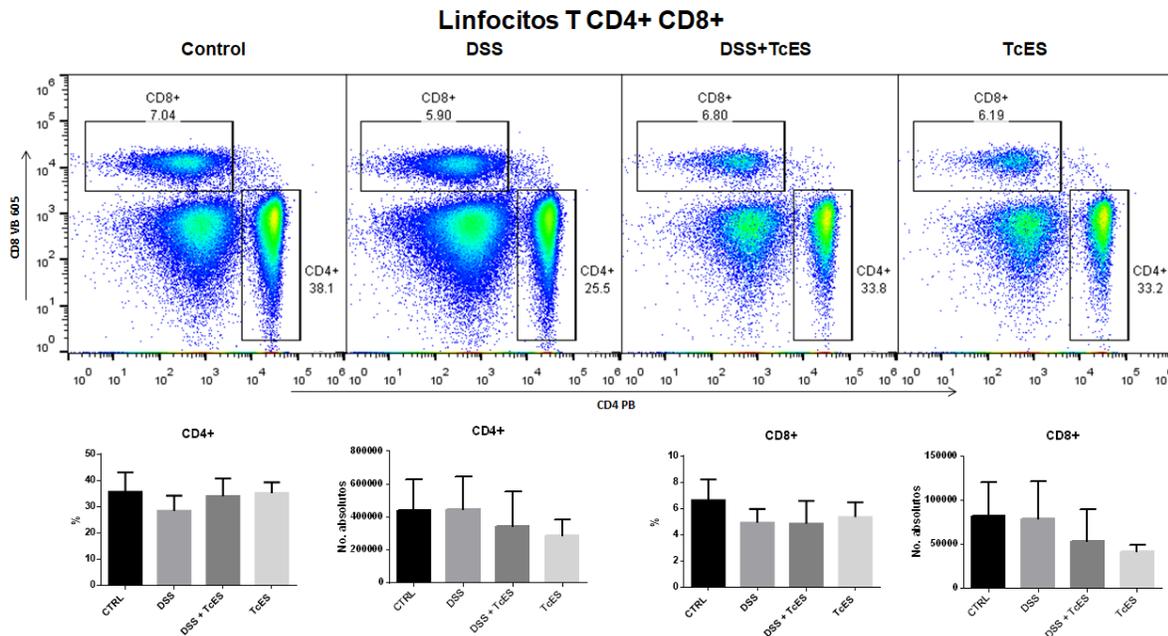


Figura 21.- Linfocitos T CD4+ y CD8+ de ganglios linfáticos mesentéricos. Los linfocitos T CD4+ no presentan cambios significativos, salvo la tendencia a que aumentan en presencia de antígeno. El porcentaje se mantiene en los linfocitos T CD8+. Los números absolutos presentan resultados similares.

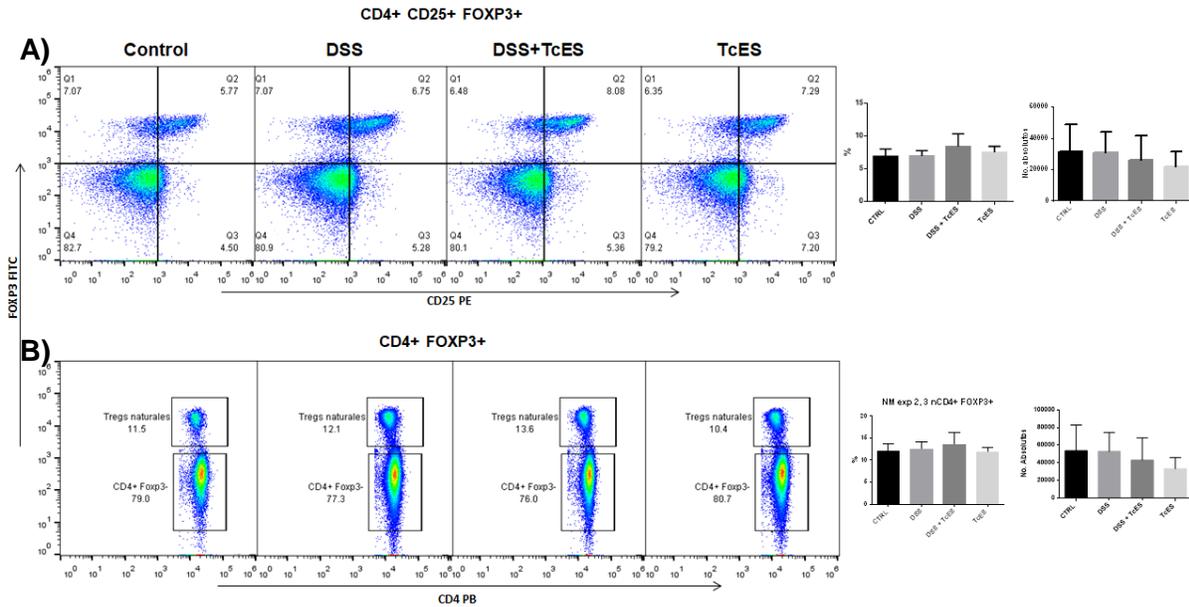


Figura 22.- Linfocitos T reguladores y T reguladores naturales de ganglios linfáticos mesentéricos. A) Se analizó la población de células T reguladoras, en las cuales no se observan cambios significativos en porcentajes o números absolutos, sólo la tendencia a aumentar en presencia de TcES. B) En la población de células T reguladoras naturales, donde se observa el mismo efecto de los TcES sobre esta población celular, sin cambios en porcentajes y números absolutos.

8.9. Células de lámina propia.

Para finalizar, se evaluaron las células obtenidas de lámina propia intestinal, sitio en el que se desarrolló el proceso inflamatorio de colitis ulcerativa experimental.

La población de linfocitos T CD4+ no presenta diferencias significativas, sin embargo existe tendencia a que en presencia de TcES, estas células disminuyen y tanto en porcentajes como en números absolutos. Para los linfocitos T CD8+ tampoco hay cambios significativos, sin embargo hay tendencia a que estas células aumentan en el proceso inflamatorio, incluso en presencia de TcES (Figura 23).

Al analizar las células T reguladoras se observó que a pesar de que no hay diferencias significativas en porcentajes o en números absolutos, hay tendencia a disminuir esta población en ratones tratados con TcES. Sucede lo mismo con las T reguladoras naturales, tanto en porcentajes como en números absolutos (Figura 24).

Se evaluó la expresión de moléculas supresoras en las pocas células inducidas y se observó que hay una disminución de Tregs CD103+ (Figura 25A) en presencia de TcES en porcentajes y en número absolutos, así como su intensidad media de fluorescencia, sin diferencias significativas. Para PD-1 los valores del porcentaje se conservan similares, mientras que en números absolutos hay una tendencia a disminuir esta

población celular en presencia de TcES, pero sin ninguna diferencia significativa, sin embargo, se encuentran diferencias significativas comparados con el control, presentando disminución de la población en ratones tratados con DSS y TcES (Figura 25B). Los resultados obtenidos de la expresión de Tim3 en las T reguladoras no presentan diferencias significativas en porcentajes ni en números absolutos, solo tendencia a disminuir en presencia de TcES (Figura 25C).

En la figura 26 se muestran las poblaciones de linfocitos T CD8+ donde no se encuentran diferencias significativas en porcentajes o número absolutos. Para CD103+, PD-1 y Tim3 pero si se presenta una tendencia a disminuir en presencia de TcES.

