



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**LABORATORIO NACIONAL EN SALUD: DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y  
EFECTO AMBIENTAL EN ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS**

**Efecto de los productos Excretados/Secretados de *Taenia crassiceps*  
sobre la población de células Tregs durante el desarrollo de Cáncer  
de Colon Asociado a Colitis**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**STEPHANIE GUERRERO GARCÍA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JONADAB EFRAÍN OLGUÍN HERNÁNDEZ**



Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, 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.

**El presente trabajo fue financiado por el proyecto:**

**DGAPA-PAPIIT IN226519**

## Agradecimientos

En primer lugar tengo que agradecer a la persona que me ha hecho lo que soy, mi mamá. Ella me enseñó a ser responsable y me contagió sus ganas de conocimiento; la observé estudiar cada noche para poder superarse y darnos una vida mejor. Al verla como profesionista me motivó a seguir sus pasos y a estudiar en la misma universidad en la que estudió, la UNAM. Mamá, eres un gran ejemplo para mí, todo lo haces con mucha pasión y dedicación es por eso que eres una gran profesionista y una excelente madre. Gracias por todo el apoyo que me has dado para que yo pudiera obtener una educación universitaria, por tus consejos y por siempre escucharme. Tengo las mejores bases gracias a ti.

A mis abuelitos, Lucía y Juan, que se convirtieron en mis segundos padres y me enseñaron muchas cosas valiosas. Mi mamá Lucía me enseñó valores culturales, de respeto y cuidado hacia las plantas y animales, y mi papá Juan me inculcó las ganas de estudiar con sus anécdotas de la universidad. Los dos están llenos de conocimiento y de amor, gracias por todo lo que he aprendido de ustedes.

A Charly mi hermano, gracias, porque a pesar de que pasamos momentos difíciles, hiciste más amena mi infancia y me acercaste un poco más a la ciencia de maneras muy divertidas.

Tengo que agradecer también a una persona maravillosa que encontré en mi camino, que me ha otorgado todo su amor, paciencia, comprensión, apoyo y tiempo. Mi Johnny muchas gracias, porque los dos sabemos lo desgastante que llega a ser una carrera universitaria, donde las relaciones personales pueden tambalear, aun así, superamos nuestras carreras simultáneamente, con todas las desveladas, el estrés de los exámenes, los proyectos para entregar, y mis prácticas de campo, a pesar de todo siempre tuve tu comprensión y tu apoyo. Gracias porque me ayudas a esclarecer mis ideas y me motivas a ser mejor cada día. Contigo tengo un lugar de reflexión y tranquilidad al que siempre quiero regresar.

En el primer semestre de la carrera conocí a la que se convertiría en mi mejor amiga, Mony. Nunca pensamos que nuestras vidas tuvieran tanta semejanza entre sí y que tuviéramos tantos gustos en común. Gracias porque tuviste la confianza para hablarme de todo. Además de ser una gran amiga fuiste una gran compañera en la escuela, siempre estuviste ahí para ayudarme con temas de las clases que no comprendía, y nunca me dejaste sola cuando teníamos que entregar algún trabajo. Aunque ya no nos vemos tan seguido, sabemos que nos tenemos la una a la otra.

Agradezco profundamente a mi universidad, la UNAM, que me permitió estudiar mi carrera en una de sus Facultades más bonitas, la FESI. Además de que me ayudó a cumplir uno de mis grandes sueños, viajar al extranjero y ampliar mi visión hacia otros horizontes.

Al Dr. Efraín Olguín, le agradezco por adentrarme en el mundo de la inmunología, por ayudarme a comprender estos temas tan interesantes y tan nuevos para mí, y por hacerme razonar con esos “ejemplos que tanto gustan”. Me enseñó a diseñar y a desarrollar mis experimentos, siempre estuvo disponible para resolver cualquier duda tanto experimental como de escritura. Se ha convertido en una persona admirable para mí, porque además de ser un gran científico es un excelente músico. Muchas gracias Doctor.

A mis compañeros de laboratorio; Lupis, Eli y Alonso que me ayudaron con mis experimentos, y a Vicky que se unió a nuestro equipo recientemente, gracias a todos porque hacen que cada momento en el Lab sea más ameno y divertido. A la Doctora Itzel, muchas gracias por sus enseñanzas y porque siempre estuvo dispuesta a ayudarme con amabilidad y paciencia.

Le agradezco al Dr. Terrazas por aceptarme en su equipo de trabajo y por su apoyo durante mi estancia en el Laboratorio Nacional de la FESI. Les agradezco a los chicos del laboratorio 5 y 8 de la UBIMED por su asesoramiento.

## Índice

Resumen .....	7
<b>1. Introducción .....</b>	<b>9</b>
1.1 Cáncer de colon .....	9
1.2 Epidemiología del cáncer de colon .....	10
1.3 Etiología del cáncer de colon .....	11
1.4 Cáncer de colon asociado a colitis y respuesta inmune. ....	12
1.4.1 Células T reguladoras .....	13
1.4.2 Células Tregs naturales.....	14
1.4.3 Células T reguladoras inducidas .....	15
1.4.4 Mecanismos de supresión de las Tregs .....	15
1.4.4.1 Citocinas inhibitorias.....	15
1.4.4.2 Citólisis .....	16
1.4.4.3 Disrupción metabólica.....	16
1.4.4.4 Supresión por contacto .....	17
1.5 <i>Taenia crassiceps</i> .....	19
1.5.1 Ciclo de vida .....	20
1.5.2 Cepa ORF.....	21
1.5.3 <i>T. crassiceps</i> y respuesta inmune .....	21
<b>2. Antecedentes directos.....</b>	<b>23</b>
2.1 Justificación .....	24
<b>3. Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>24</b>
3.1 Hipótesis .....	24
3.2 Objetivo general .....	24
3.3 Objetivos particulares.....	25
<b>4. Materiales y métodos.....</b>	<b>25</b>
4.1 Animales utilizados. ....	25
4.2 Obtención de los productos excretados/secretados de <i>T. crassiceps</i> (TcES).....	25

4.2.1 Infección de <i>T. crassiceps</i> . .....	25
4.2.2 Obtención de los TcES. ....	26
4.2.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford. ....	26
4.2.4 Integridad del TcES. ....	27
4.3 Desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC). ....	28
4.4 Administración de TcES. ....	28
4.5 Obtención de células de bazo y nódulos mesentéricos. ....	28
4.5.1 Cultivo de células de bazo. ....	29
4.6 Citometría de flujo. ....	30
4.6.1 Inmunofluorescencia de células de bazo y nódulos mesentéricos (NM). ....	30
4.6.2 CBA (Cytometric bead array). ....	30
4.7 Determinación del daño causado por el CAC. ....	32
4.7.1 Registro de peso. ....	32
4.7.2 Daño macroscópico en el colon. ....	32
4.7.3 Histología. ....	32
4.7.4 Deshidratación e inclusión en parafina ....	32
4.7.5 Tinción con hematoxilina & eosina. ....	33
4.8 Programas utilizados. ....	34
4.9 Análisis estadísticos. ....	35
<b>5. Resultados. ....</b>	<b>36</b>
5.1 Cuantificación de proteínas, integridad y administración de los TcES. ....	36
5.2 Determinación del avance de la enfermedad. ....	37
5.3 Análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo. ....	42
5.4 Análisis de citocinas de los perfiles Th1, Th2 y Th17. ....	55
<b>6. Discusión y conclusiones. ....</b>	<b>58</b>
Anexo. ....	69
Literatura citada. ....	71



## Resumen

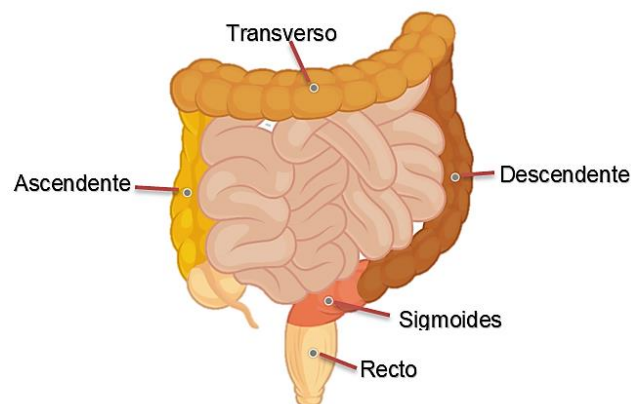
El sistema inmune cumple un rol fundamental en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (CAC). La respuesta inflamatoria crónica contribuye de manera importante en su desarrollo, donde las células T reguladoras (Tregs) se encargan de modular la inflamación exacerbada. El control excesivo de la respuesta inflamatoria por las células Tregs puede conducir a la progresión tumoral y a la ineficiencia de la respuesta inmune protectora. Por otro lado *Taenia crassiceps* y sus productos excretados/secretados (TcES) son capaces de modular la respuesta inmune hacia un perfil antiinflamatorio, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar si los TcES tienen un efecto sobre el porcentaje y la activación de las células Tregs. Infectamos a ratones hembra BALB/c con 20 metacístodos de *T. crassiceps* y a las 8 semanas de infección, extrajimos los metacístodos para incubarlos durante 24 horas, recuperando el sobrenadante que contiene los TcES. Posteriormente, indujimos CAC a ratones hembra BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup> mediante la inyección intraperitoneal de 12.5 mg/kg de azoximetano (AOM) y administramos tres ciclos de dextrán sulfato de sodio (DSS) al 2% en el agua para beber. Durante el segundo ciclo del CAC inyectamos a un grupo de ratones con 100 µg de TcES vía intraperitoneal. Cada semana de la inducción al CAC, los ratones fueron pesados y al finalizar la inducción, sacrificamos a los ratones y les extrajimos el colon, el cual fue medido, lavado y procesado histológicamente para observar los daños ocasionados por el CAC; sumado a esto analizamos a las células Tregs mediante citometría de flujo y analizamos citocinas mediante un ensayo de CBA. Observamos que los grupos CAC y CAC+TcES presentaban acortamiento del colon en comparación a los grupos controles, de igual manera, observamos que el porcentaje de células Tregs aumentó en los grupos con CAC en comparación con los grupos controles. Encontramos que los TcES aumentan la expresión de

PD-1 en el grupo Ctrl+TcES en comparación a los demás grupos. En cuanto a las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> notamos que tienden a disminuir en los grupos a los que se les administraron los TcES, posiblemente por el reclutamiento de otras poblaciones celulares supresoras. La administración de TcES disminuyó la concentración de IL-17A, IL-17F e IL-22. Por otro lado al realizar una correlación de Pearson, se encontró que a mayor número de tumores aumenta la concentración de IL-17A e IL-17F y esto es independiente de los TcES. Por lo tanto concluimos que la administración de 100 µg de TcES no genera cambios en el tamaño del colon ni el número de tumores, tampoco tiene efecto sobre el porcentaje de células Tregs aunque podría tener efecto sobre sus moléculas de activación. En cuanto a la concentración de citocinas concluimos que los TcES pueden modular la concentración de citocinas del perfil Th17 y que las citocinas IL-17A e IL-17F son importantes para el desarrollo tumoral.

## 1. Introducción

### 1.1 Cáncer de colon

El cáncer es el nombre que se le otorga a un grupo de enfermedades que tienen como característica común el crecimiento anormal y descontrolado de las células, y que puede generarse en cualquier parte del cuerpo (WHO, 2019). Particularmente, el 95% de los cánceres de colon comienza con la afectación de las células productoras de moco (Infocáncer, 2019). El cáncer de colon se clasifica dependiendo de la zona en que se desarrolle, ya sea en el colon ascendente, transversal, descendente, sigmoides o rectal (Fig.1). Esta enfermedad es difícil de tratar si no se detecta a tiempo, afecta tanto a hombres como mujeres, y ha cobrado gran relevancia en los últimos años, ya que ha aumentado su presencia, sobre todo en países desarrollados (Boyle y Langman, 2000).

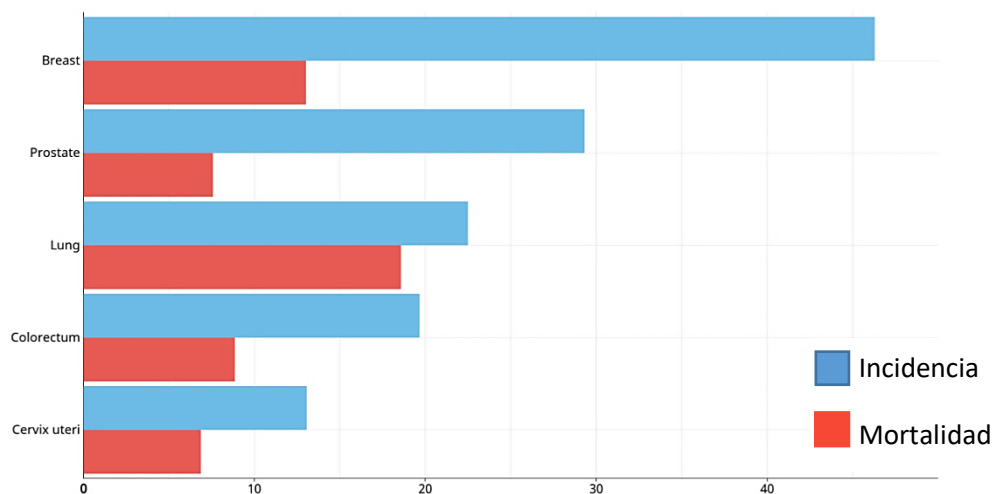


**Fig. 1. Clasificación del cáncer de colon por su localización.** Este tipo de cáncer puede originarse en cualquier parte del colon, pudiendo ser en el colon ascendente, transversal, descendente, sigmoides o en el recto. Imagen modificada de Infocáncer 2019.

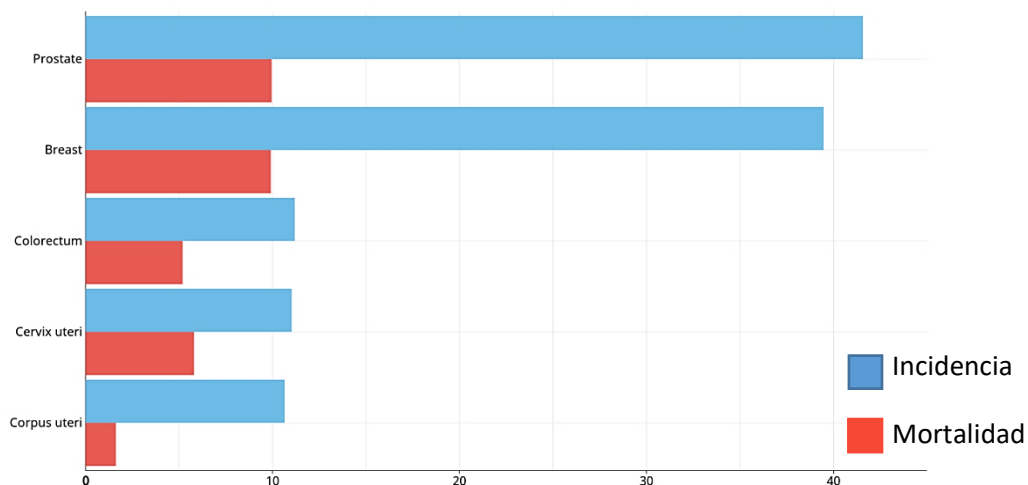
## 1.2 Epidemiología del cáncer de colon

De acuerdo a las estimaciones más recientes del Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN) en 2018, el cáncer de colon se encuentra en el cuarto lugar en incidencia a nivel mundial y es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo (Fig.2 A). En México ocupa el tercer lugar en incidencia y el cuarto lugar en mortalidad (Fig.2 B).

**A)** Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages



**B)** Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, Mexico, both sexes, all ages



**Fig. 2. Incidencia y mortalidad del cáncer de colon.** A) El cáncer de colon ocupa el cuarto lugar en incidencia y el tercero en mortalidad a nivel mundial. B) El cáncer de colon en México se encuentra en tercer lugar en incidencia mientras que ocupa el cuarto lugar en mortalidad. Datos expresados en un rango estandarizado de edad (ASR) por cada 100 mil personas. GLOBOCAN, 2018.

### **1.3 Etiología del cáncer de colon**

Las causas del cáncer de colon se pueden dividir en no modificables y modificables (Infocáncer, 2019). Dentro de las causas no modificables se encuentra la edad ya que 9 de cada 10 personas diagnosticadas con cáncer de colon tienen más de 50 años (Infocáncer, 2019). Dentro de las causas no modificables se incluyen los padecimientos hereditarios, tal es el caso de la poliposis adenomatosa familiar, la cual aparece en personas jóvenes y genera numerosas lesiones poliposas en el colon, si estas no son extirpadas pueden convertirse en cáncer de colon (Bosman et al, 2014).

Las causas modificables se refieren al estilo de vida del individuo, e incluyen la ingesta de carne roja, la cual se ha sugerido que, al cocinarla a altas temperaturas genera aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos, ambos altamente carcinógenos (Larsson y Wolk, 2006). Por otro lado, se ha sugerido que la ingesta de carne procesada como los embutidos, incrementa el riesgo de padecer cáncer de colon, debido al alto contenido en grasas y aditivos (Santarelli et al, 2008). De igual forma, la obesidad puede aumentar la probabilidad de padecer cáncer de colon (GLOBOCAN, 2018) y, ligada a la obesidad, se encuentran varios factores como la resistencia a la insulina, la alteración en los niveles de citocinas asociadas a adipocitos, alteración en los niveles de factores de crecimiento, así como en los niveles de hormonas esteroides (Jochem y Leitzmann, 2016). El consumo de alcohol también está relacionado con el desarrollo de cáncer de colon, debido a que el alcohol es degradado hacia acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa y en consecuencia se pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS); además el consumo elevado de alcohol se ha asociado con daño a las mucosas (Orywal y Szmitkowski, 2017; Seitz y Stickel, 2007).

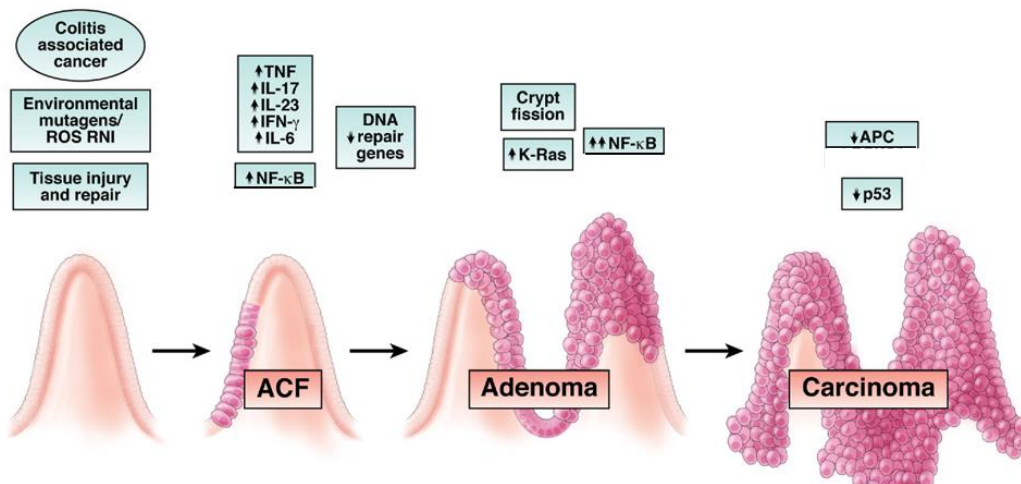
Otro factor implicado en el desarrollo del cáncer de colon, es la respuesta del sistema inmunológico, ya que se ha descrito su participación primordial en el desarrollo de la inflamación crónica (Renz et al, 2011) que puede concluir en la generación del cáncer de colon (Terzić, et al, 2010).

#### **1.4 Cáncer de colon asociado a colitis y respuesta inmune.**

El cáncer de colon asociado a colitis (CAC), es un modelo murino de cáncer de colon en el que se requiere de una inflamación crónica para su desarrollo (Tanaka et al, 2003). Este modelo surgió a partir de que se observó que pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y colitis ulcerativa, tienen dos veces más probabilidad de padecer cáncer de colon (Feagins et al, 2009), debido a la presencia de diversos mediadores inflamatorios como el factor de transcripción NF-kB (Bosman et al, 2014), así como de las citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-23 e IFN- $\gamma$  (Terzić, et al, 2010).

Durante el desarrollo del CAC existe infiltración de diversas células del sistema inmune al intestino como células dendríticas (DC), macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK), células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) y T cooperadoras (CD4<sup>+</sup>) (Atreya y Neurath, 2008). Las células fagocíticas de la respuesta inmune, como DC, macrófagos y neutrófilos al activarse producen especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNI) (Lambeth, 2004), que a su vez causan daño al DNA, induciendo mutaciones en genes supresores tumorales, como lo son p53 y APC (Markowitz y Bertagnolli, 2009), lo que provoca la formación de focos de criptas aberrantes (Terzić, et al, 2010). Cuando la inflamación persiste, se acumulan mutaciones en otros genes encargados de la reparación del DNA, como los genes de reparación de bases mal pareadas (mismatch repair genes) (Colotta et al, 2009). Lo anterior, promueve la activación de protooncogenes como K-ras, y concluye en la

formación de un carcinoma (Palacio y Muñetón, 2012) (Fig.3). Por lo tanto, existe una asociación entre la respuesta inmune inflamatoria y el desarrollo del CAC.



**Fig. 3. Progresión del cáncer de colon asociado a colitis.** Células pro-inflamatorias activadas producen especies reactivas del oxígeno (ROS) que causan daño al DNA, lo que genera focos de criptas aberrantes (ACF). Si la inflamación persiste, se generan mutaciones en genes de reparación del DNA, lo cual genera la formación de un adenoma. La activación de oncogenes y la mutación en p53, ocasiona la progresión tumoral, generando un carcinoma. Imagen modificada de Terzić, et al, 2010.

### 1.4.1 Células T reguladoras

Las células Tregs representan del 5 al 10% de las células T-CD4<sup>+</sup> en la periferia, expresan constitutivamente la cadena alfa del receptor de la interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) conocido CD25, el cual se ha demostrado que es fundamental para mantener la tolerancia inmunitaria, debido a que su eliminación provoca el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes como gastritis, insulinitis y tiroiditis (Sakaguchi et al, 1995). Las células T reguladoras (Tregs) son las células encargadas de mantener la homeostasis en el sistema inmune, evitando atacar a las células propias y previniendo la inflamación exacerbada (Johdi et al, 2017). En el tracto gastrointestinal, se requiere homeostasis entre la

inflamación y la antiinflamación, lo que es llevado a cabo por interacciones entre células proinflamatorias T helper 1, (Th1), Th17 y células Tregs que secretan interleucina 10 (IL-10) (Kamanaka et al, 2011). La producción de IL-10 por las células Tregs ha sido esencial para modelos de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) en ratones, debido a su acción antiinflamatoria (Vignali et al, 2008). Las células Tregs se clasifican en Tregs naturales o Tregs inducidas, dependiendo de su origen, fenotipo y por las moléculas de superficie que expresan (Siachoque et al, 2011).

#### **1.4.2 Células Tregs naturales**

Las células Tregs naturales (nTregs) se desarrollan en el timo donde adquieren la expresión del factor de transcripción forkhead box P3 (Foxp3), este es el encargado del mantenimiento y función de las nTregs (Vignali et al, 2008). Se ha descrito que ratones Scurfy, los cuales poseen una delección en el factor de transcripción Foxp3, desarrollan un padecimiento autoinmune fatal, caracterizado por una proliferación descontrolada de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> autorreactivos (Fontenot et al, 2003). Por otro lado, en humanos, mutaciones en Foxp3 causan una enfermedad autoinmune que se desarrolla en la infancia llamado IPEX (síndrome de inmunodesregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligada a X) (Bennett et al, 2001), la cual es caracterizada por la ausencia de la actividad reguladora de las Tregs (Nademi et al, 2014). También se ha descrito que las células nTregs expresan constitutivamente otras moléculas que se asocian con su capacidad supresora, como el antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos-4 (CTLA-4), el factor-receptor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR) y poseen una expresión reducida de la cadena alfa de la interleucina 7 (CD127) (Corthay, 2009; Zaunders et al, 2014). El receptor CD127 se ha utilizado junto con el factor de transcripción Foxp3 para definir a las nTregs (Liu, et al, 2006). Sin embargo, células Tregs



de memoria y Tregs inducidas lo expresan de forma elevada, ya que utilizan a la IL-7 para su mantenimiento (Gratz et al, 2013; Gratz y Cambell, 2014).

### **1.4.3 Células T reguladoras inducidas**

Las células Tregs inducidas (iTregs) tienen capacidad supresora, y se originan fuera del timo, a partir de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> naïve (vírgenes). Su desarrollo es consecuencia de un microambiente tolerogénico (Becker et al, 2006). La estimulación de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> naïve con altos niveles de IL-10, origina una población de células iTregs, conocida como células Tr1 (Roncarolo et al, 2001), mientras que la estimulación de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> naïve con altos niveles del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), da origen a las células Th3 (Weiner, 2001). Las células iTregs no expresan constitutivamente Foxp3, sin embargo, se ha reportado que se puede inducir la expresión de Foxp3 en las iTregs bajo determinadas condiciones (Povoleri et al, 2013).

### **1.4.4 Mecanismos de supresión de las Tregs**

Desde que se describieron las células Tregs, se han descrito sus mecanismos de supresión clasificándolos en cuatro grupos que incluyen: supresión mediada por citocinas inhibitorias, citólisis, supresión por contacto y supresión por disrupción metabólica (Vignali et al, 2008).

#### **1.4.4.1 Citocinas inhibitorias**

Las citocinas IL-10 y el TGF- $\beta$  se han relacionado con la función supresora de las Tregs. La IL-10 es una citocina antiinflamatoria; se ha descrito que la IL-10 secretada por las células Tregs disminuye la expresión de moléculas co-estimuladoras en las DC provocándoles un estado tolerogénico (Fassbender et al, 2010). Por otro lado, se ha reportado que el TGF- $\beta$  aumenta la supresión de

las Tregs, sin embargo, al quitar el TGF- $\beta$  las células Tregs no pierden su capacidad supresora (Huber et al, 2004). La IL-35 es una citocina que forma parte de la superfamilia de la IL-12, y es secretada por las células nTregs confiriéndoles capacidad supresora (Collison et al, 2007) (Fig.4 A).

#### **1.4.4.2 Citólisis**

La citólisis es un mecanismo que utilizan primordialmente los linfocitos T citotóxicos y las células NK. Se lleva a cabo mediante la producción de granzimas y perforinas. Las granzimas son proteasas que se encuentran en los gránulos citoplasmáticos. Las granzimas entran en la membrana de las células con el propósito de activar caspasas, lo que induce apoptosis (Vignali et al, 2008). Sin embargo, se ha documentado que las células Tregs también utilizan este mecanismo de supresión contra otras células. En un estudio realizado por Gondek et al en 2005, donde se utilizaron ratones deficientes en granzima B, se observó que las células Tregs reducen su capacidad supresora *in vitro*. También otro grupo de investigación, demostró que las células Tregs pueden matar a células B a través de granzimas y perforinas (Zhao et al, 2006), e incluso se ha descrito que pueden suprimir de esta manera tanto a células NK y CD8<sup>+</sup>, lo que impide la eliminación de células tumorales (Cao et al, 2007) (Fig.4 B).

#### **1.4.4.3 Disrupción metabólica**

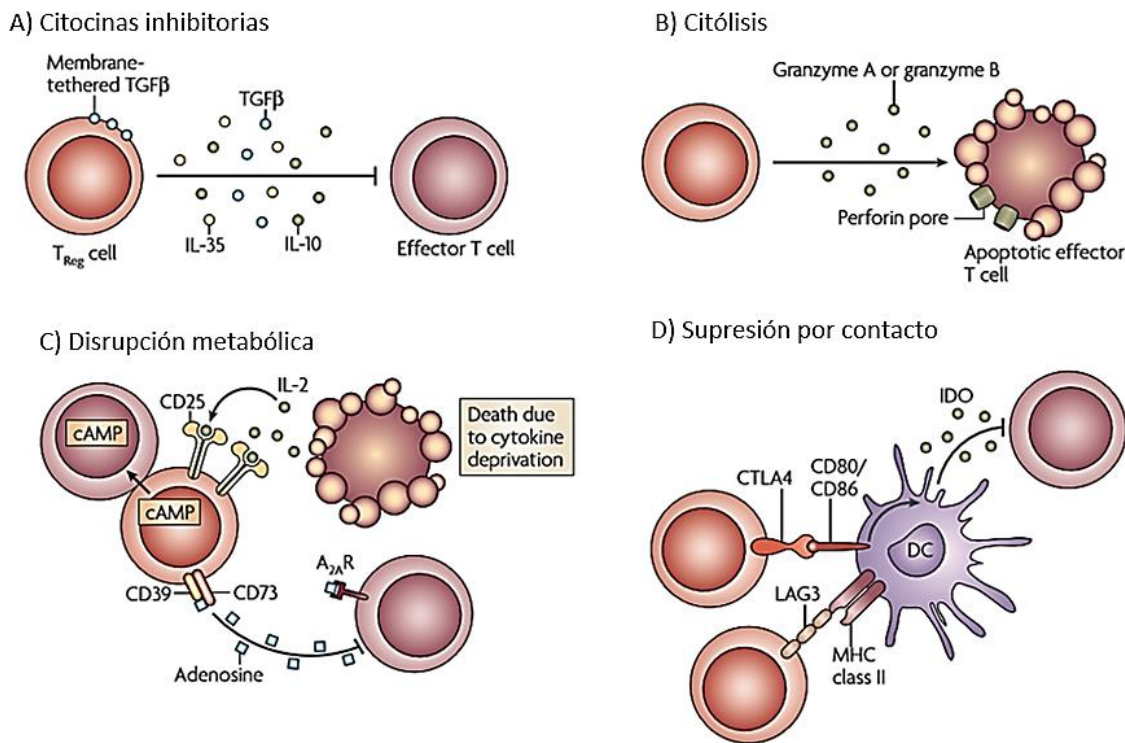
Las células Tregs expresan niveles elevados de CD25, ayudándolas a consumir la IL-2 del medio, privando a las demás células de esta citocina, lo que ocasiona que las células T efectoras mueran (de la Rosa et al, 2004). Otro mecanismo de supresión es llevado a cabo por las ectonucleotidasas CD39 y CD79, las cuales

al metabolizar el ATP extracelular producen adenosina, que es un potente supresor (Vignali et al, 2008) (Fig. 4 C).

#### **1.4.4.4 Supresión por contacto**

Este tipo de supresión es llevada a cabo por las moléculas que las células Tregs expresan en la superficie de su membrana. Por ejemplo, el receptor CTLA-4 que se une a las moléculas co-estimuladoras de las células presentadoras de antígeno (APCs) CD80 y CD86, inhibe la acción de las células efectoras a través de las APCs. La supresión mediada por CTLA-4, reduce la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en las APCs, incluso reduce la presencia de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  (Wing et al, 2008). Otro ejemplo de la supresión mediada por contacto es a través del receptor del gen 3 de activación de los linfocitos (LAG3) o CD223, el cual actúa uniéndose al complejo principal de histocompatibilidad II (MHCII), resultando en la inhibición de la maduración de las células dendríticas (DC) (Okamura et al, 2012) (Fig.4 D).

Otras moléculas de superficie que se encuentran constitutivamente en las células Tregs son la inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 (Tim-3) y el receptor de muerte programada 1 (PD-1). Tim-3 es una proteína transmembranal que se expresa constitutivamente en células T después de activarse (Monney et al, 2002), e interactúa con su ligando galectina 9 para inducir la muerte de células Th1 (Zhu et al, 2005). La molécula PD-1 se une a su ligando PDL-1 lo cual induce supresión de células T (Gatalica et al, 2014). Se ha observado que la capacidad supresora de las células Tregs requiere de las moléculas Tim-3 y PD-1 (Francisco et al, 2009; Fourcade et al, 2010).



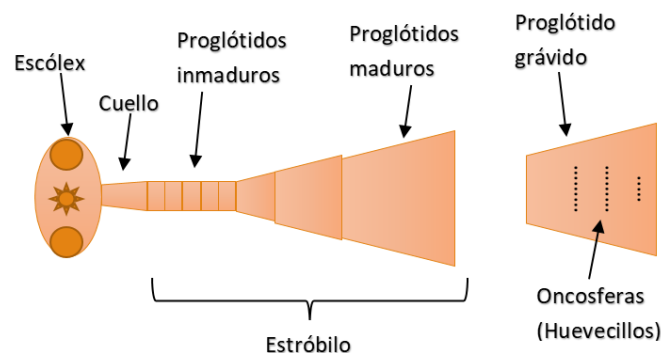
**Fig. 4. Mecanismos de supresión de las Tregs.** A) Citocinas inhibitorias. Las células Tregs secretan IL-10, IL-35 y en presencia de TGF- $\beta$ , impiden la activación de las células T efectoras. B) Citólisis. Las células Tregs causan la muerte de células efectoras mediante la secreción de granzima B y perforina. C) Disrupción metabólica. Las Tregs expresan CD25 de manera elevada por lo que consumen la IL-2 del medio, dejando a las células efectoras sin esta citocina. La adenosina es un supresor que se genera por las ectoenzimas CD39 y CD73, que se expresan en las células Tregs. D) Las células Tregs expresan moléculas en su superficie, las cuales se unen a las células dendríticas, evitando la activación de las células efectoras. Imagen modificada de Vignali et al, 2008.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las células T reguladoras pueden modular la respuesta inmune, evitando la inflamación exacerbada. Sin embargo, algunos organismos parasitarios también son capaces de modular las respuestas inflamatorias y polarizar hacia una respuesta antiinflamatoria (Zakeri, 2017). Se ha observado que la infección con parásitos helmintos incrementa el porcentaje de células Tregs, a la vez que disminuye el porcentaje de células T activadas, donde también se ha encontrado elevado el TGF- $\beta$  (Finney et al,

2007), En el caso del parásito *Taenia crassiceps*, se ha demostrado que tanto la infección intraperitoneal, así como la inyección de los productos excretados/secretados de *T. crassiceps* a ratones, aumentan la expresión de Foxp3 en las células Tregs, sumado a un incremento de la IL-10 (Zepeda et al, 2016).

### 1.5 *Taenia crassiceps*

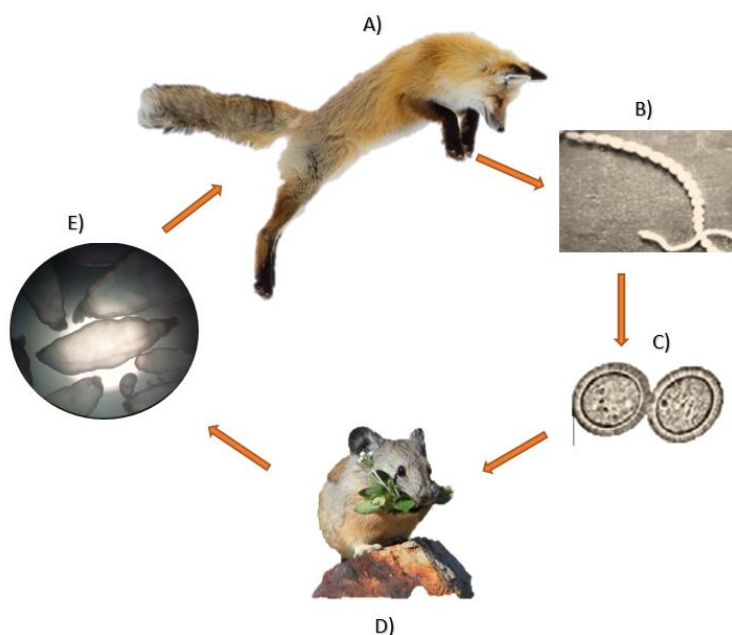
*T. crassiceps* (Zeder, 1800) es un endoparásito del phylum Platyhelminthes de la clase Céstoda (Willms y Zurabian, 2009). Se distribuye principalmente en el hemisferio norte e infecta primordialmente a lobos, zorros, gatos y perros; el contagio a seres humanos es extremadamente raro, sólo se han confirmado 10 casos y se les relaciona con personas comprometidas inmunológicamente (Lescano y Zunt, 2013). En la vida silvestre los metacéstodos de *T. crassiceps* han sido encontrados en el tejido subcutáneo de ratones salvajes (Freeman, 1962).



**Fig. 5. Morfología de un cestodo.** Formado por el escólex, el cuello y su estróbilo, el cual, está formado por proglótidos, conforme crece, los proglótidos maduran; un proglótido grávido lleva los huevecillos infectivos dentro, éste se separa del estróbilo y es expulsado por las heces del hospedero.

### 1.5.1 Ciclo de vida

Como ya se mencionó, el gusano adulto de *T. crassiceps* habita en el intestino delgado de lobos, zorros, gatos e incluso perros, los cuales son sus hospederos definitivos. Cuando éste parásito crece, los segmentos por los que está formado (proglótidos) maduran y se separan del parásito (Fig.5), dentro de estos segmentos se encuentran sus huevecillos, los cuales son liberados por medio de las heces del hospedero definitivo (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001). Cuando los huevecillos u oncosferas son ingeridos por algún roedor (hospedero intermediario), atraviesan el epitelio intestinal y se diferencian hacia su etapa larval o metacéstodo. Posteriormente, el ratón infectado con metacéstodos es ingerido por un carnívoro, donde los metacéstodos crecen y llegan a su etapa adulta en el intestino del depredador (Willms y Zurabian, 2009) (Fig. 6).



**Fig. 6. Ciclo de vida de *T. crassiceps*.** A) Hospedero definitivo, dentro de su intestino delgado se desarrolla B) gusano adulto de *T. crassiceps*, el cual se reproduce y expulsa en las heces C) huevecillos infectivos, los cuales son ingeridos por D) hospedero intermediario, los huevecillos se diferencian en E) metacéstodos en el tejido del hospedero intermediario, los metacéstodos al ser ingeridos por el hospedero definitivo llegan a su etapa adulta. Imágenes B y C tomadas de Willms y Zurabian, 2009.

### **1.5.2 Cepa ORF**

Los metacéstodos de *T. crassiceps* poseen la capacidad de reproducirse asexualmente de manera exponencial en la cavidad peritoneal de roedores como el hámster (Freeman, 1962), y se han aislado diferentes cepas de éste metacéstodo (Willms y Zurabian, 2009), una de ellas es la cepa ORF, la cual posee una mutación genética que le impide desarrollar el escólex, y son estériles, por lo que no pueden llegar a la etapa adulta en el hospedero definitivo (Dorais y Esch, 1969). Esta cepa se ha usado en diversas investigaciones debido a su alta tasa de reproducción en la cavidad peritoneal de ratones, sobre todo en la cepa de ratón BALB/c (Willms y Zurabian, 2009), donde se ha encontrado que los ratones hembra son más susceptibles a desarrollar la infección, en comparación con los machos (Sciutto et al, 1991). La supervivencia de los parásitos depende de la tolerancia entre el hospedero y el parásito, y para lograrlo, los parásitos han desarrollado mecanismos complejos, donde la inmunomodulación de su hospedero parece ser la clave de su adaptación (Terrazas, 2008).

### **1.5.3 *T. crassiceps* y respuesta inmune**

Las infecciones por helmintos desatan una respuesta inmune antiinflamatoria, porque los gusanos y sus productos excretados/secretados dañan a las células epiteliales de su hospedero. Lo anterior induce la activación de APCs las cuales, van a polarizar a los linfocitos T hacia un perfil antiinflamatorio (Th2) caracterizado por la producción elevada de las citocinas IL-4 e IL-13, las cuales a su vez, polarizarán a los macrófagos hacia un perfil alternativamente activado (MAAs). Los MAAs inhiben la activación de células T y secretan precursores de colágeno, el cual se utiliza para la reparación de la pared del intestino y para

encapsular al helminto (Allen y Maizels, 2011). Esta respuesta antiinflamatoria llevada a cabo por los helmintos, vuelve susceptible a su hospedero, resultando efectiva para la proliferación de los parásitos (Rodríguez-Sosa et al, 2002). Sin embargo, también se ha reportado que la inactivación de células inflamatorias puede ser desfavorable para el hospedero, ya que impediría la acción de células inflamatorias contra otros patógenos o contra células cancerosas (Wang y Wang, 2007).