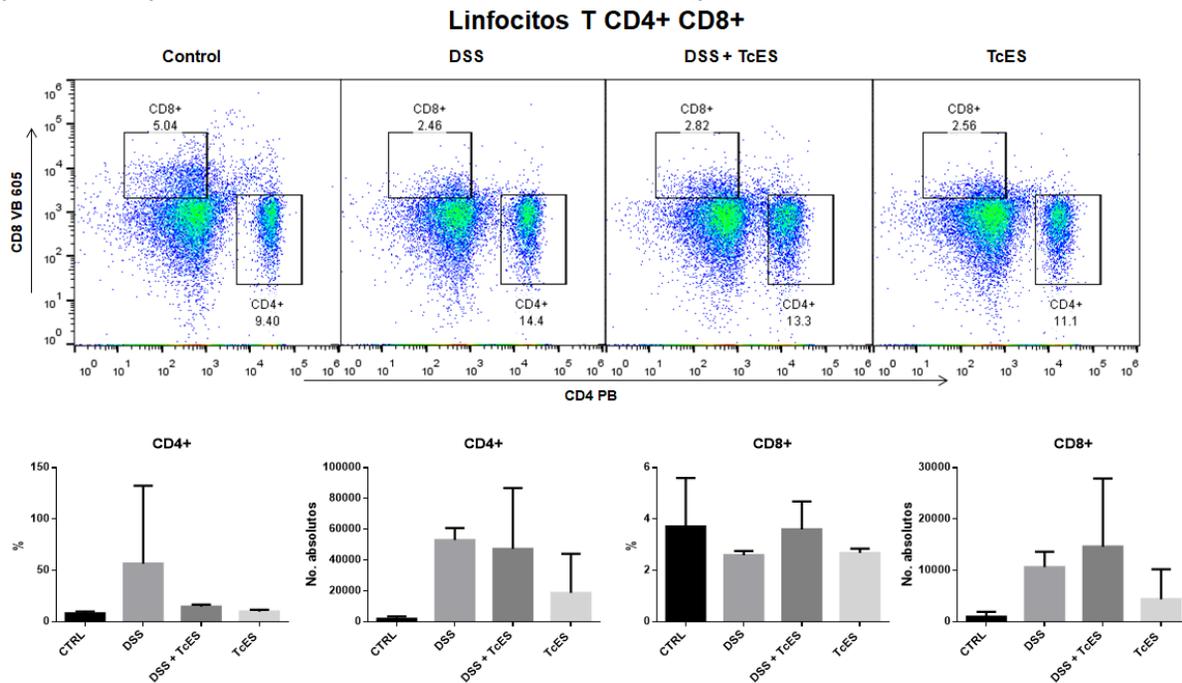


Figura 23.- Linfocitos T CD4+ y CD8+ de lámina propia. La población celular CD4+ sin diferencias significativas, sin embargo existe tendencia a que en presencia de TcES, estas células disminuyen y tanto en porcentajes como en números absolutos. Los linfocitos T CD8+ tampoco muestran cambios significativos, sin embargo hay tendencia a que estas células aumentan en el proceso inflamatorio, incluso en presencia de TcES.

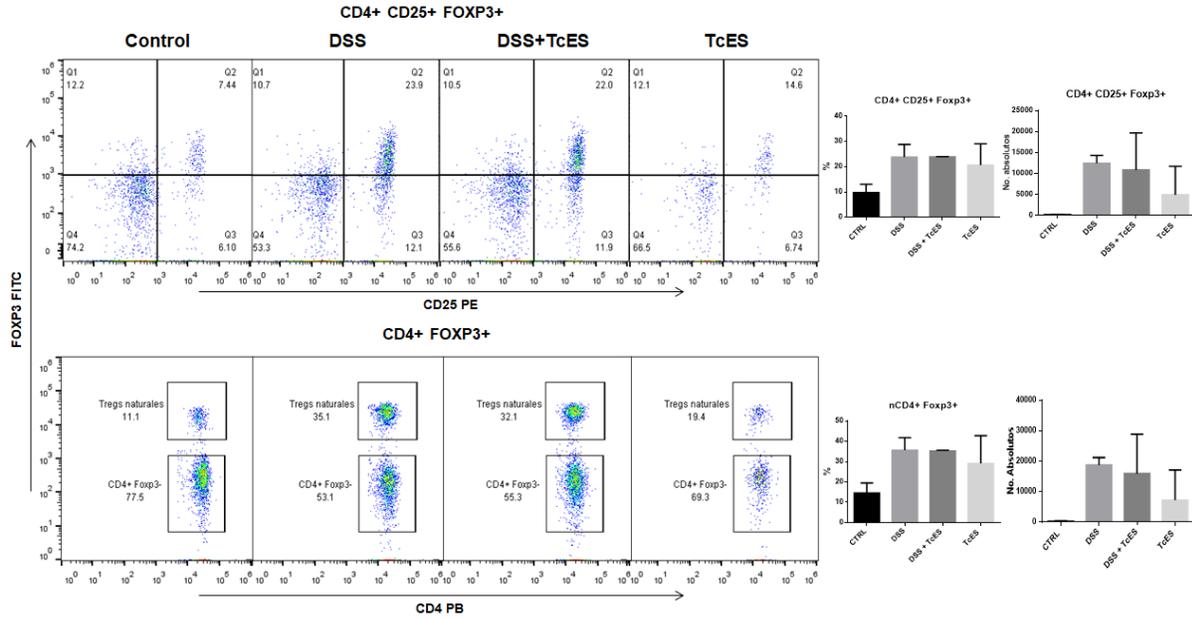


Figura 24.- Linfocitos T reguladores y T reguladores naturales de lámina propia. Sin diferencias significativas en porcentajes o en números absolutos pero se observa tendencia a disminuir esta población en ratones tratados con TcES. Sucede lo mismo con las T reguladoras naturales, tanto en porcentajes como en números absolutos.