Por otro lado, cuando un ratón se infecta con los metacéstodos de *T. crassiceps*, se presenta una respuesta inmune inflamatoria aguda del tipo Th1, caracterizada por altos niveles de IFN- $\gamma$ , IL-2, óxido nítrico (NO) e IgG2a. Durante esta etapa, la carga parasitaria se mantiene baja, pero conforme avanza el proceso infeccioso, la respuesta inmune se polariza hacia una respuesta antiinflamatoria tipo Th2, caracterizada por las citocinas IL-4, IL-10, IgG1 e IgG2b (Terrazas et al, 1998). Estudios posteriores confirmaron que la supervivencia de *T. crassiceps* dependía de una respuesta Th2, ya que ratones C57BL/6 desarrollan una mínima carga parasitaria debido a una respuesta Th1 incrementada (Reyes et al, 2009).

También, se ha observado que *T. crassiceps* puede inducir apoptosis de células inflamatorias, ya que 12 días posteriores a la infección con metacéstodos, se observa una disminución de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y eosinófilos (Zepeda et al, 2010). Estos mecanismos de regulación, que se resumen en el cambio de respuestas inflamatorias a antiinflamatorias, parece ser un mecanismo efectivo para la supervivencia prolongada del parásito en su hospedero (Zakeri, 2017). Esta capacidad antiinflamatoria de *T. crassiceps* se ha propuesto para tratar enfermedades inflamatorias como la colitis (Ledesma-Soto et al, 2015) o incluso el CAC (León-Cabrera et al, 2014). Sumado a esto, la hipótesis de la higiene sugiere que el aumento en las medidas de sanidad, así como de la



desparasitación en los países desarrollados, ha generado un aumento en enfermedades inflamatorias, como el CAC (Rook, 2009).

## **2. Antecedentes directos**

El sistema inmune cumple un rol fundamental en el desarrollo del CAC, debido a que se requiere de una respuesta inflamatoria crónica para su desarrollo (Terzić, et al, 2010), mientras que las células Tregs se encargan de modular la respuesta inmune inflamatoria exacerbada que puede ser causada en el intestino (Kamanaka et al, 2011). Sin embargo, el control excesivo de la respuesta inflamatoria por las células Tregs, puede conducir a la progresión tumoral y a la ineficiencia de la respuesta inmune protectora (Pastille et al, 2014; Olgún et al, 2018). Por otro lado, los helmintos pueden regular la respuesta inmune hacia un perfil antiinflamatorio induciendo la activación de células Tregs (Allen y Maizels, 2011), incluso la inyección de sus productos excretados secretados provoca un aumento en la expresión de Foxp3 en las células Tregs, así como un aumento de IL-10 (Zepeda et al, 2016). En estudios previos de colitis y CAC, se ha descrito que la infección con *T. crassiceps* modula la respuesta inmune hacia un perfil Th2, logrando la disminución de la inflamación, así como de los daños causados por estas enfermedades (Ledesma-Soto et al, 2015; León-Cabrera et al, 2014), este perfil antiinflamatorio también se observa en los estudios donde se usaron los TcES para tratar la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Peón et al, 2017) y la diabetes tipo 1 (Espinoza-Jímenez et al, 2017).

## **2.1 Justificación**

El cáncer de colon es una enfermedad que ha aumentado su prevalencia en años recientes en países desarrollados (Boyle y Langman, 2000). El CAC es un subtipo de cáncer de colon, donde se requiere de una respuesta inflamatoria para su desarrollo (Terzić, et al, 2010), y se ha demostrado que las células Tregs pueden modular la respuesta inflamatoria suprimiendo a otras células del sistema inmune (Kamanaka et al, 2011); sumado a esto, la infección con *T. crassiceps*, así como la administración de sus productos excretados/secretados (TcES), pueden modular la respuesta inmune de su hospedero hacia una respuesta de tipo antiinflamatorio (León-Cabrera et al, 2014; Peón et al, 2017). Sin embargo, se desconoce si los TcES utilizan a las Tregs como medio de supresión de células inflamatorias, generando protección.

## **3. Hipótesis y objetivos**

### **3.1 Hipótesis**

Debido a que los parásitos Helmintos son capaces de modular la respuesta inmune de su hospedero, la administración de los productos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* (TcES) durante el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (CAC), tendrá un efecto sobre las células T reguladoras (Tregs), lo cual se verá reflejado en un menor desarrollo de esta enfermedad.

### **3.2 Objetivo general**

Evaluar si los productos Excretados/Secretados de *Taenia crassiceps* tienen un efecto sobre el porcentaje y la activación de las células Tregs durante el desarrollo del CAC en un modelo murino.

### **3.3 Objetivos particulares**

Obtener los productos Excretados/Secretados de *Taenia crassiceps*.

Determinar el avance de la enfermedad mediante el registro del peso de los ratones.

Analizar macroscópicamente y mediante histología los posibles daños ocasionados por el CAC.

Analizar las poblaciones celulares, Tregs, T activadas y CD8<sup>+</sup>, así como los marcadores de activación de las Tregs, como, PD-1, CD127 y Tim-3, en bazo y nódulos mesentéricos.

Analizar las citocinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, en el sobrenadante de cultivos celulares de bazo y nódulos mesentéricos.

## **4. Materiales y métodos.**

### **4.1 Animales utilizados.**

Se utilizaron ratones hembra BALB/c y BALB/c Foxp3<sup>EGFP</sup>, los cuales expresan la proteína verde fluorescente después del promotor Foxp3, ambas cepas de 8 a 10 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en el bioterio de la FES Iztacala en condiciones controladas, con alimento y agua estériles *ad libitum*.

### **4.2 Obtención de los productos excretados/secretados de *T. crassiceps* (TcES).**

#### **4.2.1 Infección de *T. crassiceps*.**

Para obtener el antígeno de *T. crassiceps*, se infectaron ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, mediante la inoculación de 20 metacístodos de la cepa ORF de *T. crassiceps* de 2 mm de tamaño vía intraperitoneal.

#### 4.2.2 Obtención de los TcES.

A las ocho semanas de infección con *T. crassiceps*, los ratones fueron sacrificados en condiciones estériles. Los metacéstodos que se reprodujeron en la cavidad peritoneal se extrajeron y se colocaron en tubos de 50 ml, lavando cuatro veces con solución salina estéril. Posteriormente, se colocaron en botellas de cultivo en una relación 1:1 con solución salina y se dejaron incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, en un ambiente humidificado, en oscuridad, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se recuperó el sobrenadante con las excreciones y secreciones de los parásitos (TcES), se colocó en tubos de corte de 50 kDa (Merck Millipore®) y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos, se recuperó la fracción mayor a 50 kDa, se le agregó inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich®), seguido de una filtración en una malla de 0.22µm. Se realizaron alícuotas de 100 µl y se refrigeraron a -70°C hasta su uso.

#### 4.2.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Para obtener la concentración de los TcES, se tomó una alícuota de 10µl del TcES, se descongeló y se colocó en una placa de 96 pozos, donde se realizaron diluciones 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 y 1:160. Se realizó una curva patrón con BSA a una concentración conocida de 100 µg/ml y posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:2. A continuación, se agregaron 100 µl del reactivo de Bradford a todos los pozos; una vez realizado este paso, dejamos incubar durante cinco minutos en oscuridad. Las muestras y la curva patrón, se leyeron en un lector de microplacas (Thermo™), con la ayuda del programa Ascent™ a 570nm. De acuerdo con las absorbancias obtenidas se realizó la gráfica de la curva, donde se despejó la ecuación  $y = mx + b$ , obteniendo  $x = \frac{(y-b)}{m}$ , (donde x= concentración, y= absorbancia, b= ordenada y m= pendiente de la recta). Se interpolaron las absorbancias del TcES con la concentración de BSA y

finalmente, para obtener la concentración final de cada alícuota, multiplicamos por el factor de dilución.

#### **4.2.4 Integridad del TcES.**

Una vez realizada la cuantificación de proteínas, se verificó la integridad del TcES por medio de una electroforesis en gel, para lo cual, se ensambló la cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN®) y se preparó un gel de poliacrilamida, compuesto por un gel separador y un gel concentrador (anexo). Se ensamblaron los cristales y se agregaron 10 ml de gel separador, seguido de 1ml de isopropanol. Una vez solidificado, se retiró el isopropanol y se agregaron 5 ml del gel concentrador, se colocó un peine para formar los carriles donde se colocaron las muestras y cuando el gel polimerizó se retiró el peine. Se utilizaron 30 µg de proteína de TcES por carril y se mezcló con β-mercapto-etanol en un tubo, posteriormente se colocó en agua a 98°C durante 5 minutos. Para cargar el gel, colocamos el marcador de peso molecular (PageRuler™) en el primer carril y en los siguientes el TcES, se agregó buffer de corrida (anexo), y se conectó la cámara de electroforesis a 90 V y 150 mA durante dos horas. Pasado este tiempo, el gel se colocó en un recipiente hermético con colorante azul de Coomassie® y se dejó en agitación durante cinco minutos, posteriormente se desechó ese colorante y se agregó solución desteñidora (anexo), se cerró el recipiente y se dejó en agitación durante toda la noche.

### 4.3 Desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC).

Ratones hembra  $Foxp3^{EGFP}$  fueron inducidos a CAC por la administración de una inyección intraperitoneal de Azoxymetano (AOM) (Sigma-Aldrich®), a una dosis de 12.5mg/kg. Una semana después, se administró dextrán sulfato de sodio (DSS) disuelto en agua al 2% *ad libitum* durante siete días. Durante los 14 días posteriores se les suministró agua. Los ratones fueron sometidos a dos ciclos más de DSS, y al día 68 se sacrificaron (Fig.1).

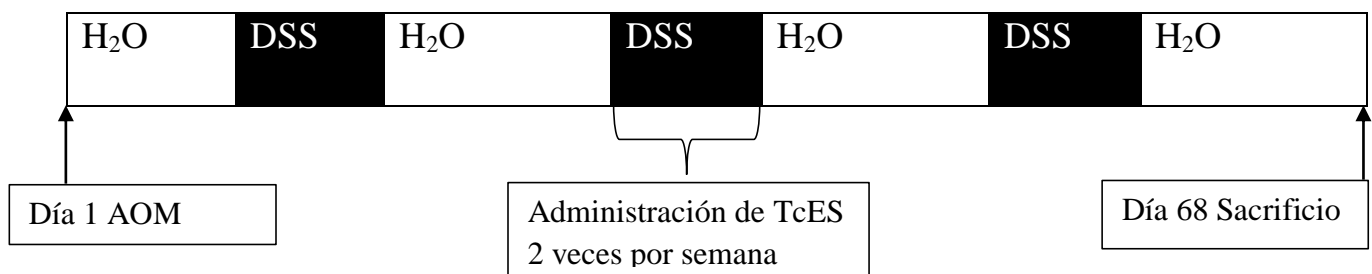


Fig. 7. Modelo de cáncer de colon asociado a colitis y administración de TcES.

### 4.4 Administración de TcES.

Las alícuotas con el TcES se descongelaron manteniéndolas en hielo para evitar la degradación de las proteínas. Se tomaron 100  $\mu$ g de proteína de TcES en jeringas de 1 ml (Plastipak™), y se inyectó por la vía intraperitoneal a los ratones con CAC y a ratones sanos, dos veces por semana durante el segundo ciclo de inducción del CAC.

### 4.5 Obtención de células de bazo y nódulos mesentéricos.

Después de sacrificar a los ratones, se extrajo el bazo y los nódulos mesentéricos (NM). Cada órgano se colocó en una caja Petri junto con tela organza previamente esterilizada, la cual nos sirve para que las células salgan del órgano a analizar. En el caso de las células de bazo, se agregaron 5 ml de solución salina

estéril, mientras que en el caso de las células de NM se agregaron 5 ml de medio RPMI, y con la ayuda del émbolo de una jeringa, se maceraron los tejidos. Posteriormente, se recuperó la solución salina o el medio con las células y se colocaron en un tubo de 15 ml. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se decantó y, en el caso de las células de bazo, se agregó 1ml de solución de lisis (anexo) durante 5 minutos, posteriormente se agregaron 10 ml de solución salina y se centrifugó a 1500 rpm por cinco minutos. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de solución salina. En el caso de las células de NM, no se requirió de lisar eritrocitos y se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI. Las células se tiñeron con azul tripano en una dilución 1:1, se colocaron 10 µl de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se contaron en un contador automatizado (Countess II FL ThermoFisher™).

#### **4.5.1 Cultivo de células de bazo.**

En una placa de cultivo de 96 pozos (Costar™), colocamos anticuerpo  $\alpha$ -CD3, a una concentración de 5 µg/ml, y se dejó en incubación durante 24 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, se sembraron  $3 \times 10^5$  células de bazo obtenidas en el punto 4.5 de este apartado, y se colocaron en los pozos con 200 µl de medio RPMI. La placa se colocó en un ambiente humidificado a 36°C, con 5% de CO<sub>2</sub>, durante 48 horas. Concluido este tiempo, la placa se almacenó a -70°C hasta su utilización para cuantificar citocinas en el sobrenadante.

## 4.6 Citometría de flujo.

### 4.6.1 Inmunofluorescencia de células de bazo y nódulos mesentéricos (NM).

Se tomaron  $1 \times 10^6$  de células de bazo y NM (punto 4.5) y se colocaron en tubos de 1.5 ml. Se agregaron los anticuerpos que reconocen específicamente las moléculas a analizar (Tabla 1) y se dejaron incubar a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregó 1ml de buffer FACS (BD), y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 350  $\mu\text{l}$  de buffer FACS (BD) para su lectura en el citómetro Attune NxT (Invitrogen).

Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Marca
PD1	PE	J43.1	Tonbo
CD127	PE/Cy7	A7R34	Tonbo
Tim3	Alexa 647	138.2C12	Biolegend
CD25	BV711	PC61	Biolegend
CD4	APC	GK1.5	Biolegend

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia de células de bazo y nódulos mesentéricos.**

### 4.6.2 CBA (Cytometric bead array).

Para determinar las citocinas presentes en el sobrenadante del cultivo de células de bazo, utilizamos el kit LEGENDplex™ Multi-analyte Flow Assay Th17, el cual utiliza un conjunto de perlas que se unen a citocinas presentes en el



sobrenadante de la muestra. Las citocinas se unen a un anticuerpo que emite fluorescencia, que será detectada por el citómetro de flujo. Debe existir una correlación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de las citocinas, para lo cual se realiza una curva estándar. Primeramente, se descongeló la placa del punto 4.5.1 de este apartado y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, posteriormente se recuperaron 25 µl del sobrenadante de cada pozo y se colocaron en microtubos de fondo redondo. Las muestras se trabajaron a temperatura ambiente. Posteriormente mezclamos las perlas de captura, donde primero determinamos el número de ensayos a realizar, incluyendo los de la curva estándar y un control negativo. Los tubos con las perlas se colocaron en un sonicador durante 1 minuto y se mezclaron con un vórtex durante 30 segundos para que quedaran completamente resuspendidas. Se tomaron 25 µl de cada perla por muestra y se colocaron en un solo tubo. Por otra parte, se preparó una curva estándar, reconstituyendo el tubo que contenía el liofilizado de citocinas con buffer de ensayo, se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se procedió a hacer diluciones seriadas, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024 y 1:4096, dejando un tubo que sólo contenía buffer de ensayo como control negativo. Para comenzar el ensayo se mezcló el tubo con las perlas y se agregaron 25 µl de la mezcla a todos los tubos, seguido de 25 µl de los anticuerpos de detección. Todas las muestras se incubaron durante 2 horas, en agitación y en oscuridad, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, agregamos 25 µl de SA-PE (Estreptavidina-Ficoreritrina) y dejamos 30 minutos en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez concluido este tiempo, centrifugamos los tubos a 1000 g durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y colocamos 200 µl de buffer de lavado a cada tubo. Posteriormente se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 µl de buffer de lavado. Una vez que las muestras estuvieron listas se adquirieron en el citómetro FACSAria Fusion (BD®).

## **4.7 Determinación del daño causado por el CAC.**

### **4.7.1 Registro de peso.**

Para monitorear el avance de la enfermedad, cada semana del experimento y hasta el sacrificio, se registró la pérdida o aumento del peso de los ratones de todos los grupos experimentales

### **4.7.2 Daño macroscópico en el colon.**

Después de sacrificar a los ratones, se les extrajo el colon, el cual se midió con la ayuda de papel milimétrico. Posteriormente, el colon fue lavado con una inyección de solución salina, y se le realizó un corte longitudinal para exhibir la parte interna del colon. Se contaron los tumores mayores a 2 mm, así como los pólipos menores a 2mm.

### **4.7.3 Histología.**

Se cortó una sección de la parte distal del colon de aproximadamente 0.5 cm de longitud con la ayuda de un bisturí, los tejidos se colocaron en trozos de cartulina de aproximadamente 1 cm de longitud, lo cual permite mantener el tejido extendido. Posteriormente, las muestras se etiquetaron y se colocaron en alcohol absoluto, el cual sirvió como método de fijación.

### **4.7.4 Deshidratación e inclusión en parafina.**

Los tejidos se colocaron individualmente en cassetes para inclusión y posteriormente se colocaron en un vaso de precipitados con alcohol al 100% manteniéndolos en agitación durante 1 hora. Al término de este tiempo, el alcohol se retiró y se agregó alcohol al 100% nuevo, dejando los tejidos otra hora. El proceso se repitió una vez más. Una vez concluido éste proceso, los tejidos se sumergieron en xilol durante una hora, se repitió el proceso dos veces

más cambiando por xilol nuevo cada vez. Una vez concluido el tiempo, los tejidos se sumergieron en parafina (Paraplast®), que se encontraba en un horno a 58°C para mantenerla líquida, dejando por una hora. Se repitió este proceso 2 veces más cambiando la parafina cada vez.

Cuando concluyó el tiempo de los tejidos en la última parafina, se incluyeron en un bloque que permite realizar los cortes histológicos. Con la ayuda de una central de inclusión en parafina (Lupetec®), los cassettes se colocaron en bandejas calientes a 58°C para derretir la parafina que los envolvía. Una vez desparafinados, tomamos un molde para inclusión y le agregamos una capa fina de parafina, donde colocamos el tejido de manera vertical. Posteriormente, cubrimos el tejido con más parafina, se colocó la base del cassette como soporte y se dejó enfriar. Una vez solidificado el bloque, quitamos el molde y se realizaron los cortes histológicos.

El bloque de parafina se aseguró en un micrótopo (Leica®), y se realizaron cortes de 5 µm de grosor. Una vez obtenido el corte, lo colocamos en un baño de histología con agua destilada a 50°C para extender el tejido y, una vez extendido, lo recuperamos con un portaobjetos previamente cargado con poli-L-lisina dejando secar en una gradilla.

#### **4.7.5 Tinción con hematoxilina & eosina.**

Las laminillas se colocaron en un horno a 58°C durante 30 minutos, para quitar la parafina, dejando solamente los cortes de tejido. Una vez realizado este paso, las laminillas se sumergieron, primero en xilol 1 durante 5 minutos, posteriormente xilol 2 por 5 minutos, seguido de alcohol xilol a una proporción 1:1 por 3 minutos. Posteriormente se agregó alcohol de manera descendiente: 100%, 90%, 80%, 70% y posteriormente agua durante 3 minutos cada uno. Se comenzó la tinción de los tejidos con hematoxilina de Harris, durante dos

minutos, seguida de una sumersión en agua corriente, para después agregar alcohol ácido al 1%; posteriormente se agregó agua y agua amoniaca al 2% durante dos minutos, para continuar con, una sumersión en agua, seguida de eosina durante dos minutos y agua. Terminando este paso, las laminillas se sumergieron en alcoholes de manera ascendiente, 70%, 80%, 90% y 100% durante 2 minutos cada uno, seguido de xilol 1 y 2, durante 5 minutos cada uno. Una vez finalizado el proceso, agregamos una gota de Entellan® sobre cada una de las laminillas colocando un cubreobjetos encima y se dejó secar. Una vez secas las laminillas, se observaron en un microscopio (Zeiss®), a 10x y 40x.