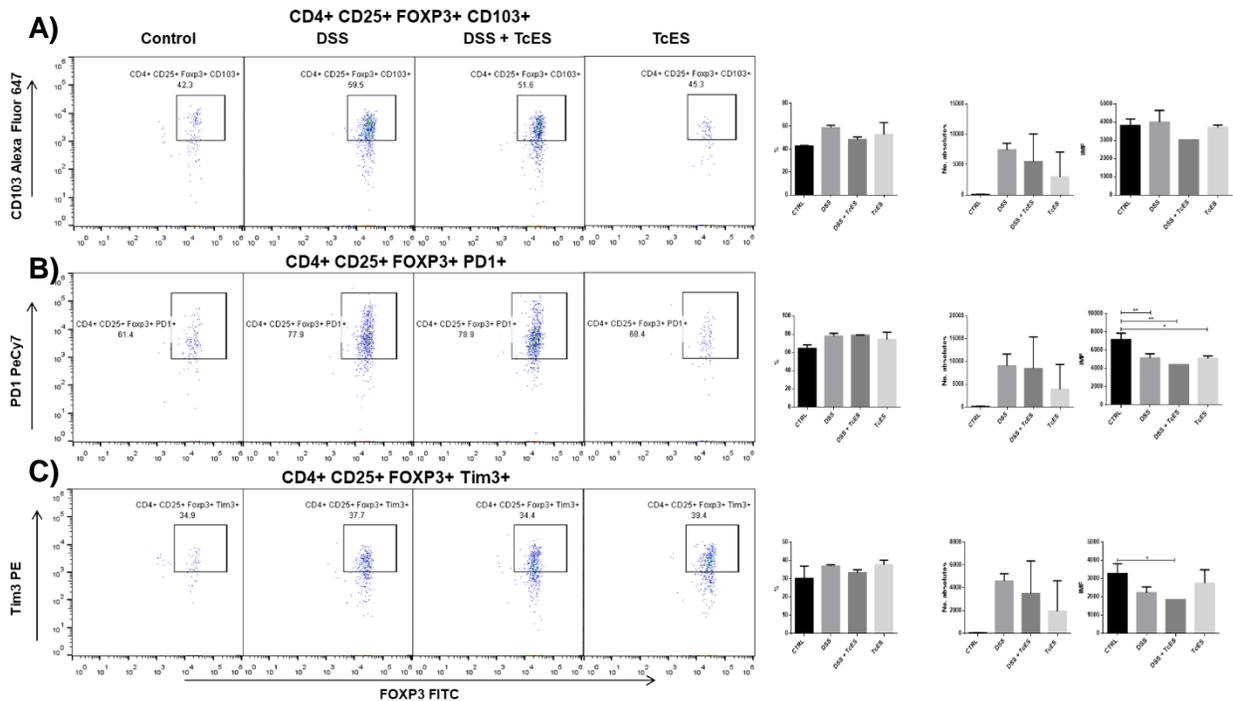


Figura 25.- Moléculas supresoras de linfocitos T reguladores de lámina propia. A) en las pocas células inducidas y se observó que hay una disminución de Tregs CD103+ en presencia de TcES en porcentajes y en número absolutos, así como su intensidad

media de fluorescencia, sin diferencias significativas. B) Para PD-1 los valores del porcentaje se conservan similares, mientras que en números absolutos hay una tendencia a disminuir esta población celular en presencia de TcES, pero sin ninguna diferencia significativa, sin embargo, se encuentran diferencias significativas comparadas con el control, presentando disminución de la población en ratones tratados con DSS y TcES. C) Los resultados obtenidos de la expresión de Tim3 en las T reguladoras no presentan diferencias significativas en porcentajes ni en números absolutos, solo tendencia a disminuir en presencia de TcES.

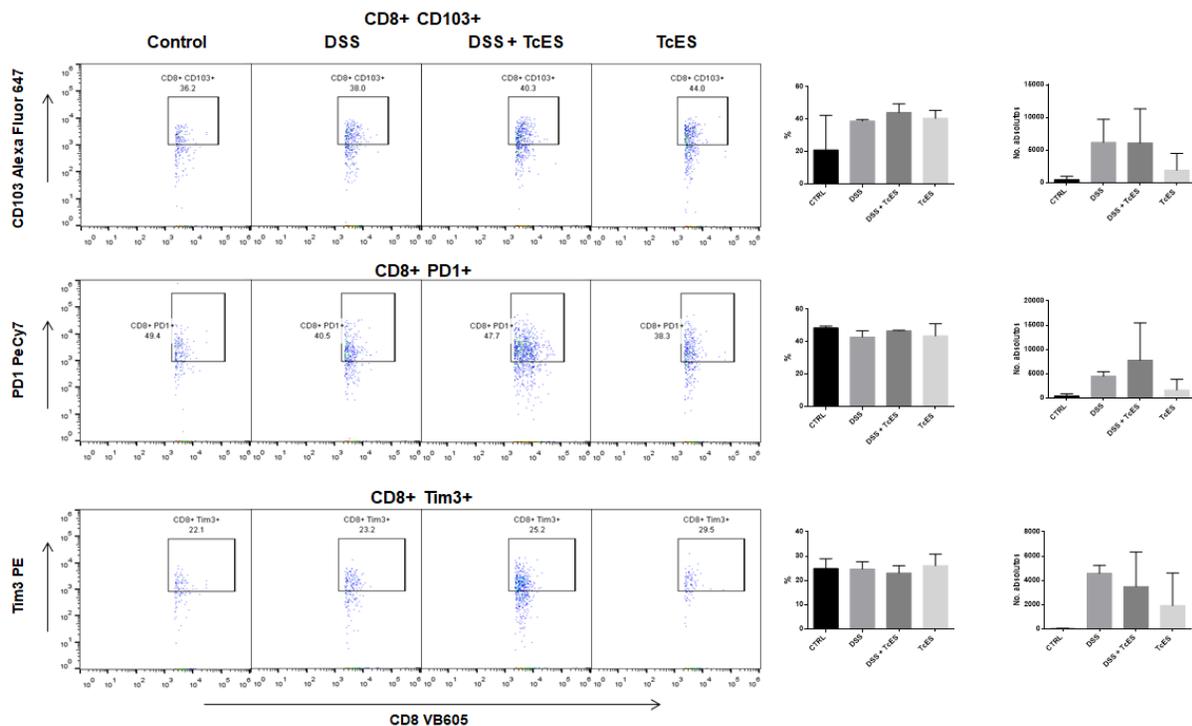


Figura 26.- Linfocitos T CD8+, CD103+, PD-1+ y Tim-3+ de lámina propia. Sin diferencias significativas en porcentajes o número absolutos. Para CD103+, PD-1 y Tim3 no hay diferencias significativas pero si se presenta una tendencia a disminuir en presencia de TcES.

8.10. Expresión de los genes GAPDH, MUC2 y TGFβ en intestino.

Se realizó una PCR (Figura 27) para evaluar la expresión del gen constitutivo GAPDH y los genes MUC2 asociado a las células productoras de mucosa en intestino y TGFβ, gen relacionado con las células T reguladoras.

Se encontró que el grupo de DSS tratado con TcES expresan con mayor intensidad Muc2, lo que indica una mayor protección en el intestino debido a la presencia de células caliciformes productoras de mucina, a su vez los TcES inducen por sí solos la expresión

de este gen indicando que proporcionan protección para el intestino; mientras que en el grupo con DSS hay una pérdida de expresión del gen.

A continuación se evaluó la expresión del gen TGF β , encontrando que en los grupos tratados con TcES hay expresión del gen, sin embargo por sí solos, los antígenos inducen en mayor intensidad la expresión del gen comparando con el grupo de DSS+TcES. El grupo de DSS no expresa el gen.

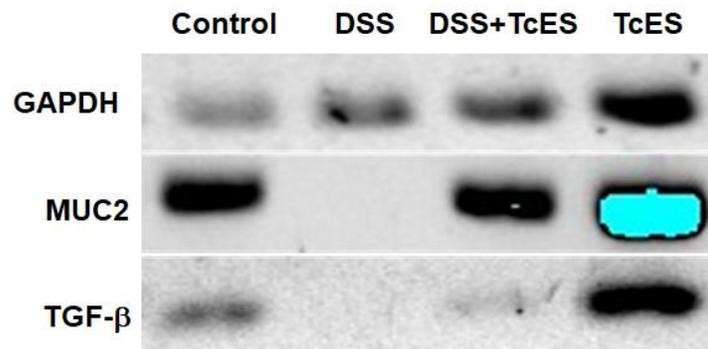


Figura 27. PCR punto final de intestino. Grupos Control, DSS, DSS+TcES y TcES. Expresión de los genes MUC2 y TGF-b en grupos tratados con antígenos excretados/secretados de *Taenia crassiceps*.

9. Discusión.

La colitis ulcerativa es una EII que es frecuente en países industrializados y ha ido incrementando con el paso de los años (Kaplan, 2017). El tratamiento por elección para la colitis es el empleo de corticoesteroides, los cuales tienen efectos secundarios y por tal motivo se han buscado nuevas opciones terapéuticas, empleando modelos biológicos como el uso de parásitos helmintos y sus productos.

Existe evidencia que demuestra la participación de los helmintos modulando el desarrollo de la colitis.