#### **4.8 Programas utilizados.**

La concentración de proteínas se leyó con ayuda del programa Ascent™ (Thermo™), la foto del gel con las proteínas se tomó con el sistema Gel Doc™ Ez imager (BIO-RAD) utilizando el software Image Lab™. Las fotos de los cortes histológicos se tomaron con el programa AxioVision, todos de la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala. Las muestras adquiridas en el citómetro de flujo Attune NxT se analizaron con el software Attune, mientras que aquellas muestras adquiridas en el citómetro FACS Aria Fusion (BD®) se analizaron con el software FACSDiva™. Las intensidades de fluorescencia obtenidas del CBA se procesaron mediante el programa FlowJo v10, donde se correlacionaron con la concentración de cada citocina. Las pruebas estadísticas, así como los gráficos, se realizaron en el programa GraphPad Prism 7. Estos programas se utilizaron en el laboratorio nacional en salud de la FES Iztacala.

#### **4.9 Análisis estadísticos.**

Para el porcentaje de células y la concentración de citocinas, se realizó una prueba ANOVA de una sola vía y para el peso de los ratones se realizó una prueba ANOVA de dos vías, todas seguidas de una prueba de Tukey de múltiples comparaciones. En el caso del número de tumores se realizó una T de student. Para la correlación entre el número de tumores y la concentración de citocinas se realizó una correlación de Pearson. Todas las pruebas se realizaron con una confiabilidad del 95%.

## 5. Resultados.

### 5.1 Cuantificación de proteínas, integridad y administración de los TcES

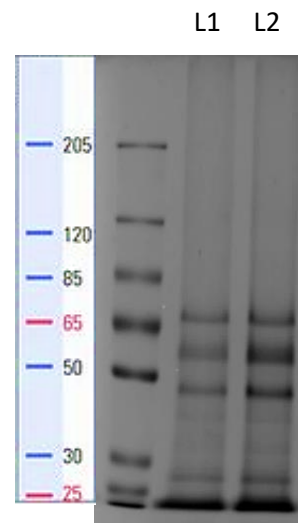
Como ya se mencionó en el apartado de materiales y métodos, se obtuvieron los TcES, de dos cultivos diferentes de metacéstodos de *T. crassiceps*, del lote 1 (L1), obtuvimos 840 µl y del lote 2 (L2), 1 ml. Posteriormente realizamos la cuantificación de proteínas, seguido de un gel de poliacrilamida para confirmar la integridad de los productos excretados/secretados que se administraron a los ratones. Como se puede apreciar en el gel (Fig.8 B), existe un bandeo similar en los dos lotes, obtenidos de los diferentes cultivos, lo que confirma su integridad.

Se inyectaron por vía intraperitoneal, 100 µg de proteína de TcES durante el segundo ciclo de inducción de CAC, ya que Terzić y colaboradores en 2010, reportan que es partir de esta etapa, donde se comienza a visualizar daño a la mucosa del colon, provocado por la inflamación, sumado a observaciones realizadas en el laboratorio (Olgúin et al 2018). Los grupos experimentales se clasificaron en 4: control (Ctrl), cáncer de colon asociado a colitis (CAC), cáncer de colon asociado a colitis más la administración de los TcES dos veces por semana durante el segundo ciclo del CAC (CAC+TcES), y un grupo control con la administración de los TcES dos veces por semana durante el segundo ciclo del CAC (Ctrl+TcES).

A)

Lotes de TcES	Proteínas $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
L1	1.52 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
L2	6.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

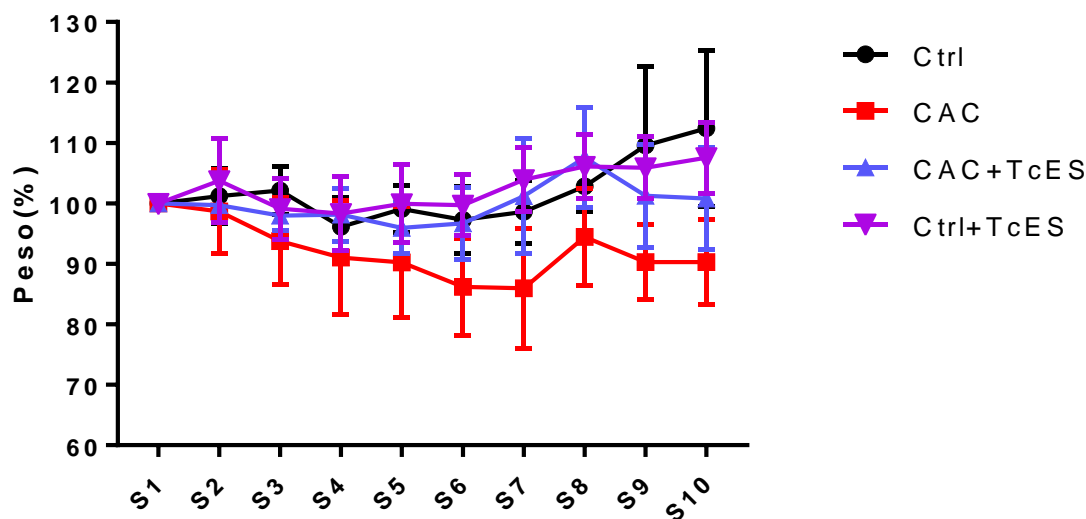
B)



**Fig. 8. Los TcES obtenidos de dos lotes son íntegros.** A) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford de los dos lotes de TcES usados en los experimentos. B) Gel de poliacrilamida utilizado para verificar la integridad del TcES. Se colocaron muestras de dos lotes de TcES obtenidos de diferentes cultivos, el patrón de bandeo es similar en ambos lotes, lo que indica integridad en la obtención de los TcES.

## 5.2 Determinación del avance de la enfermedad.

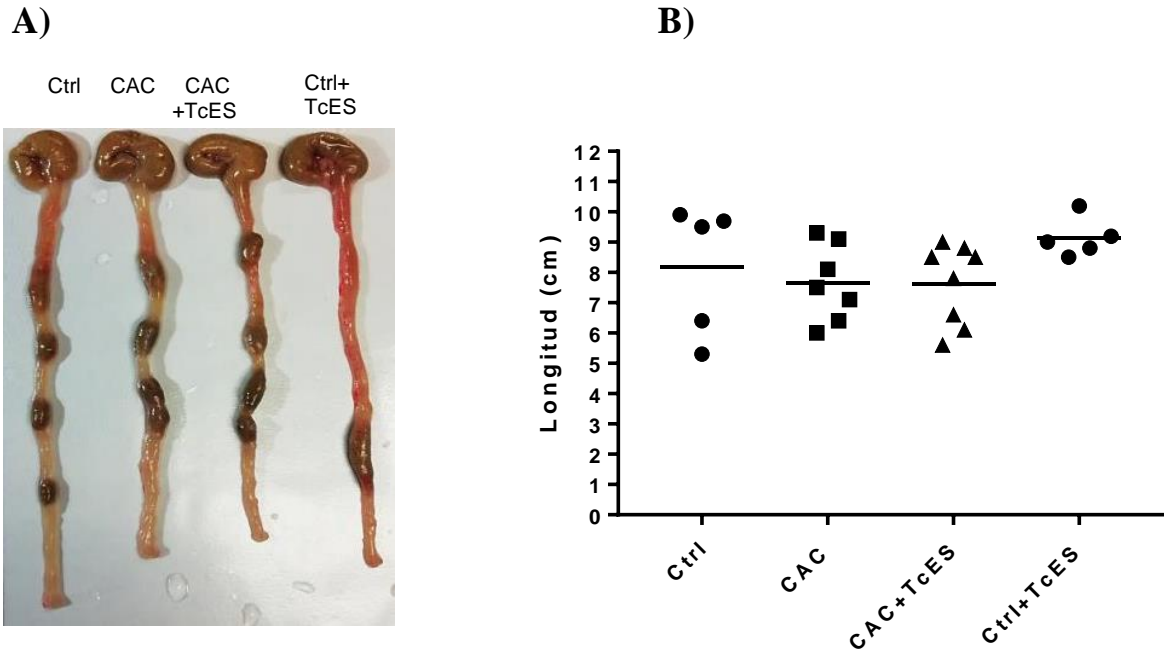
El peso de los ratones se registró una vez por semana durante el desarrollo del experimento. Como se puede observar en la gráfica (Fig.9), el grupo control tiende a aumentar el porcentaje de su peso conforme pasan las semanas, llegando a aumentar hasta 10% de su peso inicial; de igual manera sucede con el grupo Ctrl+TcES. En cuanto al grupo CAC, se observa una tendencia distinta, ya que el porcentaje de su peso disminuye a partir de la semana 6 de la inducción al CAC, y a pesar de que aumenta el porcentaje en la semana 8, el porcentaje de su peso disminuye alrededor de 10% al finalizar la inducción al CAC. Por otro lado el grupo CAC+TcES, disminuye el porcentaje de su peso a partir de la semana 5 de la inducción del CAC, sin embargo, al finalizar la inducción de CAC, el porcentaje se recupera y es similar al porcentaje de peso inicial.



**Fig. 9. El grupo CAC presenta una mayor pérdida de peso al finalizar el tercer ciclo del CAC.** Porcentaje de peso de los ratones Ctrl (control), CAC (cáncer de colon asociado a colitis), CAC+TcES (cáncer de colon asociado a colitis con la administración de 100  $\mu$ g de TcES dos veces por semana durante el segundo ciclo del CAC) y Ctrl+TcES (control más la administración de 100  $\mu$ g de TcES dos veces por semana durante el segundo ciclo de inducción al CAC). El peso de los ratones se registró una vez por semana, tomando como referencia el peso del primer día como el 100%. Datos obtenidos de dos experimentos independientes.

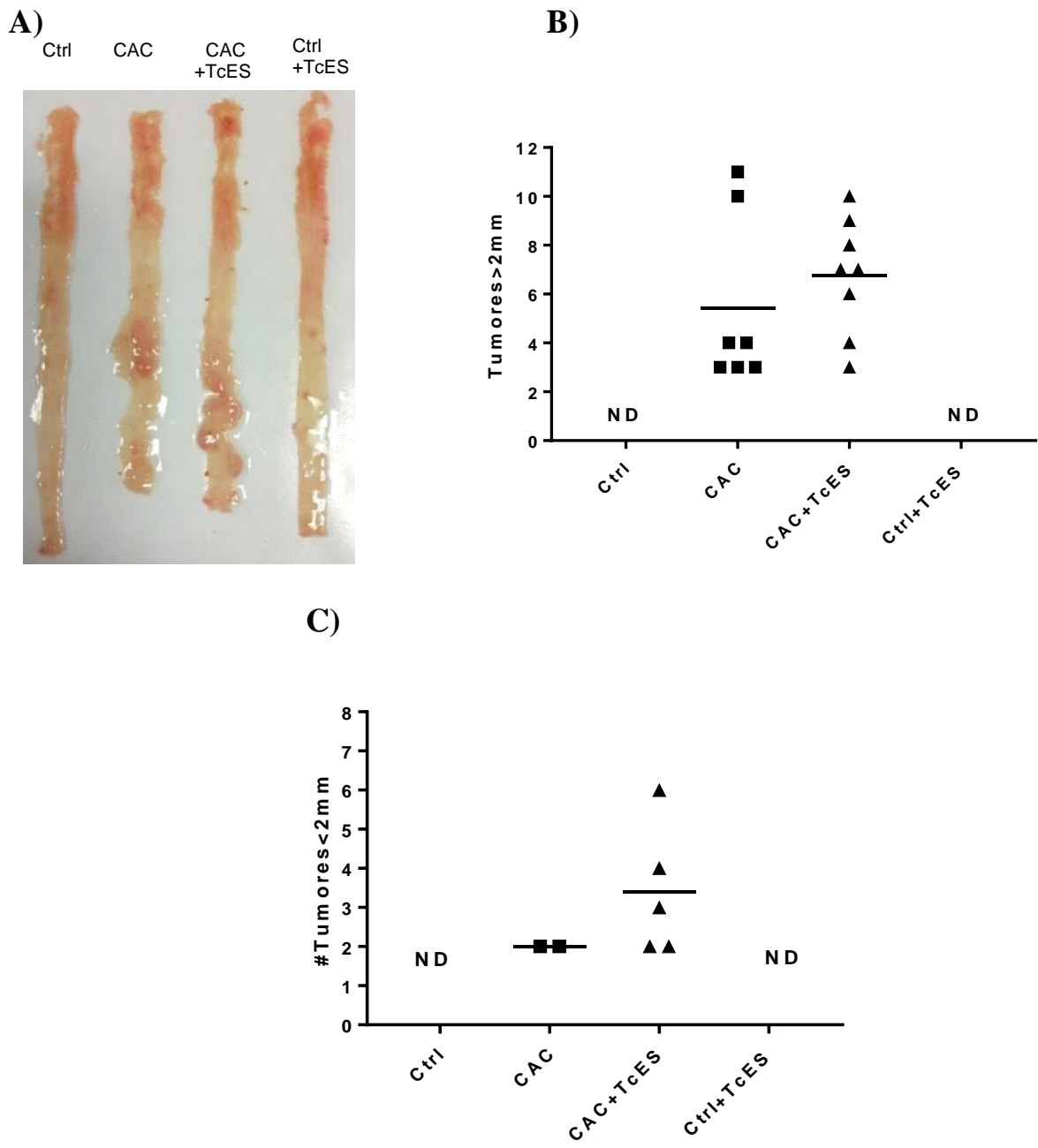
Sacrificamos a los ratones al finalizar el tercer ciclo de inducción al CAC, y les extrajimos el colon (Fig.10 A), lo medimos y observamos que la longitud del colon de los grupos CAC y CAC+TcES disminuyó en comparación con los otros grupos (Fig.10 B), sin embargo, no existen diferencias significativas entre los grupos.





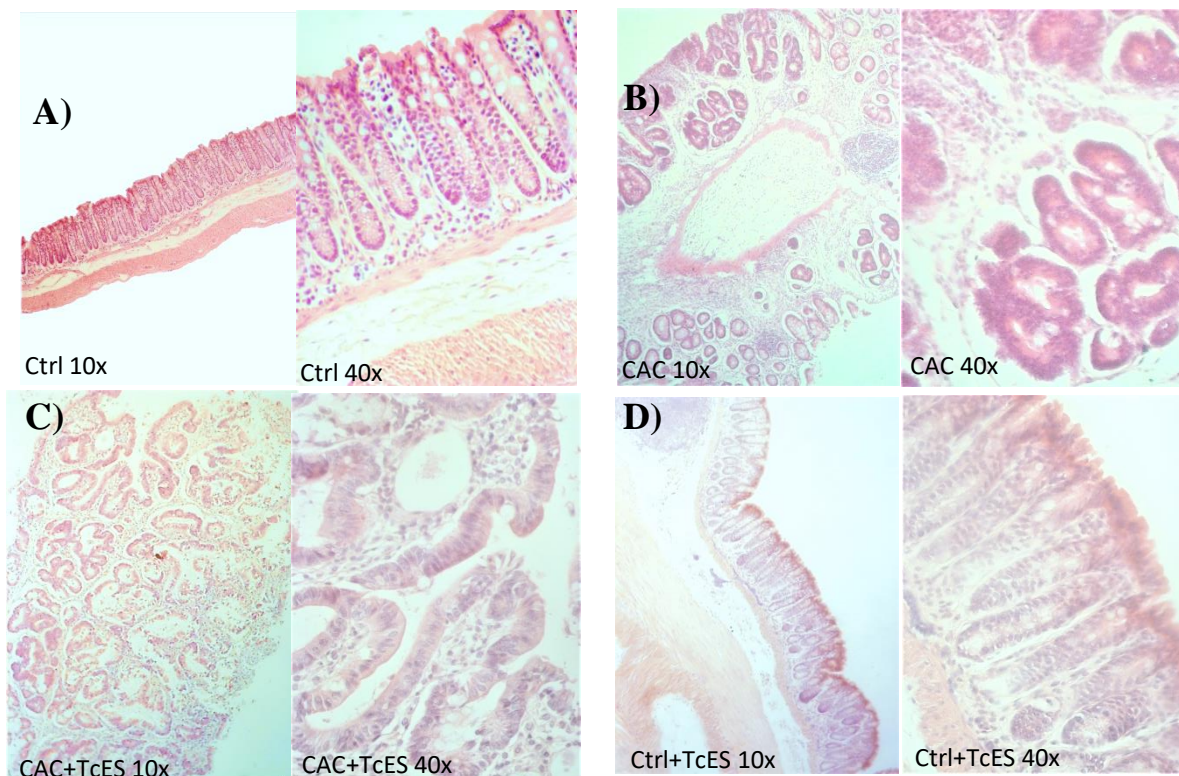
**Fig. 10. No existen diferencias significativas en el tamaño del colon entre los grupos.** A) Imagen representativa del colon de los cuatro grupos experimentales: Ctrl, CAC, CAC+TcES y TcES, medido al momento del sacrificio. B). Gráfica con la longitud del colon de los cuatro grupos experimentales, expresada en centímetros. Datos obtenidos de dos experimentos independientes.

Posteriormente, lavamos el colon y lo cortamos longitudinalmente para exhibir la parte interna donde se pueden visualizar los daños ocasionados por el CAC (Fig.11 A). Encontramos que los grupos CAC y CAC+TcES presentan un número similar tumores mayores a 2 mm (Fig.11 B). En cuanto a los tumores menores a 2 mm, encontramos que el grupo CAC+TcES posee un mayor número de estas formaciones, en comparación con el grupo CAC (Fig.11 C). El grupo Ctrl+TcES, no presenta tumores, por lo que se puede afirmar que el TcES por sí solo no causa daño al colon.



**Fig. 11. El número de tumores mayores a 2 mm es similar entre los grupos CAC y CAC+TcES.** A) Imagen representativa del colon de los cuatro grupos experimentales, el cual fue lavado y cortado longitudinalmente para exponer la parte interna. B) Gráfica que muestra, el número de tumores mayores a 2 mm. C) Gráfica con el número de tumores menores a 2 mm. (ND=No data). Resultados obtenidos de dos experimentos independientes.