Se ha reportado que la infección con *T. crassiceps* modula el desarrollo de la colitis experimental (Ledesma-Soto *et al.* 2015) y se ha demostrado que la deficiencia en linfocitos Treg favorece el ser propenso a desarrollar EII (Díaz *et al.* 2015).

Por otro lado, Adalid-Peralta en 2013 reporta que la neurocisticercosis por *Taenia solium* promueve la diferenciación de linfocitos Treg y al co-cultivar células dendríticas con el metacestodo de *T. crassiceps* encuentran que favorece la diferenciación de linfocitos T periféricos de a linfocitos Treg.

Es conocido que ambos parásitos tienen en común múltiples antígenos (Sciutto E *et al.* 1990).

Se ha demostrado que los antígenos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* evitan la maduración de células dendríticas, generan células mieloides supresoras, disminuyen fosforilación de STAT-1 en macrófagos activados por IFN- γ , modulan la encefalomiелitis experimental y la diabetes tipo 1.

Por tal motivo nuestro trabajo se centró en demostrar si los productos derivados de *T. crassiceps* pueden disminuir el desarrollo de la colitis y si estos pueden tener efecto en el reclutamiento y activación de células Treg.

Nosotros demostramos en este trabajo que los TcES son capaces de reducir el desarrollo de la colitis experimental disminuyendo la pérdida de peso, el IAE, la longitud del colon y la histopatología, como se ha reportado por Roig y colaboradores en 2018 y Wang *et al.* en 2017.

Por tal motivo, nosotros evaluamos la presencia de células Treg inducidos *in vivo* por TcES en diferentes sitios anatómicos como es el caso de células de circulación, donde observamos que hay disminución significativa de linfocitos T CD8+ en presencia del tratamiento con antígeno y los linfocitos T CD4+ solo tienden a disminuir, lo que podría indicar que existe un arresto de esta población en el sitio de la inflamación tal como lo reporta Veltkamp y colaboradores en 2011 que describen un aumento importante de apoptosis de Tregs de circulación durante desarrollo de la EII, o bien en el sitio de inoculación de los TcES,

Al evaluar las células T reguladoras en cavidad peritoneal el incremento significativo de esta población durante el modelo de colitis experimental en presencia de los productos excretados/secretados de *Taenia crassiceps*, lo que indica que los TcES podrían inducir esta población celular y a su vez inhibir la respuesta inflamatoria, ya que también provocan que los signos de colitis se vean reducidos, tal como lo presentan los colon del grupo de ratones DSS+TcES.

Sin embargo en nuestros resultados no se ven los mismos cambios en órganos periféricos del sistema inmune como bazo y ganglios linfáticos mesentéricos, caso contrario con el estudio de Grainger y colaboradores en 2010 donde observaron que tanto con el estímulo de la expresión de Foxp3 en células T Foxp3-naïve de ratones infectados con el helminto intestinal *Heligmosomoides polygyrus*, e *in vitro* con las proteínas secretadas por este parásito (HES) se induce la expresión *de novo* de Foxp3 en células de bazo sorteadas mediante fluorescencia provenientes de ratones reporteros de la proteína verde fluorescente. A su vez, identificaron que las Treg inducidas por HES suprimieron tanto la proliferación de células efectoras *in vitro* como la inflamación causada por alergia en vías respiratorias *in vivo*.

Así mismo, no hay cambios en la población de linfocitos T reguladores de lámina propia de intestino, sitio donde se desarrolló el proceso inflamatorio, lo que podría indicar que tampoco se da una migración de estas células y todo el proceso de disminución de la inflamación se origina desde cavidad peritoneal, sitio donde se inoculan los TcES. Y como lo afirma Wilson y colaboradores (2010), es poco probable que el subgrupo de células Treg Foxp3+ sea el único responsable de la regulación inmune mediada por parásitos ya que han establecido que en ratones C57BL/6 infectados con *H. polygyrus*, una población de células B reguladoras independientes de IL-10 es también generado.

Por otra parte, se ha visto que las células T reguladoras con el fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ que expresan la molécula de superficie CD103, van a ser mayormente supresoras que las que no lo expresen. Durante la infección de *Heligmosomoides polygyrus* en ratones BALB/c aumenta la frecuencia de Tregs, así como la expresión de CD103 en las mismas, en células de bazo y nódulos linfáticos (Johnston et al. 2015) y de acuerdo con Finney y colaboradores en 2007, CD103 puede no ser un mediador mecanicista de la supresión, sino más bien un requisito previo para que Treg ingresen y permanezcan en sitios de inflamación.

Por lo que nosotros sugerimos que las células T reguladoras que se están induciendo en cavidad peritoneal son mayormente supresoras ya que se observa un alto porcentaje de CD103, comparadas con células de circulación que no presentan la expresión de la molécula, ganglios linfáticos mesentéricos y en lámina propia donde se observa la tendencia a disminuir la expresión de CD103 en las Treg, a pesar de no presentar cambios significativos.

Así mismo, se evaluó la molécula PD-1 que al momento de unirse con sus ligandos PD-L1 y PD-L2, específicamente PD-L1, se activará inhibiendo la fosforilación de STAT1 y permitiendo la prevalencia del factor de transcripción Foxp3 que a su vez da paso a la presencia de estas células T reguladoras.

En el mismo estudio de Johnston y colaboradores en 2015, mediante análisis de citometría encontraron que la población de Tregs aumentaba al administrar productos secretados de *H. polygyrus*, así como la expresión media de la molécula reguladora de superficie PD-1, y al evaluar la expresión de células CD4+CD25+Foxp3+ se observa que en nuestros ratones con colitis y tratados con TcES hay incremento de esta población celular expresando PD-1 en cavidad peritoneal, sin embargo no se vio lo mismo en bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y lámina propia, confirmando la capacidad supresora de los linfocitos T reguladores inducidos en cavidad peritoneal.

Posteriormente, al evaluar las Tregs y la molécula supresora Tim-3, se vio que hay un aumento de la población en cavidad peritoneal, mientras que en bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y lámina propia no se ven los mismos cambios.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Hou y colaboradores en 2015, quienes observaron que en el modelo de infección por *Schistosoma japonicum* pero en hígado de ratones C57BL/6, hay un aumento de la expresión de Tim-3 en células CD4+, CD8+ y CD11b, sin embargo fue menor en bazo. Lo que indica que la molécula Tim-3, característica de las Treg, se encuentra involucrada en la respuesta inmune tipo Th2.

Se ha visto que la población de linfocitos T CD8+ al presentar distintas moléculas características de las Tregs, también podrían ser células encargadas de suprimir distintas respuestas inmunes, como es el caso de CD103 y PD-1.

Deng y colaboradores en 2019 propusieron un nuevo fenotipo de células iTreg CD8+ CD103+ atribuyéndoles un papel regulador importante en la inhibición de lesiones en células endoteliales glomerulares en el proceso inflamatorio crónico de lupus eritematoso sistémico, donde ya se sabía que las nTreg Foxp3+ reducían el mismo tipo de lesiones (Liu et al. 2004; Valencia et al. 2007). Nosotros reportamos que existe un aumento de linfocitos T CD4+ CD103+ y CD8+ CD103+ en células de peritoneo, lo que coincide con lo reportado por Roosenboom y colaboradores en 2019, que en pacientes con EII recién diagnosticados y sin tratamiento se observaron porcentajes disminuidos de células T CD4+ CD103+ y CD8+ CD103+, asociando la enfermedad a la baja cantidad de estos subconjuntos celulares durante la inflamación activa.

Está reportado que la inmunomodulación por helmintos está caracterizada por la inducción de una respuesta inmunitaria tipo Th2 que incluye la secreción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, así como el reclutamiento de eosinófilos y mastocitos, así como la generación de una respuesta reguladora liberando citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , así como linfocitos T y B reguladores y macrófagos alternativamente activados, previniendo patologías potencialmente protectoras (Hepworth et al. 2013)

Al evaluar los genes MUC2 y TGF- β se observa que en ratones con colitis tratados con TcES prevalece la expresión de MUC2 en células intestinales señalando que existe protección en el epitelio por parte de los TcES. Igualmente en presencia de este tratamiento permanece la expresión del gen TGF- β en células intestinales característico de células T reguladoras. En el estudio realizado por Correale y Farez en 2011, se demostró que cuando pacientes con esclerosis múltiple recibieron tratamiento antihelmíntico, su presentación clínica se deterioró y esto se asoció con una reducción

en IL-10 y TGF- β y un aumento en la secreción de IFN- γ e IL-12, ambas citocinas proinflamatorias.

Así mismo, se sabe que la expresión de CD103 está regulada positivamente por TGF- β y que los niveles superficiales de TGF- β tienden a aumentar durante la infección (Robinson et al. 2001).

Esto puede proporcionar un mecanismo por el cual CD103 se pueda regular de forma continua.

Por otra parte Jin y colaboradores (2019) han demostrado que los productos excretados/secretados de la larva muscular *Trichinella spiralis* (Ts-MLES) mejoran la gravedad de la colitis inducida por TNBS en ratones BALB/c, donde en colon y bazo aumento la cantidad de citocinas asociadas con células Treg (IL-10 y TGF- β) y en el caso del modelo de DSS en ratones C57BL/6 tratados con productos excretados/secretados de gusanos adultos de *T. spiralis* se observa mejora en la enfermedad correlacionada con el aumento de Tregs en bazo y nódulos linfáticos mesentéricos con aumento de las citocinas TGF- β e IL-10 (Yang et al. 2014).

Con los datos anteriores podemos decir que probablemente la subpoblación que se encuentra modulando la inflamación por colitis ulcerativa, son las células T reguladoras inducidas en periferia (Tr1).

Nosotros proponemos que estas células T reguladoras puede tener un perfil tipo Tr1 al estar siendo inducidas por los TcES ya que esta subpoblación se caracteriza por una alta expresión de TGF- β e IL-10, modulando un ambiente inflamatorio y sólo se encuentran en cavidad peritoneal, zona donde inoculamos los TcES, y por esta razón no las observamos en circulación ya que en este sitio no se inducen estas poblaciones celulares. Sin embargo, no aseguramos si la población de células T reguladoras son del tipo inducidas o naturales, ya sea total o parcialmente.

10. Conclusiones.

- Los antígenos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* modulan el desarrollo de colitis donde se ve una menor pérdida de peso, hay menor daño histopatológico y menor infiltrado inflamatorio.
- Los TcES generan poblaciones de células T reguladoras con mayor expresión de CD103, PD-1 y Tim3 en peritoneo, indicando una mayor capacidad supresora, modulando así el desarrollo de colitis.
- En ratones con colitis y tratados con TcES se inducen linfocitos CD8 con mayor expresión de CD103 y Tim3 en peritoneo.
- Los grupos tratados con TcES expresan los genes MUC2 y TGF- β .

11. Referencias bibliográficas.

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H.H. y Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular. Elsevier.*
2. Abraham, C. y Cho, J. H. (2009). Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine.* 361:2066-2078.
3. Adalid-Peralta, L., Arce-Sillas, A., Fragoso, G., Cárdenas, G., Rosetti, M., Casanova-Hernández, D., Rangel-Escareño, C., Uribe-Figueroa, L., Fleury, A. y Sciutto E. (2013). Cysticerci drive dendritic cells to promote in vitro and in vivo Tregs differentiation. *Clinical and developmental immunology.* 2013:981468.
4. Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H. y Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology.* 8:765–772.
5. Ali, N., Zirak, B., Rodriguez, R. S., Pauli, M. L., Truong, H. A., Lai, K., Ahn, R., Corbin, K., Lowe, M. M., Scharschmidt, T. C., Taravati, K., Tan, M. R., Ricardo-González, R. R., Nosbaum, A., Bertolini, M., Liao, W., Nestle, F. O., Paus, R., Cotsarelis, G., Abbas, A. K. y Rosenblum, M. D. (2017). Regulatory T cells in skin facilitate epithelial stem cell differentiation article regulatory T cells in skin facilitate epithelial stem cell differentiation. *Cell.* 169(6):1119–29.e11.
6. Alonso-Trujillo, J., I. Rivera-Montoya, M. Rodriguez-Sosa y L.I. Terrazas. (2007). Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal Parasitology Research.* 100:1341-1350.
7. Ananthakrishnan, A.N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews: Gastroenterology and Hepatology.* 12: 205-217.
8. Anderson, A. C., Joller, N. y Kuchroo, V.K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity.* 44:989–1004.
9. Andolfi, G., Fousteri, G., Rossetti, M., Magnani, C. F., Jofra, T., Locafaro, G., Bondanza, A., Gregori, S. y Roncarolo MG. (2012). Enforced IL-10 Expression Confers Type 1 Regulatory T Cell (Tr1) Phenotype and Function to Human CD4+ T Cells, *Molecular Therapy: the journal of the American society of gene therapy.* 20(9):1778–1790.
10. Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T. C., Cumano, A. y Bandeira, A. (2001). CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *Journal of Immunology.* 166:3008–3018.
11. Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Stadecker, M. J. y Gause, W. C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology.* 7(12): 975–987.
12. Arpaia, N., Green, J. A., Moltedo, B., Arvey, A., Hemmers, S., Yuan, S., Treuting, P. M. y Rudensky, A. Y. (2015). A distinct function of regulatory T cells in tissue protection. *Cell.* 162:1078-89.
13. Babu, S., Bhat, S. Q., Pavan, Kumar, N., Lipira, A. B., Kumar, S., Karthik, C., Kumaraswami, V. y Nutman, T. B. (2009). Filarial lymphedema is characterized

- by antigenspecific Th1 and Th17 proinflammatory responses and a lack of regulatory T cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 3:e420.
14. Becerra-Diaz, M. y Terrazas, L.I. (2014). *Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ , *International Journal of Parasitology*. 44(9):613–623.
 15. Belkaid, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews in Immunology*. 7:875–88.
 16. Belkaid, Y. y Tarbell, K. (2009). Regulatory T cells in the control of host microorganism interaction. *Annual Reviews of Immunology*. 27:551-89.
 17. Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. y Sacks, D. L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 420:502–507.
 18. Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F. y Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*. 27: 20–21.
 19. Bilate, A. M. y Lafaille, J. J. (2012). Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annual Reviews of Immunology*. 30:733-58.
 20. Borruel, N. (2003). Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: Inmunomodulación. *Gastroenterología y hepatología*. 26(supl 1):13-22.
 21. Bosques-Padilla, F. J., Sandoval-García, E. R., Martínez-Vázquez, M. A., Garza-González, E. y Maldonado-Garza, H.J. (2010). Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Revista de Gastroenterología de México*. 76(1):34-3.
 22. Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepker, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. y Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/ winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*. 27: 68–73.
 23. Cario, E. y Podolsky, D. K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*. 68: 7010–17.
 24. Cepek, K. L., Shaw, S. K., Parker, C. M., Russell, G. J., Morrow, J. S., Rimm, D. L. y Brenner, M. B. (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature*. 372:190–3.
 25. Chen, X., Subleski, J. J., Kopf, H., Howard, O. M., Mannel, D. N. y Oppenheim, J. J. (2008). Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4 β CD25 β FoxP3 β T regulatory cells: applicability to tumor infiltrating T regulatory cells. *Journal of Immunology*. 180: 6467–71.
 26. Clínica Universidad de Navarra. (2019).
 27. Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. y Vignali D.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 450:566–9.
 28. Correale, J. y Farez, M. F. (2011). The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 233(1–2):6–11.
 29. Couper, K. N., Blount, D. G. y Riley E. M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 180(9):5771–5777.