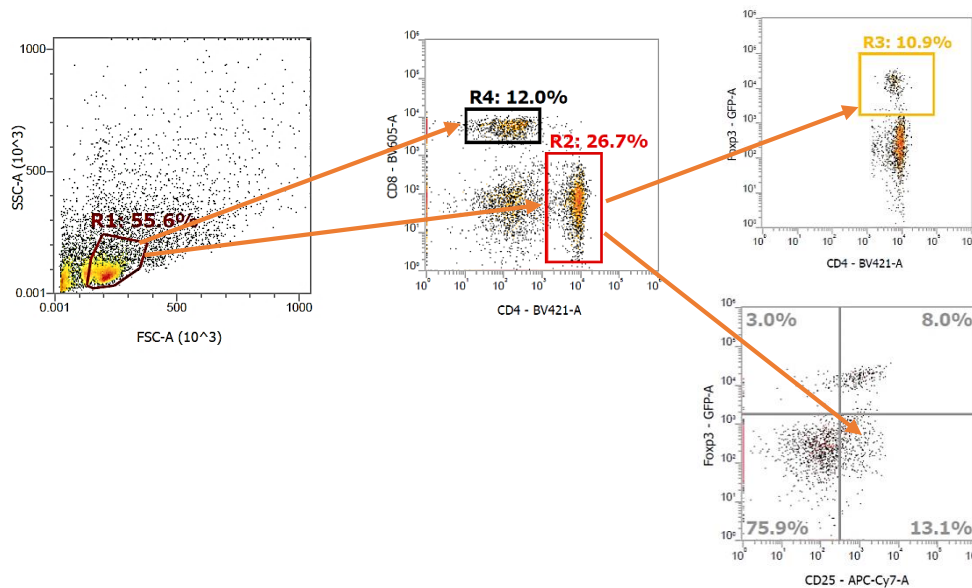
Una vez determinado el daño del colon a nivel macroscópico, analizamos el daño histológico mediante una tinción de hematoxilina y eosina (Fig.12). Encontramos que los grupos Ctrl y Ctrl+TcES, presentan una estructura del epitelio intestinal intacta (Fig.12 A y D), se observan con claridad las criptas de Lieberkühn, se distingue la submucosa y el músculo liso. Por otro lado, en el grupo CAC (Fig.12 B), se observa deformación en el epitelio intestinal, presenta focos de criptas aberrantes y no se observa la capa muscular. En cuanto al grupo CAC+TcES (Fig.12 C), se observa una completa deformación del epitelio intestinal y no se puede diferenciar entre el epitelio, la submucosa y la muscular. Ambos grupos CAC y CAC+TcES, presentan un grado de displasia alto.



**Fig. 12. El epitelio intestinal de los ratones CAC+TcES presenta mayor daño en comparación con los otros grupos.** Imágenes representativas de cortes histológicos de colon de los diferentes grupos Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES, seguidos de una tinción hematoxilina y eosina. A). Colon de ratón control a 10x y 40x. B) Colon de ratón CAC a 10x y 40x. C) Colon de ratón CAC+TcES a 10x y 40x. D) Colon de ratón Ctrl+TcES a 10x y 40x.

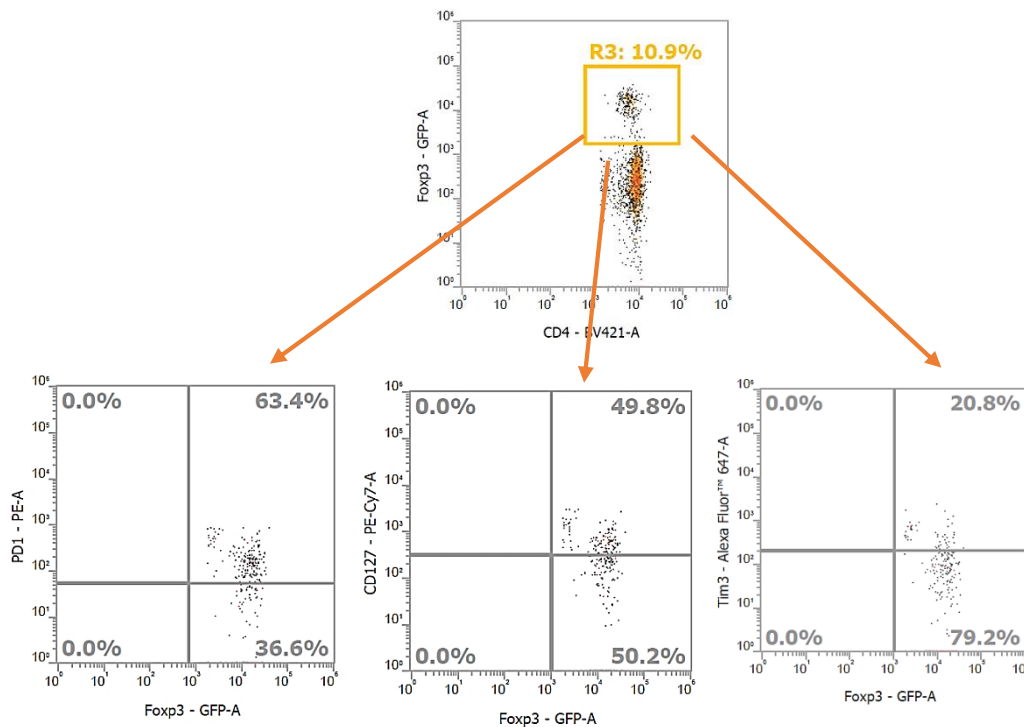
### 5.3 Análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo.

Después de analizar los daños en el colon, analizamos a las poblaciones celulares de Tregs,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  y T activadas, para lo cual en un dot plot de granularidad contra tamaño, se seleccionó la población correspondiente a los linfocitos, los cuales son pequeños y poco granulosos, de esta sección se tomó otro dot plot donde se seleccionaron las poblaciones celulares  $CD4^+$  y  $CD8^+$ . De la sección de los  $CD4^+$  se tomaron dos dot plots más, donde se tomó la región correspondiente a las células Tregs ( $CD4^+Foxp3^+$ ) y otro dot plot que se dividió en cuadrantes para poder visualizar a las células T activadas ( $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ ) y las células Tregs que expresan CD25 ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) (Fig.13).



**Fig. 13. Estrategia de análisis de las poblaciones celulares, Tregs, T activadas,  $CD4^+$  y  $CD8^+$  mediante citometría de flujo. Datos representativos de células de bazo de un ratón control.**

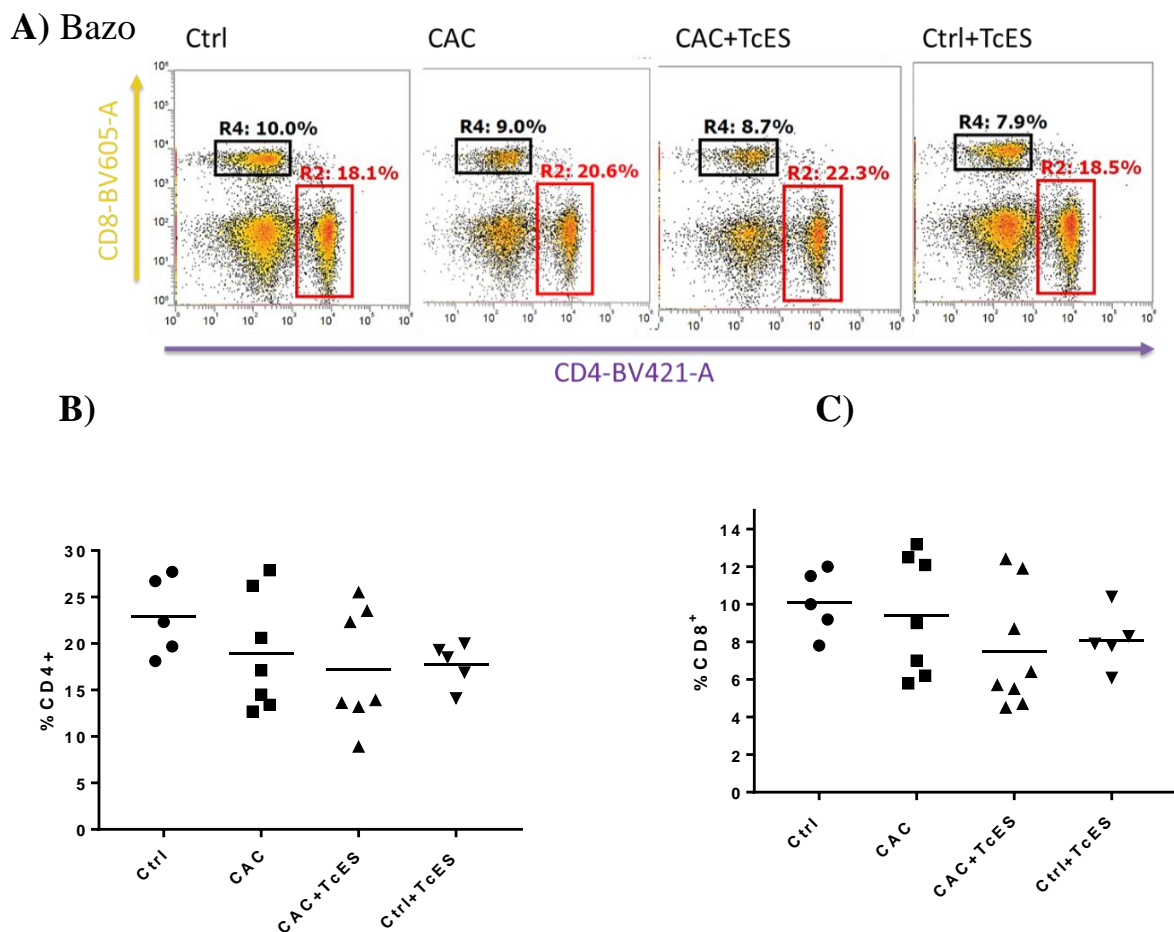
Posteriormente y como ya se mencionó en los objetivos, decidimos analizar las moléculas de activación de las Tregs, PD-1, CD127, y Tim-3. Para lo cual se tomó el dot plot de las Tregs y se realizaron tres dot plots más, los cuales se dividieron en cuadrantes, para poder visualizar el porcentaje de las células Tregs que expresaban las moléculas antes mencionadas (Fig. 14).



**Fig. 14. Estrategia de análisis de las células  $CD4^+Foxp3^+PD-1^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD127^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+Tim3^+$ .** Dot plots representativos de células del bazo de un ratón control.

Para poder comprender lo que estaba ocurriendo a nivel sistémico en el organismo de los ratones, decidimos utilizar células del bazo, ya que en este órgano se lleva a cabo la presentación de antígenos y la activación de las células T (Parham, 2006). Por lo anterior y siguiendo la estrategia de análisis antes mencionada, analizamos el porcentaje de células  $CD8^+$ . Encontramos que el grupo control presenta en promedio 10% de células  $CD8^+$ , en cuanto a los grupos CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES tienden a disminuir su porcentaje, ya

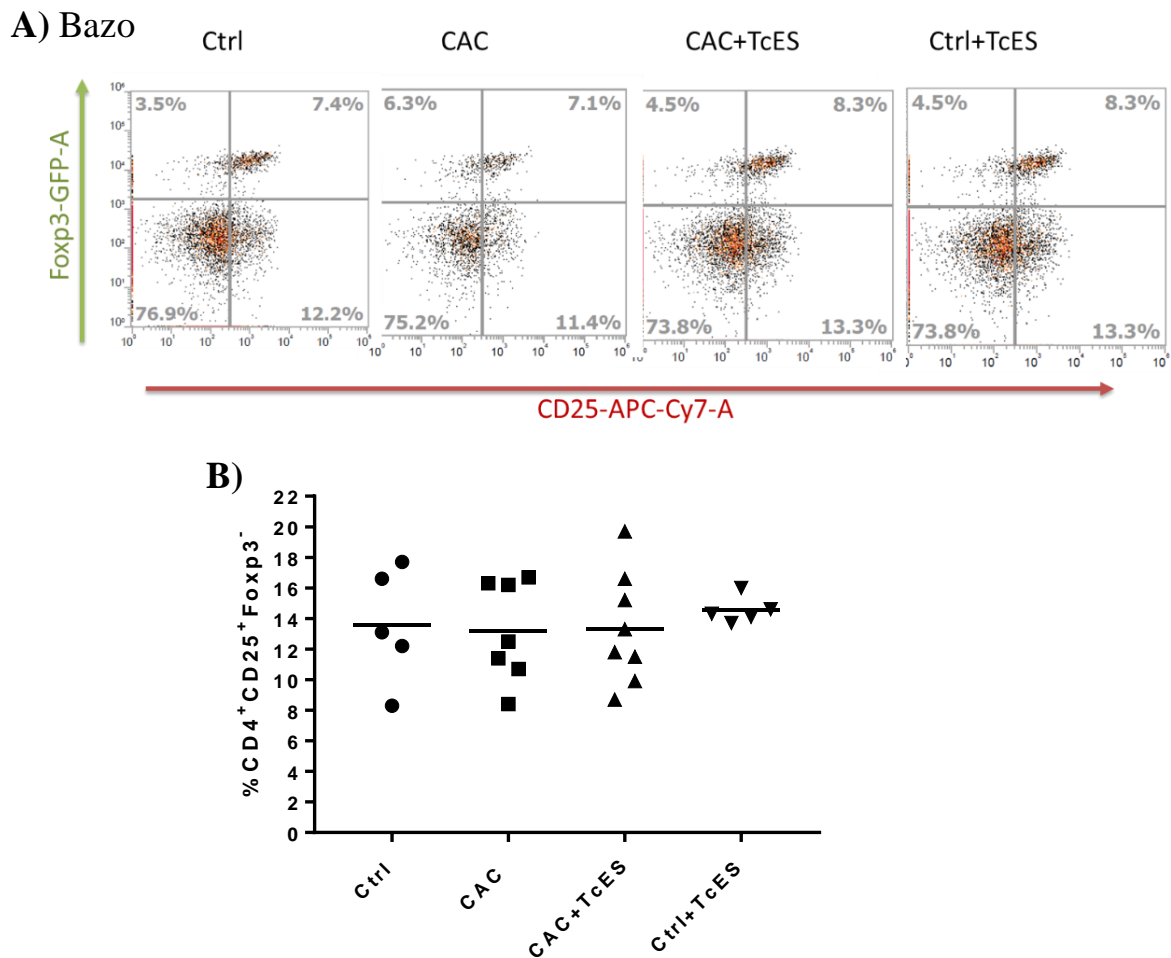
que presentan en promedio 9%, 7% y 8% de células  $CD8^+$  respectivamente, (Fig. 15 B). En cuanto a las células  $CD4^+$  (Fig. 15 C), se observa que el grupo control presenta en promedio 23% de células  $CD4^+$ , y los demás grupos CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES disminuyen su porcentaje; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dos poblaciones celulares.



**Fig. 15. El porcentaje de células  $CD8^+$  y  $CD4^+$  es similar entre los grupos en el bazo.** A) Dot plots representativos de células  $CD8^+$  (recuadro negro) y  $CD4^+$  (recuadro rojo), obtenidas del bazo de los ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) gráfica con el porcentaje de células  $CD8^+$  del bazo de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. C) Gráfica que muestra el porcentaje de células  $CD4^+$  en el bazo de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos de dos experimentos independientes.

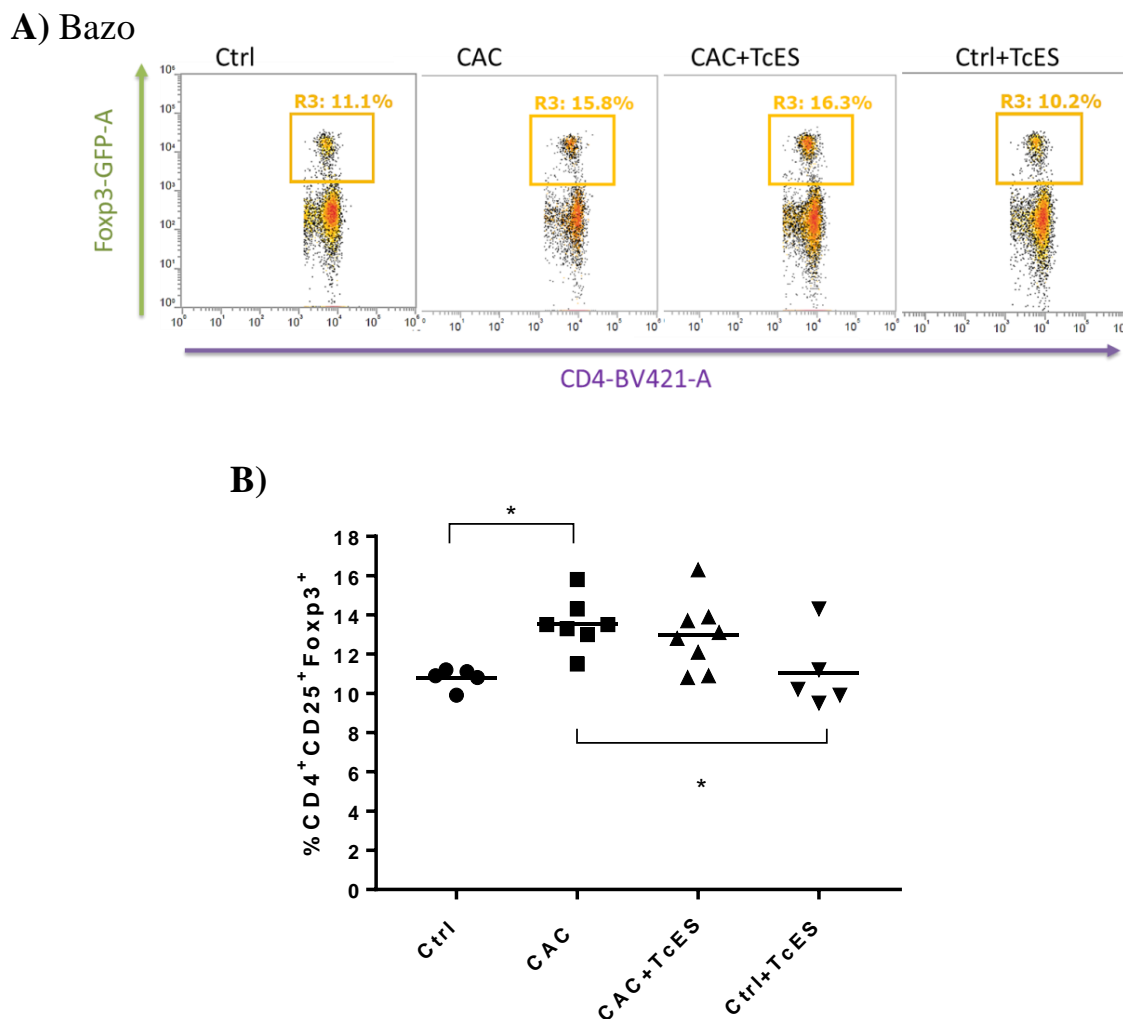


Posteriormente analizamos a las células T activadas ( $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ ), donde encontramos que todos los grupos presentan un porcentaje similar en el bazo, durante el desarrollo del CAC (Fig. 16 B).



**Fig. 16. El porcentaje de células T activadas en el bazo es similar entre los grupos.** A) Dot plots representativos del porcentaje de células T activadas en el bazo de los ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES, obtenidos mediante citometría de flujo. B) Gráfica que muestra el porcentaje de células T activadas en bazo de los grupos Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos de dos experimentos independientes.

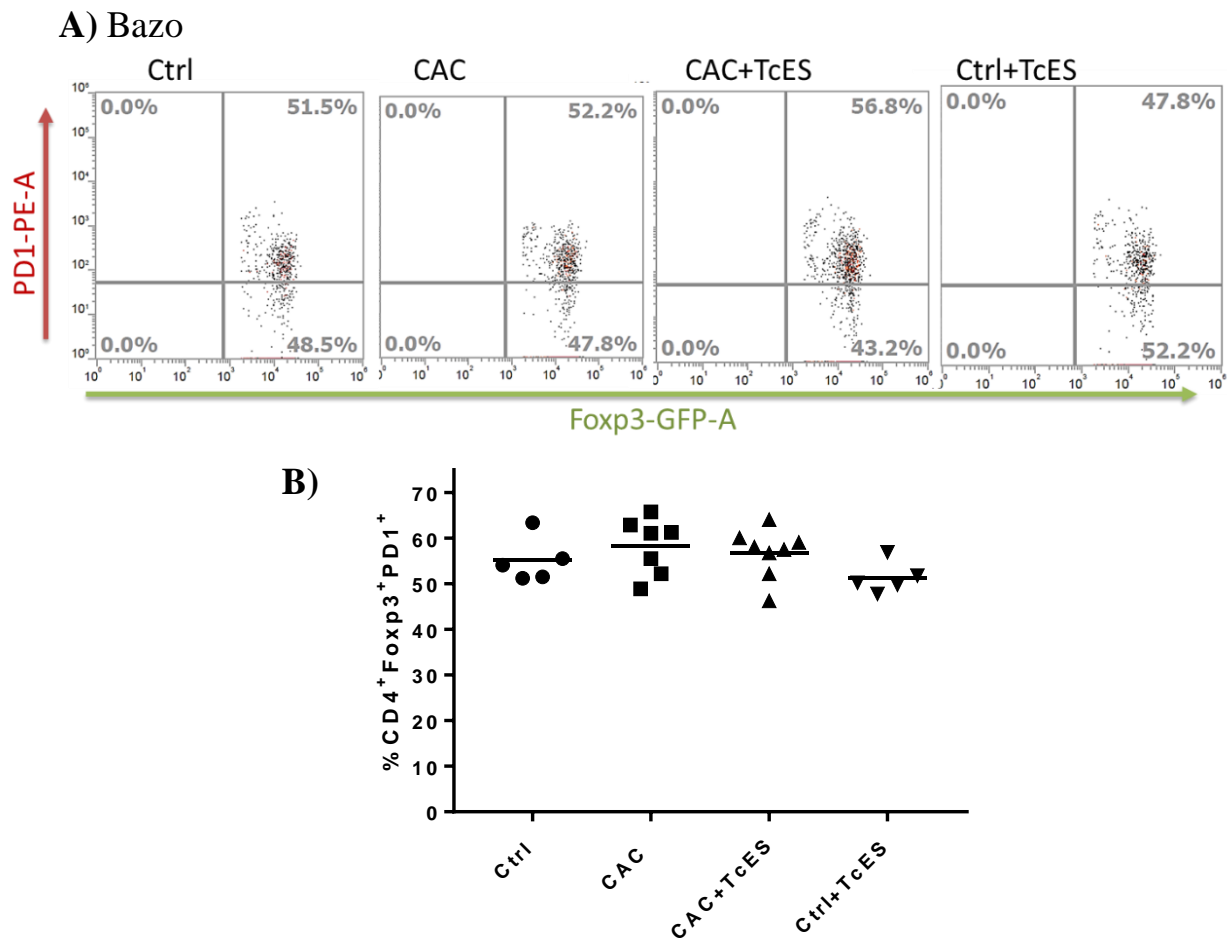
Analizamos el porcentaje de células Tregs en el bazo, donde encontramos que los grupos Ctrl y Ctrl+TcES mantienen un porcentaje de Tregs de alrededor de 10%, mientras que los grupos CAC y CAC+TcES aumentan su porcentaje de manera significativa con respecto a los controles (Fig. 17 B).



**Fig. 17. El porcentaje de células Tregs incrementa en los grupos CAC y CAC+TcES en el bazo.** A) Dot plots representativos de células Tregs obtenidas del bazo de los ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica que representa el porcentaje de células Tregs del bazo de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos de dos experimentos independientes,  $\alpha = 0.05$ .

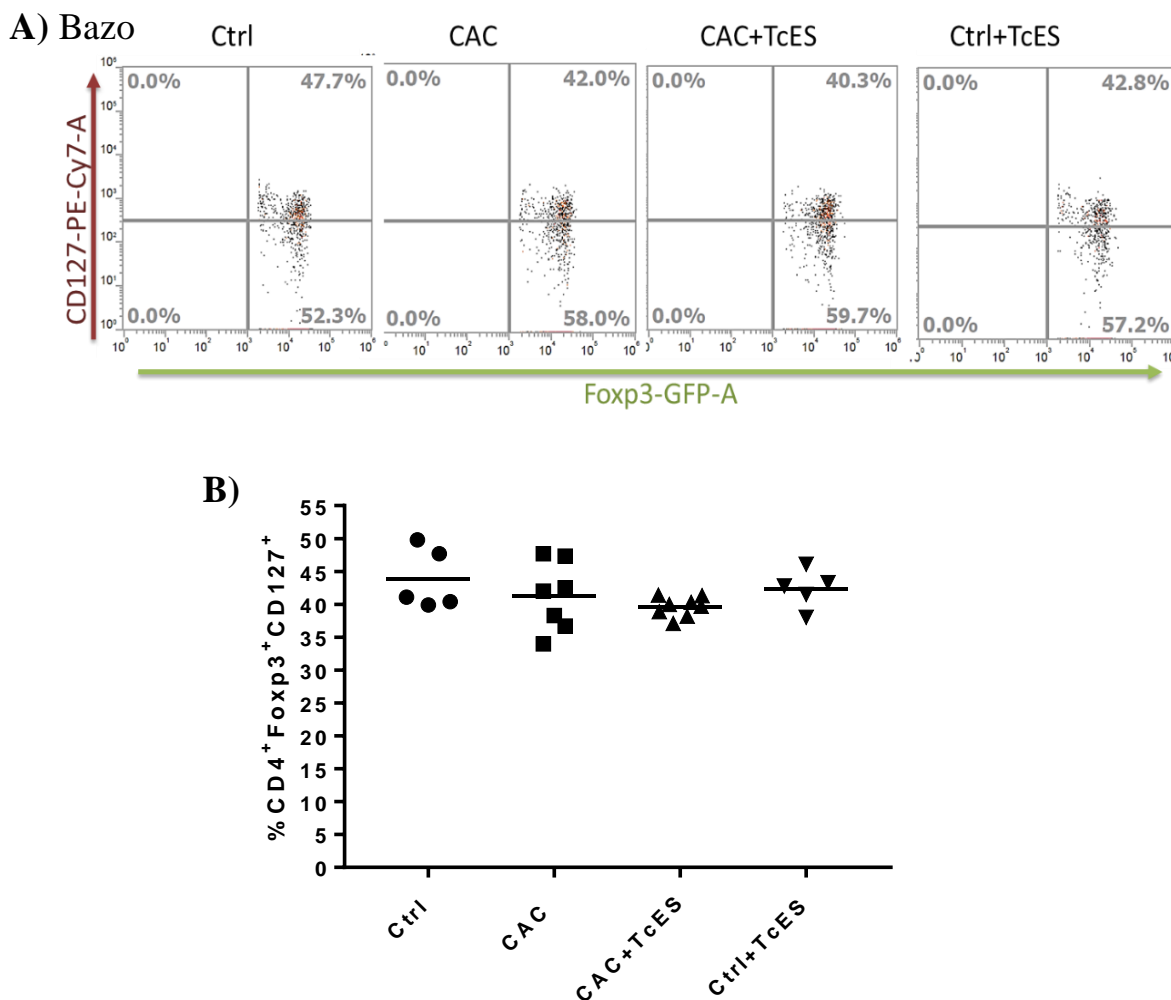


Después de observar el aumento de las células Tregs en los grupos CAC y CAC+TcES, proseguimos a analizar a las células Tregs que expresan PD-1, y encontramos que en el bazo no existen diferencias en el porcentaje de células  $CD4^+Foxp3^+PD-1^+$  entre los grupos (Fig. 18).



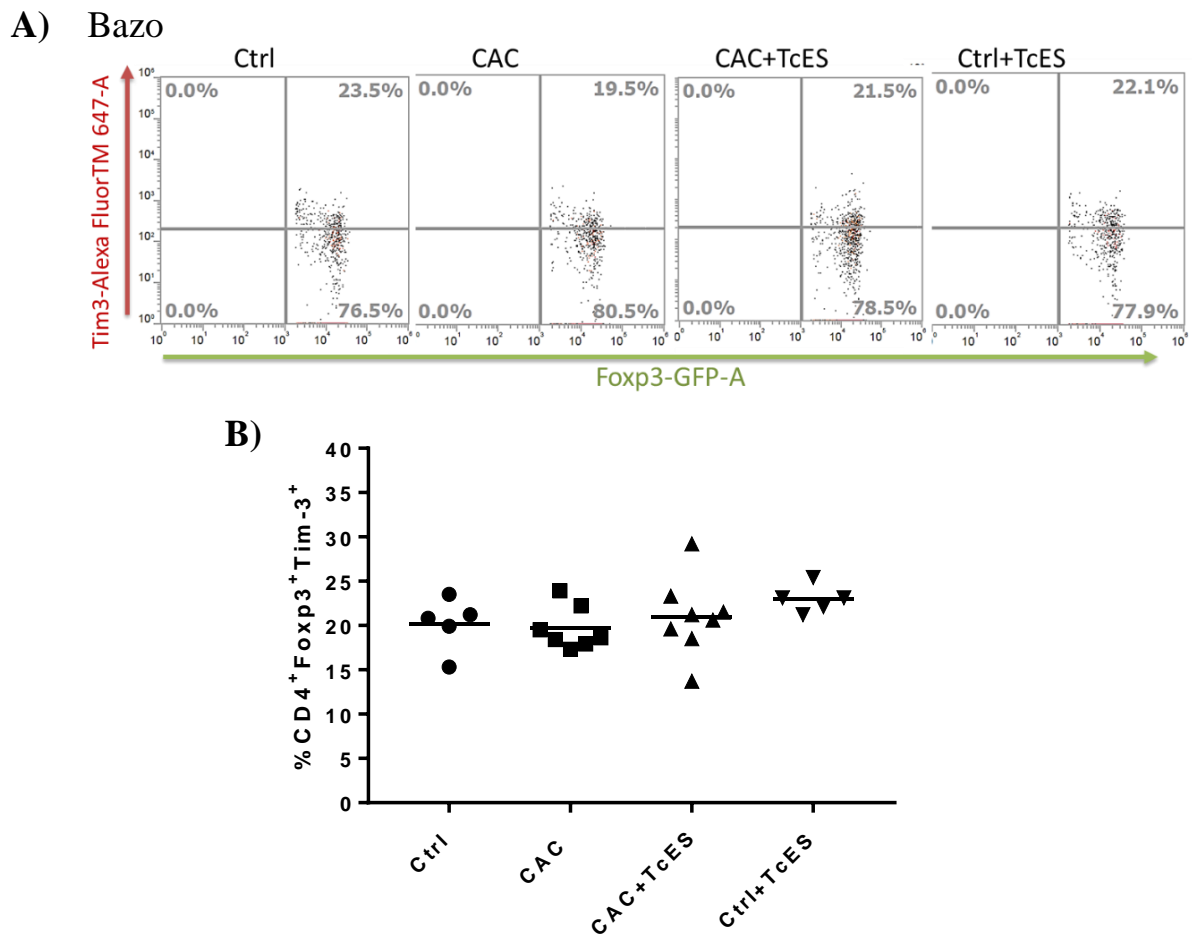
**Fig. 18. El porcentaje de células Tregs que expresan PD-1 en bazo se mantiene homogéneo entre los grupos.** A) Dot plots representativos de células  $CD4^+Foxp3^+PD-1^+$  obtenidas del bazo de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica con los porcentajes de células  $CD4^+Foxp3^+PD-1^+$  del bazo de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos de dos experimentos independientes.

Posteriormente analizamos el porcentaje de células Tregs que expresaban la cadena alfa del receptor de la IL-7 (CD127). Encontramos que en el bazo, estas células mantienen un porcentaje homogéneo en todos los grupos (Fig. 19).



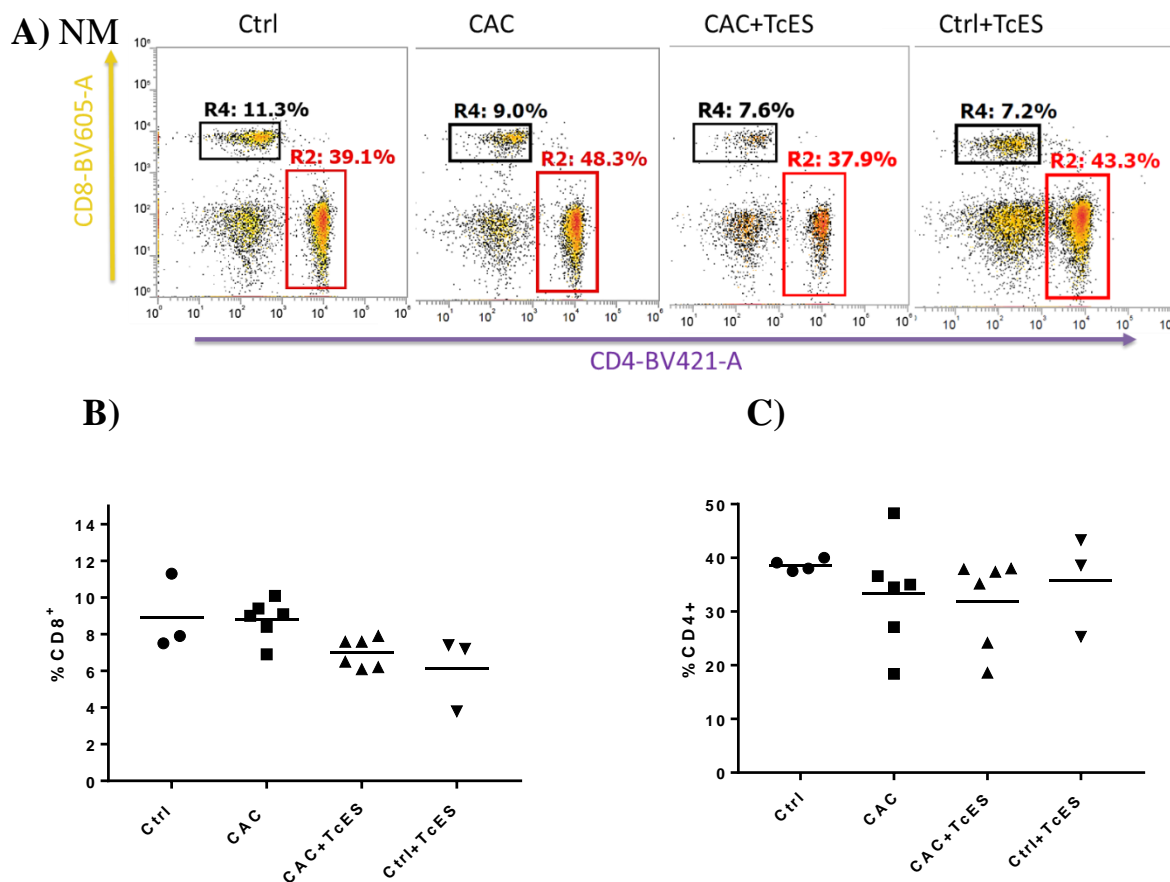
**Fig. 19. El porcentaje de Tregs que expresan CD127 en bazo se mantiene homogéneo en todos los grupos.** A) Dot plots representativos de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> en el bazo de los grupos Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica con el porcentaje de las células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> obtenidas del bazo de los ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos de dos experimentos independientes.

Para finalizar la caracterización de las Tregs en bazo, analizamos el porcentaje de Tregs que expresan la molécula Tim-3, ya que esta molécula se expresa de manera constitutiva en las Tregs naturales. En la gráfica se puede apreciar que el porcentaje de las células Tregs que expresan Tim-3 tienden a aumentar en los grupos CAC+TcES y Ctrl+TcES, sin embargo no existen diferencias significativas (Fig. 20).



**Fig. 20.** El porcentaje de las células  $CD4^+Foxp3^+Tim-3^+$  en bazo es similar entre los grupos. A) Dot plots representativos de células  $CD4^+Foxp3^+Tim-3^+$  obtenidas del bazo de los ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica con los porcentajes de células  $CD4^+Foxp3^+Tim-3^+$  de bazo de los grupos Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos de dos experimentos independientes.

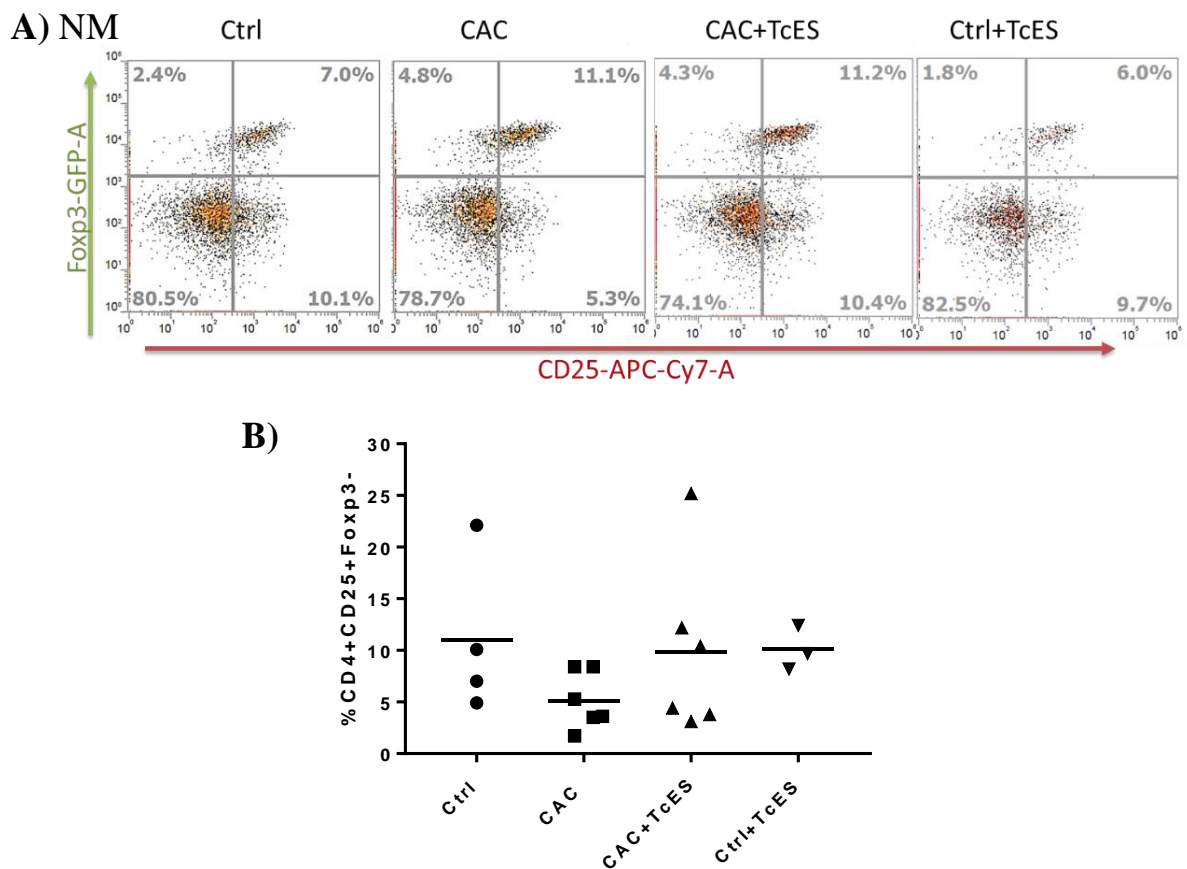
Una vez que caracterizamos las células a nivel sistémico, decidimos analizar las células en un lugar cercano al colon, por lo que analizamos células extraídas de los nódulos mesentéricos (NM). Siguiendo la misma estrategia experimental que con las células del bazo (Fig.13), analizamos a las células CD8<sup>+</sup> (Fig.21), donde encontramos que el porcentaje de estas células disminuye en los nódulos mesentéricos de los grupos CAC+TcES y Ctrl+TcES con alrededor de 7%, en comparación con los otros grupos que presentan alrededor de 9% en el grupo CAC y 11.3% en el grupo control, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (Fig.21 B). En cuanto al porcentaje de células CD4<sup>+</sup> (Fig.21 C), se observa un porcentaje similar en todos los grupos.