30. Danese, S. y Fiocchi, C. (2011). Ulcerative colitis *The New England Journal of Medicine*. 365(18):1713-1725.
31. Del Brutto, O. H. (2012). Neurocysticercosis: A Review. *Scientific World Journal*. 2012:ID 159821.
32. Deng, W., Xu, M., Meng, Q., Li, Z., Qiu, X., Yin, S., Sun, D., Dai, C. y Liu, Y. (2019). CD8+CD103+ iTregs inhibit the progression of lupus nephritis by attenuating glomerular endothelial cell injury. *Rheumatology*. 27. pii: kez112.
33. Díaz, R., Valdés, E., Cofré, C., Castro, P. (2015). Respuesta Th17 y autofagia: principales vías implicadas en enfermedad inflamatoria intestinal por los estudios de asociación de genoma completo. Nuevos factores implicados en la susceptibilidad a enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 107(9): 560-566.
34. Duque-Correa, M.A. y Rojas-López, M. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*. 26(2):73-86.
35. Eastaff-Leung, N., Mabarrack, N., Barbour, A., Cummins, A. y Barry S. (2010). Foxp3+ Regulatory T Cells, Th17 Effector Cells, and Cytokine Environment in Inflammatory Bowel Disease. *Journal Clinical Immunology*. 30(1):80-9.
36. Feng, Y., Wang, D., Yuan, R., Parker, C. M., Farber, D. L. y Hadley, G. A. (2002). CD103 expression is required for destruction of pancreatic islet allografts by CD8 (b) T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 196:877–86.
37. Finney, C. A., Taylor, M. D., Wilson, M. S. y Maizels, R. M. (2007) Expansion and activation of CD4+CD25+ regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *European Journal of Immunology*. 37, 1874–1886.
38. Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. y Rudensky, A. Y. (2005), A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology*. 6: 1142–1151.
39. Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V.K. y Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 206:3015–29.
40. Fuss, J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., de la Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C. y Strober, W. (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *Journal of Immunology*. 157(1):1261-1270.
41. Gershon, R. K. y Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology*. (6):903-14.
42. Goeze, J. A. E. y Zeder, J. G. H. (1800). Primer apéndice en la historia natural de los helmintos. *Crusius*.
43. Gómez-García, L., Rivera-Montoya, I., Rodríguez-Sosa, M. y Terrazas, L. I. (2006). Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co injected with bystander antigen," *Parasitology Research*. 99(4):440–448.
44. Gondek, D. C., DeVries, V., Nowak, E. C., Lu, L. F., Bennett, K. A., Scott, Z. A. y Noelle, R. J. (2008). Transplantation Survival Is Maintained by Granzyme B+

- Regulatory Cells and Adaptive Regulatory T Cells, *Journal of Immunology*. 181(7): 4752–4760.
45. Grainger, J. R., Smith, K. A., Hewitson, J. P., McSorley, H. J., Hargus, Y., Filbey, K. J., ... Maizels, R. M. (2010). Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. *The Journal of experimental medicine*. 207(11), 2331–2341.
 46. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 389:737-742.
 47. Ha, S-J, Park, H. J., Park, J. S., Jeong, Y. H., Son, J., Ban, Y. H., Chang, J. y Chung, A. H. (2016). Role of PD-1 in regulatory T cells during chronic virus infection. *Journal of Immunology*. 196:79.1.
 48. Hall, B. M., Jelbart, M. E. y Dorsch, S. E. (1984). Suppressor T cells in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. *Transplantation*. 37(6):595-600.
 49. Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M. y Kontula, K. (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 12(23):3668-3672.
 50. Harnett, W. y Harnett, M. M. (2010). Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nature Reviews Immunology*. 10(4): 278–284.
 51. Hart, A. L., Al-Hassi, H. O., Rigby, R. J., Bell, S. J., Emmanuel, A. V., Knight, S. C., Kamm, M. A. y Stagg, A. J. (2005). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 129: 50–65.
 52. Heller, F., Fromm, A., Gitter, A. H., Mankertz, J. y Schulzke, J. D. (2008). Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunology*. 1 (suppl 1): S58–61.
 53. Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillendbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W. y Schulzke, J.D. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *The American Journal of Gastroenterology*. 129(2): 550-564.
 54. Heller, F., Fuss, I. J., Nieuwenhuis, E. E., Blumberg, R. S. y Strober, W. (2002). Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity*. 17: 629–38.
 55. Hepworth, M. R., Grencis, R. K. y Artis, D. (2013). Regulation of immunity and inflammation following intestinal helminth infection in parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology. *Oxfordshire, UK*: 106–29.
 56. Herbert, D. R., Hölscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P., Mossmann, H., Claussen, B., Förster, I. y Brombacher, F. (2004). Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*. 20(5):623–635.
 57. Hesse, M., Piccirillo, C.A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., Cheever, A. W., Shevach, E. M. y Wynn, T. A. (2004). The pathogenesis of

- schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *Journal of Immunology*. 172:3157–66.
58. Hewitson, J. P., Grainger, J. R. y Maizels, R. M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 167(1):1–11.
 59. Hofmeyr, K.A., Jeon H. y Zang X. (2011). The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 2011:451694.
 60. Hou, N., Piao, X., Liu, S., Wu, C. y Chen, Q. (2015). Tim-3 induces Th2-biased immunity and alternative macrophage activation during *Schistosoma japonicum* infection. *Infection and Immunity*. 83:3074–3082.
 61. Huber, S., Schramm, C., Lehr, H. A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P. R., Neurath, M. F. y Blessing, M. (2004). Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Journal of Immunology*. 1; 173(11):6526-31.
 62. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. y Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO Journal*. 11:3887–3895.
 63. Ito, A., Plancarte, A., Ma, L., Kong, Y., Flisser, A., Cho, S. Y., Liu, Y. H., Kamhawi, S., Lightowers, M. W. y Schantz, P. M. (1998). Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 59:291-294.
 64. Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Ge, J., Xiang, B., Wu, X., Ma, J., Zhou, M, Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Guo, C. y Zeng Z. (2019). Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Molecular Cancer*. 18(1):10.
 65. Jin, X., Yang, Y., Bai, X., Shi, H., Zhang, W., Zhang, Z., Jia, W., Lin, J., Liu, M., Liu, X. (2019). Dendritic cells treated by *Trichinella spiralis* muscle larval excretory/secretory products alleviate TNBS-induced colitis in mice. *International Immunopharmacology*. 70:378–386.
 66. Johnston, C., McSorley, H., Smyth, D, Anderton, S., Wigmore, S. y Maizels, R. (2015). A role for helminth parasites in achieving immunological tolerance in transplantation. *Lancet*. 26; 385 Suppl 1:S50.
 67. Josefowicz, S. Z., Lu, L. F. y Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual Reviews of Immunology*. 30:531–64.
 68. Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491:119-124.
 69. Kaplan, G. G. y Ng, S. C. (2017). Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 152(2):313-321.
 70. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. y Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Reviews of Immunology*. 26:677–704.
 71. Kilshaw, P. J. (1999). Alpha E beta 7. *Molecular Pathology* 52:203–7.