**Fig. 21. El porcentaje de células CD8<sup>+</sup> de los grupos CAC+TcES y Ctrl+TcES tiende a disminuir en los nódulos mesentéricos.** A) Dot plots representativos de células CD8<sup>+</sup> (recuadro negro) y CD4<sup>+</sup> (recuadro rojo), obtenidas de los nódulos mesentéricos de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica con el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> obtenidas de nódulos mesentéricos de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. C) Gráfica que

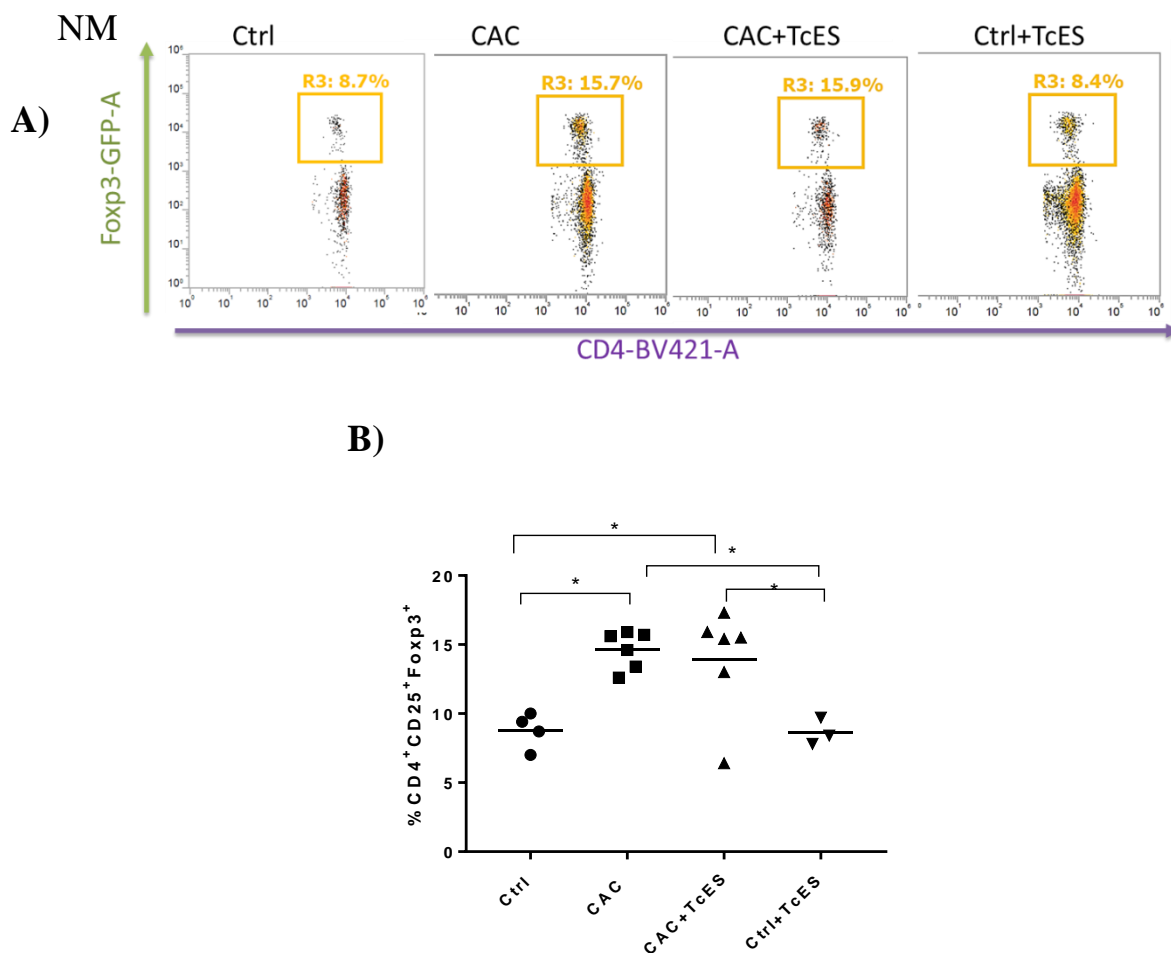
muestra el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> obtenidas de los nódulos mesentéricos (NM) de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos de dos experimentos independientes.

Posteriormente analizamos a las células T activadas (Fig.22), donde observamos que el porcentaje de estas células disminuye en el grupo CAC con alrededor de 5%, mientras se mantiene similar en los grupos Ctrl, CAC+TcES y Ctrl+TcES, con alrededor de 10%, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.



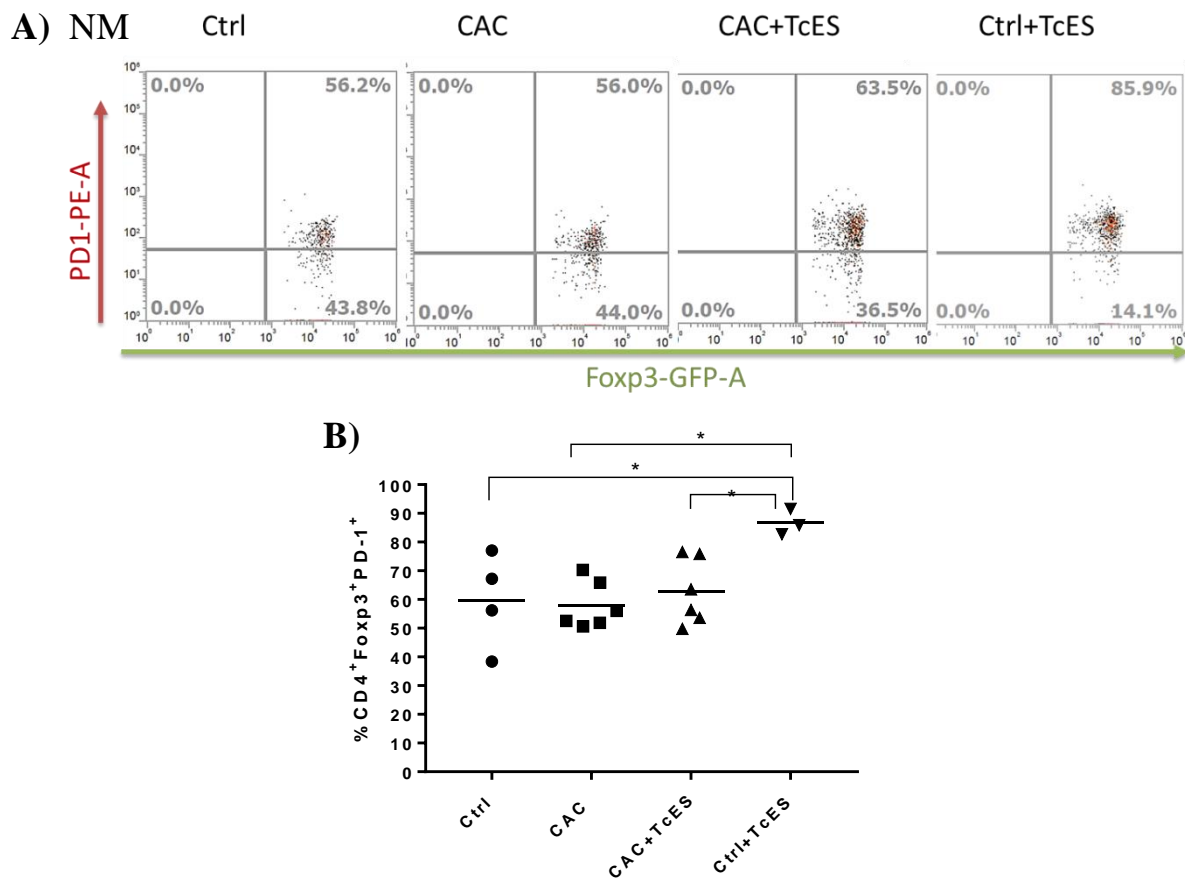
**Fig. 22. El porcentaje de T activadas en nódulos mesentéricos tiende a disminuir en el grupo CAC.** A) Dot plots representativos de las Células T activadas (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>), obtenidas de nódulos mesentéricos de los ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica con los porcentajes de las células T activadas en nódulos mesentéricos de los ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos a partir de dos experimentos independientes.

Posteriormente analizamos el porcentaje de las Tregs en nódulos mesentéricos, donde pudimos observar que los grupos Ctrl y Ctrl+TcES presentan un porcentaje de alrededor de 8% de Tregs, mientras que los grupos CAC y CAC+TcES aumentan significativamente el porcentaje de estas células a alrededor de 15% (Fig.23).



**Fig. 23. El porcentaje de células Tregs en nódulos mesentéricos aumenta en los grupos CAC y CAC+TcES.** A) Dot plots representativos de las células Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) extraídas de nódulos mesentéricos de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica que muestra el porcentaje de las células Tregs de nódulos mesentéricos de los grupos Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos a partir de dos experimentos independientes,  $\alpha = 0.05$ .

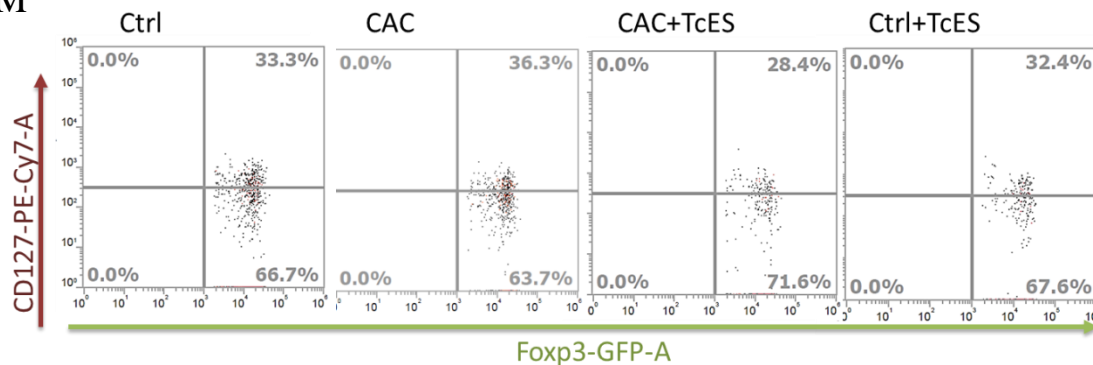
Una vez determinado el porcentaje de Tregs en nódulos mesentéricos, analizamos las moléculas de activación de estas células. Primeramente, analizamos el porcentaje de células Tregs que expresaban la molécula PD-1. Observamos que en el grupo Ctrl+TcES aumentó el porcentaje de manera significativa, obteniendo alrededor de 85%, en comparación con los otros grupos que obtuvieron alrededor de 56% (Fig.24).



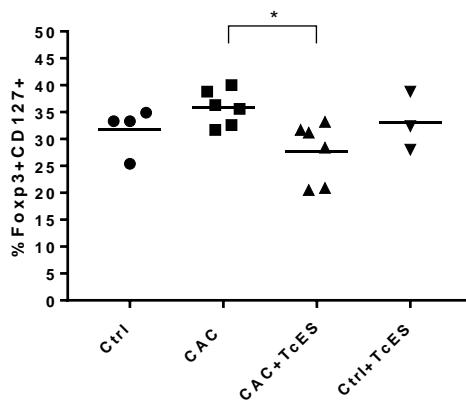
**Fig. 24. El porcentaje de Tregs que expresan PD-1 aumenta en el grupo Ctrl+TcES.** A) Dot plots representativos de las células Tregs que expresan PD-1 ( $CD4^+Foxp3^+PD-1^+$ ), obtenidas de nódulos mesentéricos de los grupos Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica que muestra los porcentajes de las células Tregs que expresan PD-1 en nódulos mesentéricos de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos a partir de dos experimentos independientes,  $\alpha=0.05$ .

La siguiente molécula de activación de las Tregs que analizamos en nódulos mesentéricos, fue CD127. Observamos que los grupos Ctrl y Ctrl+TcES presentan un porcentaje similar de células  $CD4^+Foxp3^+CD127^+$ , con alrededor del 30%, mientras que en el grupo CAC+TcES disminuyó el porcentaje de estas células con alrededor de 28%, en comparación con el grupo CAC que presenta alrededor de 36% (Fig.25).

A) NM



B)

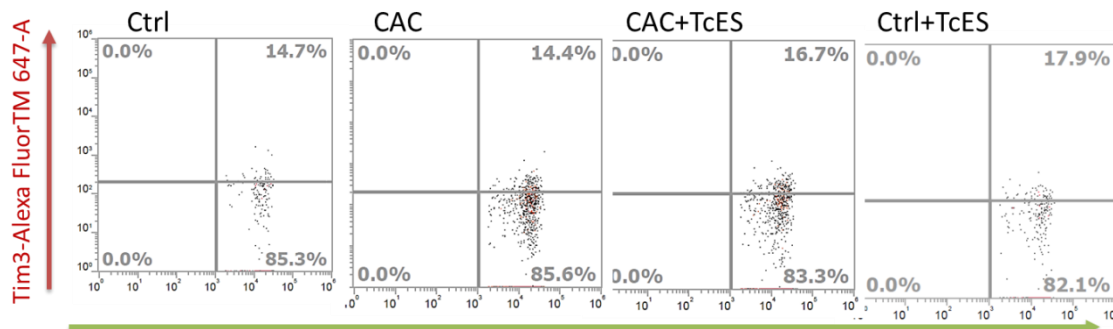


**Fig. 25. El porcentaje de células Tregs que expresan CD127 disminuye en el grupo CAC+TcES en nódulos mesentéricos.** A) Dot plots representativas de células  $CD4^+Foxp3^+CD127^+$  obtenidas de nódulos mesentéricos de los grupos Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica que muestra el porcentaje de células  $CD4^+Foxp3^+CD127^+$  de los nódulos mesentéricos de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos de dos experimentos independientes,  $\alpha=0.05$ .

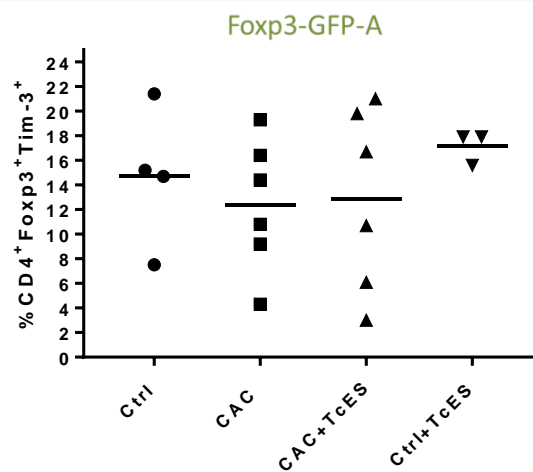


Posteriormente analizamos a las células Tregs que expresaban Tim-3, donde encontramos que no existen diferencias significativas entre los grupos (Fig. 26).

A) NM



B)

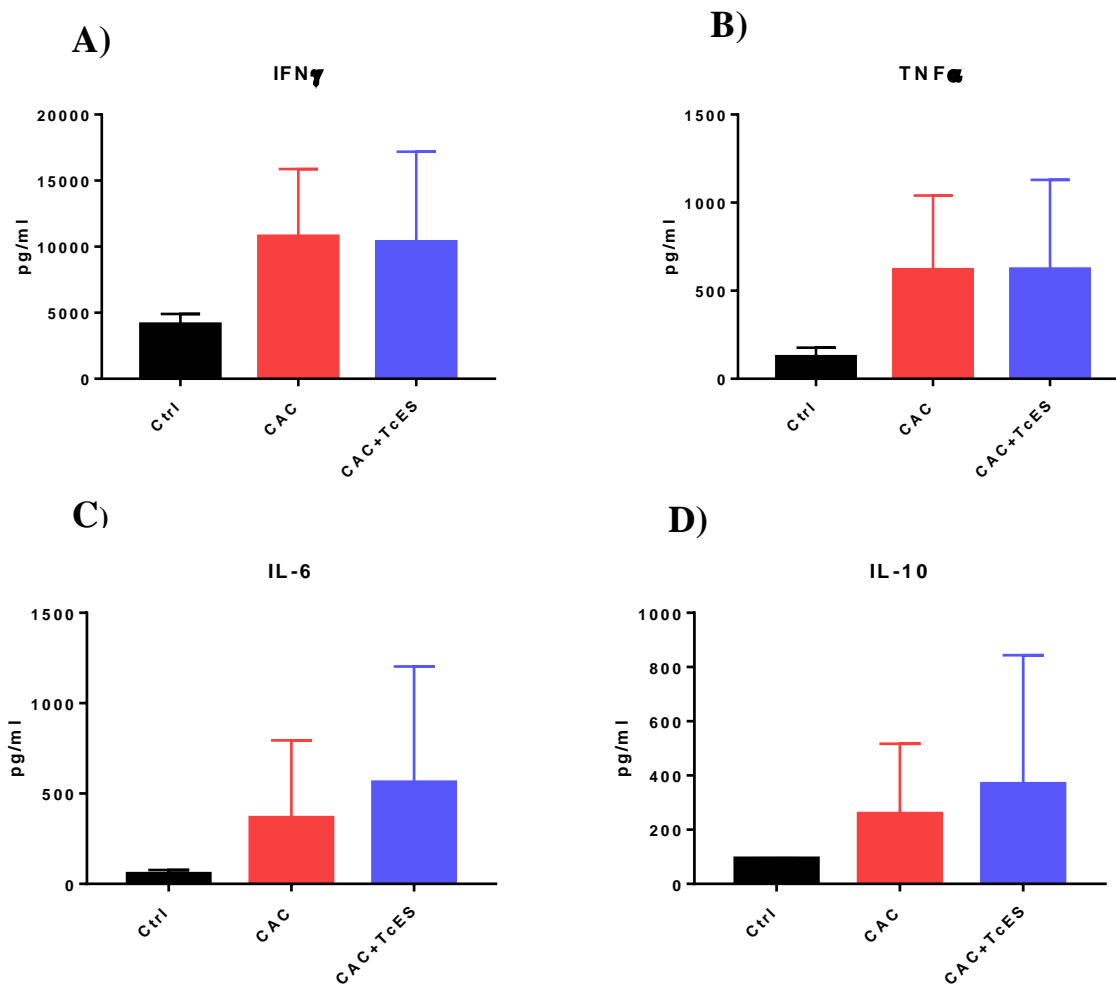


**Fig. 26. El porcentaje de Tregs que expresan Tim-3 es similar entre los grupos en nódulos mesentéricos.** A) Dot plots representativos de células  $CD4^+Foxp3^+Tim-3^+$  obtenidas de nódulos mesentéricos de los grupos Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. B) Gráfica que muestra los porcentajes de células Tregs que expresan Tim-3 obtenidas de nódulos mesentéricos de ratones Ctrl, CAC, CAC+TcES y Ctrl+TcES. Datos obtenidos de dos experimentos independientes.