72. Kilshaw, P. J. y Murant, S. J. (1990). A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *European Journal of Immunology*. 1990; 20: 2201–7.
73. Kornete, M., Sgouroudis, E. y Piccirillo, C. A. (2012). ICOS dependent homeostasis and function of Foxp3+ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology*. 188, 1064–1074.
74. Leclerc, B. G., Charlebois, R., Chouinard, G., Allard, B., Pommey, S., Saad, F. y Stagg, J. (2016). CD73 expression is an independent prognostic factor in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 22:158–66.
75. Lehmann, J., Huehn, J., De la Rosa, M., Maszyra, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A. y Hamann, A. (2002). Expression of the integrin alpha E beta 7 identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 13031-6.
76. Liu, M. F., Wang, C. R., Fung, L.L. y Wu, C.R. (2004). Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of immunology*. 59(2):198-202.
77. Loebbermann, J., Schnoeller, C., Thornton, H., Durant, L., Sweeney, N. P., Schuijs, M., O'Garra, A., Johansson, C. y Openshaw, P. J. (2012). IL-10 regulates viral lung immunopathology during acute respiratory syncytial virus infection in mice. *PLoS One*. 7(2):e32371.
78. López-Serrano, P., Pérez-Calle, J. L., Pérez-Fernández, M. T., Fernández-Font, J. M., Boixeda de Miguel, D. y Fernández-Rodríguez, C. M. (2010) Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 45: 1464–71.
79. Lozano, E., Dominguez-Villar, M., Kuchroo, V. y Hafler, D. A. (2012). The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function *Journal of Immunology*. 188:3869-3875.
80. MacDonald, T. (2001). The reaction of the immune system to pathogens but not food antigens and commensal bacteria. *Seminars in Immunology*. 13:159-61.
81. Maillard, H., Marionneau, J., Prophette, B., Boyer, E., y Celerier, P. (1998). *Taenia crassiceps* cisticercosis and AIDS. *Aids*, 12(12):1551-2.
82. Maizels, R.M. y Smith, K.A. (2011). Regulatory T cells in infection. *Advances in Immunology*. 112:73 e136.
83. Maizels, R.M. y Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology*. 3:733-744
84. Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D. y Allen, J.E. (2004). Helminth parasites—masters of regulation. *Reviews Immunol.* 201:89–116.
85. Malek, T. R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annual Reviews of Immunology*. 26: 453–479.
86. Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. y Rudensky, A. Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 201(7): 1061–1067.

87. Masuda, H., Iwai, S., Tanaka, T. y Hayakawa, S. (1995). Expression of IL-8, TNF-alpha and IFN-gamma m-RNA in ulcerative colitis, particularly in patients with inactive phase. *Journal of Clinical Laboratory Immunology*. 46: 111–23.
88. Matsuda, R., Koide, T., Tokoro, C., Yamamoto, T., Godai, T., Morohashi, T., Fujita, Y., Takahashi, D., Kawana, I., Suzuki, S. y Umemura, S. (2009). Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naïve ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 15: 328–34.
89. Maynard, C. L., Harrington, L.E., Karen M Janowski, K. M., Oliver, J.R., Zindl, C.L., Rudensky, A.Y. y Weaver, C.T. (2007). Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3– precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nature Immunology*. 8: 931.
90. McKinley, L., Logar, A. J., McAllister, F., Zheng, M., Steele, C. y Kolls. J. K. (2006). Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of pneumocystis pneumonia. *Journal of Immunology*. 177:6215–26.
91. McSorley, H. J., Harcus, Y. M., Murray, J., Taylor, M. D. y Maizels RM. (2008). Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite, *Brugia malayi*. *Journal of Immunology*. 181, 6456–6466.
92. Miyara, M. y Sakaguchi, S. (2007). Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in Molecular Medicine*. 13:108e16.
93. Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., y Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 142: 46–54.e42.
94. Monney, L., Sabatos, C.A., Gaglia, J. L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E. A., Coyle, A. J., Sobel, R. A., Freeman, G. J. y Kuchroo, V. K. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 415(6871):536–541.
95. Morales-Montor, J., y C. Larralde. (2005). The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology Research*. 131:287-294.
96. N. Peón, A., Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, L.I. (2013). Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and Its Antigens. *Biomedical Research. International*. 2013:ID 498583.
97. Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C.Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y. y Kaplan, G. G. (2018). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 23; 390 (10114):2769-2778.
98. Niess, J. H., Brand, S., Gu. X, Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., Litman, D. R. y Reinecker, H. C. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 307: 254–58.

99. Nishizuka, Y. y Sakakura, T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. 166(3906): 753-755.
100. Ohkura, N., Kitagawa, Y. y Sakaguchi, S. (2013). Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38:414 e23.
101. Okano, M., Satoskar, A. R., Nishizaki, K., Abe, M. y Harn, D.A. Jr. (1999). Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *Journal of Immunology*. 163(12):6712-7.
102. Okumura, K. y Tada, T. (1971). Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. VI. Inhibitory effect of thymocytes on the homocytotropic antibody response. *Journal of immunology*. 107(6):1682-9.
103. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. y Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature. Immunology*. 8(12):1353–1362.
104. Panduro, M., Benoist, C. y Mathis, D. (2016). Tissue Tregs. *Annual Reviews of Immunology*. 34:609–33
105. Pearce, E.J. y Reiner, S.L. (1995). Induction of th2 responses in infectious diseases. *Current Opinion in Immunology*. 7: 497–504.
106. Perše, M. y Cerar, A. (2012). Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012:718617.
107. Piccirillo, C. A. y Thornton, A. M. (2004). Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD256 regulatory T cells. *TRENDS in immunology*. 25(7):374-380.
108. Piconese, S., Pittoni, P., Burocchi, A., Gorzanelli, A., Carè, A., Tripodo, C. y Colombo, M. P. (2010). A non-redundant role for OX40 in the competitive fitness of Treg in response to IL-2. *European Journal of Immunology*. 40(10):2902-2913.
109. Pot, C., Apetoh, L. y Kuchroo, V. K. (2011). Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity, *Seminars in Immunology*. 23(3):202e208
110. Powrie, F., Read, S., Mottet, C., Uhlig, H. y Maloy, K. (2003). Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Found. Symp*. 252:92–114.
111. Rahman, A., Fahlgren, A., Sitohy, B., Baranov, V., Zirakzadeh, A., Hammarström, S., Danielsson, A. y Hammarström M. L. (2007). Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 13: 847–55.
112. Rahman, A., Fahlgren, A., Sundstedt, C., Hammarström, S., Danielsson, A. y Hammarström, M. L. (2011). Chronic colitis induces expression of β -defensins in murine intestinal epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 163: 123–30.
113. Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A. y Castell, M. (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 100(1), 29-34.
114. Rausch, S., Huehn, J., Loddenkemper, C., Hepworth, M. R., Klotz, C., Sparwasser, T., Hamann, A., Lucius, R. y Hartmann, S. (2009). Establishment of nematode infection despite increased Th2 responses and immunopathology after selective depletion of Foxp3+ cells. *European Journal of Immunology*. 39, 3066–3077.

115. Robinson, P. W., Green, S. J., Carter, C., Coadwell, J. y Kilshaw, P. J. (2001). Studies on transcriptional regulation of the mucosal T-cell integrin $\alpha E\beta 7$ (CD103). *Immunology*. 103: 146–154.
116. Roig J, Saiz ML, Galiano A, Trelis M, Cantalapiedra F, Monteagudo C, et al. (2018). Extracellular vesicles from the *Helminth Fasciola hepatica* prevent DSS-induced acute ulcerative colitis in a T-lymphocyte independent mode. *Front Microbiol*. 9:1036.
117. Roosenboom, B., Wahab, P. J., Smids, C., Groenen, M. J. M., van Koolwijk, E., van Lochem, E. G. y Horjus Talabur Horje C. S. (2019). Intestinal CD103+CD4+ and CD103+CD8+ T-Cell Subsets in the Gut of Inflammatory Bowel Disease Patients at Diagnosis and During Follow-up. *Inflammatory Bowel Diseases*. 25(9):1497-1509.
118. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. y Toda, M. (1995). Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*. 155:1151–1164.
119. Sakuishi, K., Ngiow, S. F., Sullivan, J. M., Teng, M. W. L., Kuchroo. V. K., Smyth, M. J., Anderson, A. C. (2013). TIM3+FOXP3+ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology*. 2:e23849.
120. Sánchez, A.M. y Yang, Y. (2011). The role of natural regulatory T cells in infection. *Immunoly Research*. 49:124 e34.
121. Sánchez-Fueyo, A., Tian, J., Picarella, D., Domenig, C., Zheng, X. X., Sabatos, C. A., Manlongat, N., Bender, O., Kamradt, T., Kuchroo, V. K., Gutiérrez-Ramos, J. C., Coyle, A. J. y Strom, T. B. (2003). Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nature Immunology*. 4(11):1093–1101.
122. Saraiva, M. y O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*. 10(3):170–181.
123. Schmid-Hempel, P. (2009). Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for “macroscopic phenomena” such as virulence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 364(1513):85–98.
124. Schmidt, A., Oberle, N. y Krammer, P.H. (2012). Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in Immunology*. 3:51.
125. Schmidt, E. M., Wang, C. J., Ryan, G. A., Clough, L. E., Qureshi, O. S., Goodall, M. Abbas, A. K., Sharpe, A. H., Sansom, D. M. y Walker, L. S. (2009). Ctl α -4 controls regulatory T cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity. *Journal of Immunology*. 182:274–82.
126. Schön, M. P., Schön, M., Parker, C. M. y Williams, I. R. (2002). Dendritic epidermal T cells (DETC) are diminished in integrin αE (CD103)-deficient mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 119:190–3.
127. Scuitto, E., G. Fragoso, y C. Larralde. (2011). *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine. *Parasite immunology*. 33:79-80.
128. Scuitto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Diaz ML, et al. (1990). Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol*. 12:687–96.

129. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. y Sakaguchi. S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of Experimental Medicine*. 201: 723– 735.
130. Sierro, S., Romero, P. y Speiser, D. E. (2011). The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 15:91–101.
131. Spehlmann, M. E. y Eckmann L. (2009). Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Current Opinion in Gastroenterology*. 25: 92–99.
132. Suffia, I., Reckling, S. K., Salay, G. y Belkaid, Y. (2005). A role for CD103 in the retention of CD4⁺CD25⁺ Treg and control of *Leishmania major* infection. *Journal of Immunology*, 174, pp. 5444-5455.
133. Suvas, S., Azkur, A. K., Kim, B. S., Kumaraguru, U. y Rouse. B. T. (2004). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *Journal of Immunology*. 172:4123–32.
134. Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L. C., Murata, K., Satomi, S., Sugamura, K. y Ishii, N. (2004). Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *Journal of Immunology*. 172(6):3580-3589.
135. Targan, S. R. y Karp, L.C. (2005). Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Annual Reviews of Immunology*. 206(1):296-305.
136. Taylor, M. D., van der Werf, N. y Maizels, R. M. (2012). T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. *Trends in Immunology*. 33:4.
137. Taylor, P. A., Lees, C. J., Fournier, S., Allison, J. P., Sharpe, A. H. y Blazar, B. R. (2003). B7 Expression on T Cells Down-Regulates Immune Responses through CTLA-4 Ligation via T-T Interactions. *Journal of Immunology*. 172(1):34–39.
138. Tecalco-Cruz, A. C., Ríos-López, D. G., Vázquez-Victorio, G., Rosales-Alvarez, R. E. y Macías-Silva, M. (2018). Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF- β /Smad signaling pathway in health and disease. *Signal Transduction and Targeting Therapy*. 8(3):15.
139. Terrazas, C.A., Gómez-García, L. y Terrazas, L.I. (2010). Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: a critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *International Journal of Parasitology*. 40: 1051-1062.
140. Terrazas, L.I. (2008). The complex role of pro- and antiinflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 8: 383–392.
141. Terrazas, L.I., Cruz, M. Rodriguez-Sosa, R. Bojalil, F. García-Tamayo y C. Larralde. (1999). Th1-type cytokines improve resistance to immune cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology Research*. 85:135-141.
142. Terrazas, 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 cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*. 84, 74–81.
143. Thomas, P. G. y Harn, D. A. Jr. (2004). Immune biasing by helminth glycans. *Cellular microbiology*. 6(1):13-22.

144. Uhlig, H. H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., Fanger, A., Tannapfel, A., Fontenot, J. D., Ramsdell, F. y Powrie, F. (2006). Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *Journal of Immunology*. 177:5852–5860.
145. Úngaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L. y Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet*. 389:1756-1770.
146. Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L. y Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet*. 389(10080):1756-1770.
147. Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G. y Lipsky, P. E. (2007). Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology*. 178(4):2579-88.
148. Van Klinken, B. J., Van der Wal, J. W., Einerhand, A.W., Büller, H. A. y Dekker, J. (1999). Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut*. 44:387–93.
149. Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. C. y O'Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Immunology*. 172:5986–5993.
150. Vignali, D. A., Collison, L. W. y Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews. Immunology*. 8(7): 523–532.
151. Wang, L., Yu, Z., Wan, S., Wu, F., Chen, W., Zhang, B., ... Wu, Z. (2017). Exosomes Derived from Dendritic Cells Treated with *Schistosoma japonicum* Soluble Egg Antigen Attenuate DSS-Induced Colitis. *Frontiers in pharmacology*, 8, 651.
152. Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J. L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F. D., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M. y Brunkow, M. E. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature Genetics*. 27: 18–20.
153. Willms, K., y Zurabian, R. (2010). *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Journal of Parasitology*. 137 (03):335-346.
154. Wilson, M. S., Taylor, M. D., O'Gorman, M. T., Balic, A., Barr, T. A., Filbey, K., Anderton, S. M. y Maizels, R. M. (2010). Helminth-induced CD19+CD23hi B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *European Journal of Immunology*. 40:1682–1696.
155. Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D. M., Okumura, K., Azuma, M. y Yagita, H. (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of Immunology*. 169:5538–5545.
156. Yang, X., Yang, Y., Wang, Y., Zhan, B., Gu Y., et al. (2014) Excretory/Secretory Products from *Trichinella spiralis* Adult Worms Ameliorate DSS-Induced Colitis in Mice. *PLoS ONE* 9(5): e96454.
157. Zhang, H., Chua, K. S., Guimond, M., Kapoor, V., Brown, M. V., Fleisher, T. A., Long, L. M., Bernstein, D., Hill, B. J., Douek, D. C., Berzofsky, J. A., Carter, C. S., Read, E. J., Helman, L. J. y Mackall, C. L. (2005). Lymphopenia and interleukin-

- 2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Medicine*. 11: 1238–1243.
158. Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., Zheng, X. X., Strom, T. B. y Kuchroo, V. K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology*. 6(12):1245–1252.