#### 5.4 Análisis de citocinas de los perfiles Th1, Th2 y Th17.

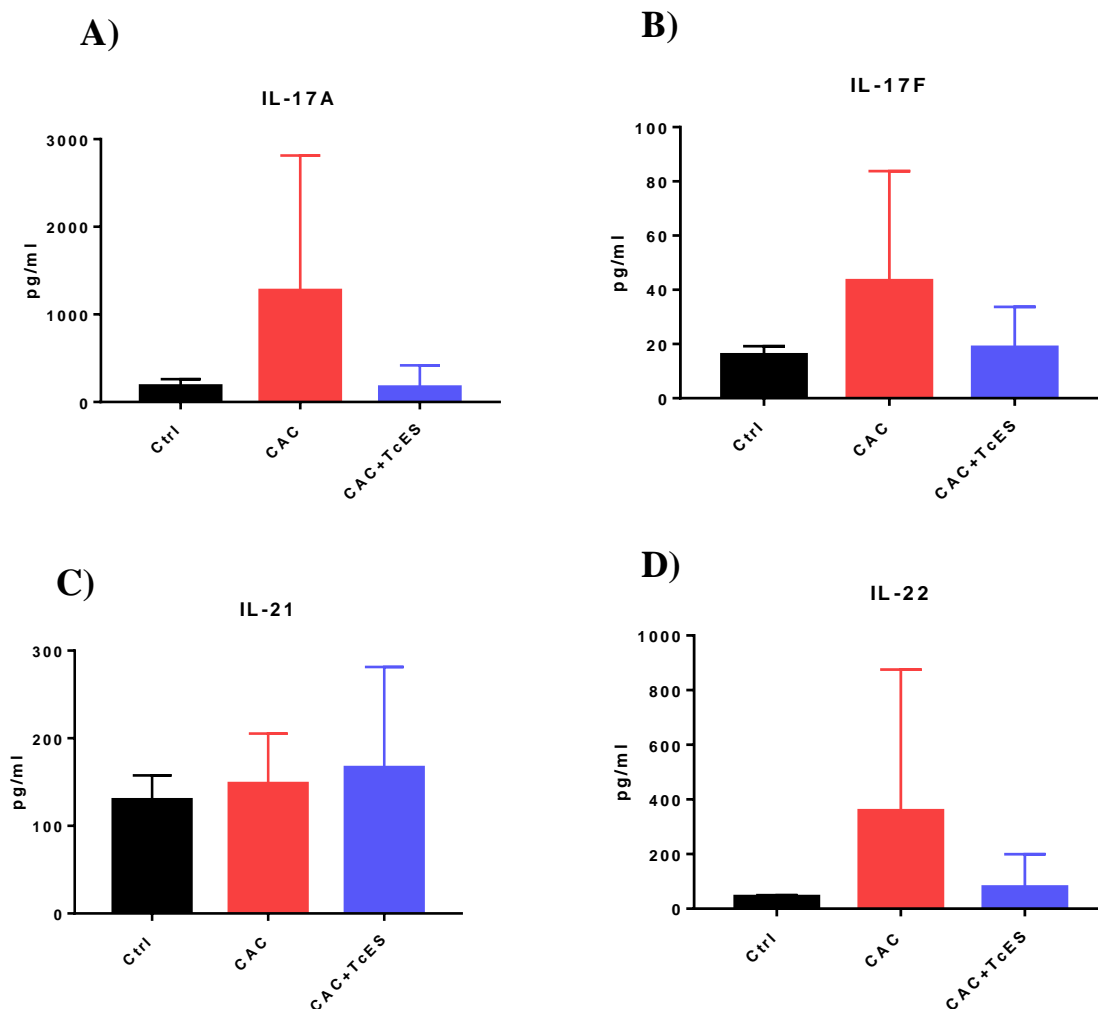
Una vez caracterizadas las células  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  y Tregs, así como sus moléculas de activación, decidimos dilucidar qué tipo de citocinas se encontraban presentes a nivel sistémico, por lo que se realizó la estimulación de células de bazo con  $\alpha$ -CD3, como se describió en materiales y métodos, y analizamos las

citocinas mediante un ensayo de CBA (apartado de materiales y métodos de este trabajo). Encontramos un aumento de citocinas inflamatorias como  $\text{IFN}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$ , así como de la citocina pleiotrópica IL-6 en los grupos CAC y CAC+TcES, en comparación con el grupo control. De igual forma se encontró elevada la IL-10 en estos grupos (Fig. 27).



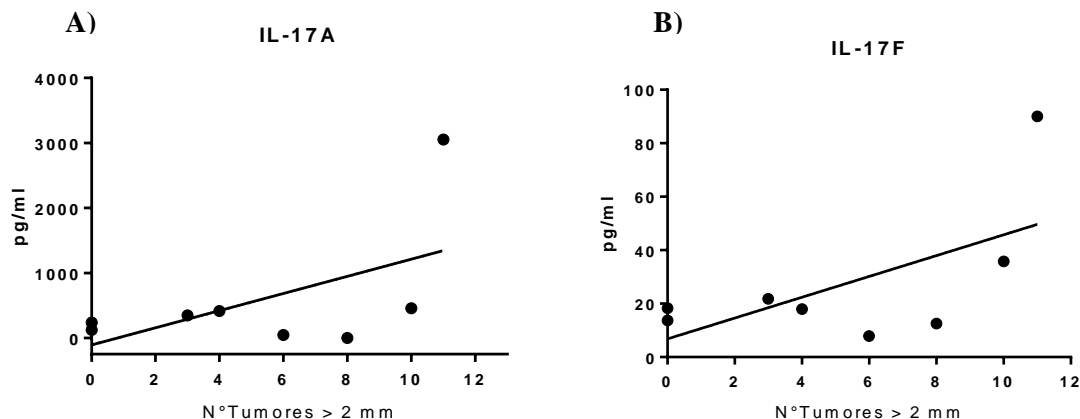
**Fig. 27. Existe un aumento de citocinas inflamatorias en los grupos CAC y CAC+TcES.** A) Concentración de  $\text{IFN}\gamma$ , B) Concentración de  $\text{TNF}\alpha$ , C) Concentración de IL-6, y D) Concentración de IL-10, en el sobrenadante de células de bazo estimuladas con  $\alpha$ -CD3, expresada en pg/ml. Datos obtenidos de un experimento.

Una vez analizadas las citocinas de una respuesta tipo Th1 y Th2, decidimos analizar las citocinas de la respuesta Th17, donde encontramos que la concentración de las citocinas IL-17 A, IL-17F y la IL-22 aumenta en los grupos CAC y no así en los grupos CAC+TcES (Fig. 28).



**Fig. 28. La concentración de las citocinas IL-17A e IL-17F aumenta en el grupo CAC.** Citocinas en el sobrenadante de cultivos de células de bazo estimulados con  $\alpha$ -CD3. A) IL-17 A, B) IL-17 F, C) IL-21 y D) IL-22. Concentración expresada en pico gramos sobre mililitro. Datos obtenidos de un experimento.

Al observar que las citocinas IL-17A e IL-17-F aumentaron en el grupo CAC realizamos una correlación de Pearson, donde encontramos que a mayor número de tumores aumenta la concentración de estas citocinas.



**Fig. 29.** La concentración de citocinas IL-17A e IL-17F aumenta conforme aumenta el número de tumores mayores a 2 mm. A) Concentración de IL-17A. R=0.30. B) Concentración de IL-17F. R=0.38. Concentración expresada en pico gramos por mililitro. Número de tumores obtenido de dos experimentos independientes. Concentración de citocinas obtenidas de un experimento.

## 6. Discusión y conclusiones.

En años recientes se ha observado un incremento en enfermedades inflamatorias y autoinmunes en países desarrollados, lo que se correlaciona con el aumento en las medidas de sanidad. La hipótesis de la higiene sugiere que debido a las medidas de sanidad, el ser humano ha dejado de convivir con organismos potencialmente patógenos, pero en consecuencia, se ha eliminado la posible estimulación del sistema inmune por parte de los organismos patógenos, lo cual induciría homeostasis, de manera indirecta (Rook, 2009). Un ejemplo claro de lo anterior son los parásitos helmintos, que generan una respuesta antiinflamatoria en su hospedero que puede reducir el efecto de enfermedades inflamatorias crónicas (Allen y Maizels, 2011). Distintos grupos de

investigación se han centrado en los parásitos helmintos como una manera de contrarrestar las enfermedades inflamatorias como la colitis o el CAC (Ledesma-Soto et al, 2015; León-Cabrera et al, 2014; Pastille et al, 2017). Como ya se ha mencionado, el desarrollo del CAC es causado por la inflamación donde células del sistema inmune participan en el desarrollo de esta patología (Terzić et al, 2010). Sumado a esto, se ha observado que las células Tregs promueven el desarrollo tumoral en el CAC (Olguín et al, 2018), y que los parásitos helmintos pueden inducir un incremento de las células Tregs (Zepeda et al, 2016). Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue dilucidar si los TcES inducen un incremento en la población de células Tregs, y en consecuencia, exista una reducción de los efectos adversos del CAC.

Primeramente, obtuvimos los TcES y comprobamos su integridad comparando las bandas de proteínas de los dos lotes utilizados, como indica el trabajo realizado anteriormente por Peón en 2017. Por otro lado, iniciamos la inducción del CAC registrando semanalmente el peso, lo cual es un signo de daño asociado al desarrollo de la enfermedad, causada por la diarrea y el sangrado rectal (Tanaka et al, 2003; Pastille et al, 2014; Olguín et al, 2018). Se observó que los ratones del grupo CAC disminuyeron su peso en aproximadamente 10%. Sin embargo, los ratones CAC+TcES mantuvieron su peso durante todo el experimento, lo cual se ha confirmado en otro estudio (Ledesma-Soto et al, 2015), donde a partir de un modelo de colitis inducida con DSS se observó que los ratones infectados con *T. crassiceps* mantuvieron su peso durante la administración del DSS. Lo anterior pareciera indicar un efecto protector por parte de *T. crassiceps* y de los TcES, sin embargo, se requiere confirmar estas observaciones.

En cuanto al tamaño del colon, no observamos diferencias entre los grupos que desarrollaron CAC al finalizar el tercer ciclo de inducción. De igual manera,

observamos que el número de tumores mayores a 2 mm fue similar entre los grupos CAC y CAC+TcES, pero al realizar el conteo de los pólipos presentes en el colon, notamos que el grupo CAC+TcES presentó una mayor cantidad de estas neoplasias. Sumado a esto, al observar los cortes histológicos, el grupo CAC+TcES presentó mayor daño en el colon que el grupo CAC, lo cual contrasta con lo reportado anteriormente, donde la infección con *T. crassiceps* redujo la cantidad de tumores en el colon (León-Cabrera et al, 2014). De manera interesante, nuestros datos concuerdan con otro estudio realizado por Pastille y colaboradores en 2017, donde al infectar a ratones con parásitos helmintos de la especie *Heligmosomoides polygyrus* al inicio de la inducción al CAC, se observó un mayor número de tumores, así como mayor daño histológico en comparación con los ratones a los que no les administraron estos parásitos. Posiblemente las causas de estas discrepancias sean, el uso del parásito total por León-Cabrera et al, mientras que nosotros utilizamos únicamente los TcES; otra posible explicación puede ser el tiempo de administración de los TcES y el tiempo de infección, donde Pastille et al, y León-Cabrera et al, administraron a los parásitos al inicio de la inducción del CAC, en cambio nosotros administramos los TcES durante el segundo ciclo del CAC. También puede deberse a la dosis de los TcES donde administramos 100 µg de TcES, mientras que Pastille et al, usaron 200 larvas de *H. polygyrus*, y León-Cabrera et al, que utilizaron 20 metacéstodos de *T. crassiceps*. Todo esto parece confirmar que se requiere de una dosis específica de TcES para lograr un efecto sobre el número de tumores, pero, como se mencionó anteriormente, se requiere realizar más experimentos para aclarar estas observaciones.

Al analizar las poblaciones de células T en el bazo, observamos que las células Tregs aumentan en los grupos CAC y CAC+TcES, mientras que se observa una disminución del porcentaje de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los grupos

CAC+TcES y Ctrl+TcES, esta tendencia se repite en los NM. El incremento del porcentaje de las células Tregs, y la disminución de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los grupos con CAC, concuerda con lo que se ha descrito anteriormente, donde las células Tregs promueven el desarrollo tumoral, ya que suprimen a células con actividad antitumoral, como lo son las células CD8<sup>+</sup> (Pastille et al, 2014; Olgúin et al, 2018). Sumado a esto, Pastille y colaboradores en 2017 reportan que la infección con *H. polygyrus* en la etapa inicial del CAC, aumentó el porcentaje de células Tregs en NM, y también observaron una disminución de las células CD8<sup>+</sup> en la lámina propia del colon. Sin embargo, en el grupo Ctrl+TcES observamos una tendencia a disminuir el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, pero no observamos un aumento de las células Tregs. Otros grupos de investigación han descrito que la infección con *T. crassiceps* y la administración de productos solubles derivados de este parásito, disminuyen la proliferación de células T *in vitro*, y reducen el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el peritoneo (Sciutto et al, 1995; Zepeda et al, 2010). Asimismo, la infección con *T. crassiceps* o la administración de sus TcES, reclutan a poblaciones celulares reguladoras como los MAAs y las células mieloides supresoras (MDSCs), ambas poblaciones celulares poseen la capacidad de suprimir a las células T (Allen y Maizels, 2011; Reyes et al, 2009; Peón et al, 2013). Nuestros datos sugieren que los TcES promueven la disminución de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y debido a que no observamos un aumento en el porcentaje de células Tregs, sugerimos que probablemente, los TcES reclutaron a otras poblaciones reguladoras como los MAAs o las MDSCs, por lo tanto, sería necesario realizar más experimentos donde se incluya el análisis de estas células para poder confirmar esta hipótesis.

En cuanto a las células T activadas, observamos que disminuyeron su porcentaje en el grupo CAC en los NM, lo que concuerda con lo descrito anteriormente,

donde al aumentar el porcentaje de Tregs disminuye el porcentaje de células T activadas. Esto se debe posiblemente a la alta capacidad supresora de las células Tregs, ya que se ha observado que durante el CAC, las células Tregs suprimen de manera más eficiente a las células CD4<sup>+</sup> en comparación con las Tregs provenientes de ratones sanos (Olguín et al, 2018). Pastille y colaboradores en 2014 observaron que las células CD4<sup>+</sup> reducen su capacidad para producir IFN- $\gamma$  *in vitro* cuando se ponen en contacto con células Tregs provenientes de pacientes con cáncer de colon. Para corroborar estos hallazgos, sería necesario realizar ensayos de inhibición de células Tregs con células CD4<sup>+</sup> provenientes de ratones con CAC+TcES, y se evaluaría la producción de IFN- $\gamma$ , lo que aclararía si las células Tregs inhiben la producción de IFN- $\gamma$ .

Con respecto al análisis de las moléculas de activación de las células Tregs, observamos un aumento en la expresión del receptor PD-1 en el grupo Ctrl+TcES en NM, y una disminución de la molécula CD127 en el grupo CAC+TcES en NM. La expresión de PD-1 por parte de las células Tregs les confiere una mayor capacidad supresora (Francisco et al, 2009), incluso se ha descrito que PD-1 y su ligando PDL-1 pueden cambiar a las células Th1 hacia células Tregs (Amarnath et al, 2011) y que PD-1 regula la generación de células iTregs (Wang et al, 2008). Además, las infecciones por helmintos también promueven el aumento de células tanto nTregs como iTregs (Taylor et al, 2011; Finlay et al, 2014). Por su parte, CD127 es la cadena alfa del receptor de la IL-7 y se ha descrito que este receptor se sobreexpresa en iTregs (Gratz et al, 2013; Gratz y Cambell, 2014). De acuerdo a nuestros hallazgos y basándonos en la literatura, se podría decir que el aumento de las células Tregs que expresan PD-1, se debe a que están siendo inducidas por la administración de los TcES. Sin embargo, la disminución del porcentaje de células Tregs que expresan CD127 en el grupo CAC+TcES, puede indicar que en este grupo se encuentran



involucradas nTregs y no iTregs, lo que posiblemente se deba a que tanto el CAC como los TcES indujeron respuestas inmunológicas distintas al mismo tiempo. Sugerimos realizar más experimentos con estas células, para poder dilucidar sus mecanismos de acción y su origen, ya sea natural o inducido. Una solución podría ser separar a estas dos poblaciones de células Tregs, utilizando los marcadores para nTregs  $CD4^+CD25^+Foxp3^+CD127^{Low}$  y para las iTregs  $CD4^+CD25^+Foxp3^+CD127^{high}$ , y evaluar la expresión de PD-1 en estas poblaciones celulares. Seguido a esto, se analizaría la capacidad supresora de estas células, mediante ensayos de supresión, para determinar si la administración de los TcES induce células Tregs.

Seguidamente, analizamos a las células Tregs que expresaban Tim-3, la cual es una molécula transmembranal expresada constitutivamente en las células Tregs después de activarse, y por otro lado induce la muerte de células Th1 (Monney et al, 2002). En nuestro modelo observamos que las células Tregs de cualquier grupo experimental expresan Tim-3, tanto en el bazo como en nódulos mesentéricos, pero no encontramos un aumento o una disminución entre los grupos. Sakuishi y colaboradores en 2013 encontraron que más del 50% de las células Foxp3 infiltradas en los carcinomas de la línea CT26 de cáncer de colon expresan Tim-3, y contrariamente en la sangre, bazo y nódulos mesentéricos Tim-3 se expresa en cantidades bajas; además observaron que las células Tregs que expresan Tim-3 poseen mayor capacidad supresora, ya que secretan mayores niveles de perforina y granzima. Mientras que Tim-3 les confiere una mayor actividad supresora a las Tregs, la presencia de Tim-3 en los linfocitos  $CD8^+$  se ha descrito como un marcador de anergia, junto con PD-1 (Zhou et al, 2011), y al realizar el bloqueo de ambos se detiene el progreso tumoral (Sakuishi et al, 2010). Por lo tanto, una posibilidad es analizar a las células

Tregs que expresan Tim-3 directamente en los tumores, así como analizar la expresión de Tim-3 en las células CD8<sup>+</sup>.

Cuando analizamos a las citocinas presentes en el sobrenadante de células del bazo estimuladas con  $\alpha$ -CD3, observamos un incremento de citocinas inflamatorias como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los grupos CAC y CAC+TcES, lo cual concuerda con lo descrito anteriormente, donde en el modelo de CAC así como en pacientes con cáncer de colon se observan altas concentraciones de estas citocinas, las cuales son conocidas por promover el desarrollo tumoral (Terzić et al, 2010; León-Cabrera et al, 2014; Pastille et al, 2014), aquí observamos que la administración de 100  $\mu$ g de TcES no tuvo ningún efecto sobre la producción de estas citocinas, lo cual podría indicar que se requiere de una dosis más alta de TcES para poder observar algún cambio.

Además de observar un perfil de citocinas inflamatorio en los grupos con cáncer, observamos un aumento de la citocina antiinflamatoria IL-10 en los grupos CAC y CAC+TcES. Esto se ha observado en trabajos realizados anteriormente donde en la fase final del CAC, se presentan niveles elevados de esta citocina (Pastille et al, 2014; Olguín et al, 2018). La IL-10 es importante para la función supresora de las Tregs (Fassbender et al, 2010) y debido a que la IL-10 es una citocina que puede disminuir respuestas inflamatorias, Pastille y colaboradores en 2014, utilizaron ratones deficientes de IL-10 y observaron un mayor avance del CAC en comparación con los ratones normales. De igual modo, se ha reportado que la IL-10 es esencial en el rol protector que ejercen los helmintos contra enfermedades inflamatorias como la colitis (Hunter et al, 2005), y se ha reportado que *T. crassiceps*, así como la inyección de sus productos excretados aumentan la producción de IL-10 (Zepeda et al, 2010). Tomando estos datos en conjunto, podríamos sugerir que la IL-10 se eleva durante el CAC como una forma de contrarrestar la inflamación, sin embargo,

su presencia lleva a un estado tolerogénico, lo cual se puede apreciar en nuestros resultados donde encontramos un porcentaje aumentado de las células Tregs en los grupos con CAC. A pesar de que existe evidencia de que los helmintos incrementan la producción de la IL-10, nosotros no observamos un cambio significativo en esta citocina. Posiblemente requerimos administrar una dosis más alta de TcES para encontrar diferencias.

Posteriormente, analizamos a las citocinas del perfil Th-17. Observamos que en el grupo CAC+TcES la IL-6 aumentó, mientras que las citocinas IL-17A e IL-17F se mantuvieron bajas. Las células Th-17 se diferencian a partir de células CD4<sup>+</sup> naive que entran en contacto con la citocina IL-6 y con el TGF- $\beta$ , lo que induce la activación de los factores de transcripción ROR $\gamma$ t y ROR $\alpha$ , los cuales determinan la diferenciación hacia el linaje Th17, y una vez activadas, secretan IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (Kimura y Kishimoto, 2010; Kolls y Lindén, 2004; Yang et al, 2008). León-Cabrera y colaboradores en 2014, reportaron que la infección con *T. crassiceps* disminuye la concentración de IL-6 durante el CAC, lo cual contrasta con nuestros resultados; sin embargo, esta diferencia puede deberse a que nosotros no utilizamos la infección de *T. crassiceps* sino los TcES. En cuanto a la disminución de la IL-17A e IL-17F, se ha demostrado que los parásitos helmintos influyen en la concentración de IL-17. La infección con *H. polygyrus* inhibe la producción de IL-17 en la lámina propia (Elliot et al, 2008); de igual manera la inyección intraperitoneal de productos derivados de *Hymenolepis diminuta*, disminuyen los niveles de IL-17, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , contrarrestando los efectos de la colitis experimental (Reyes et al, 2016). De manera semejante, la administración de los TcES en un modelo de EAE, disminuye la concentración de IL-17 en cultivos de células de bazo en consecuencia de la respuesta antiinflamatoria que inducen los TcES, lo que provoca la activación de células Th2 productoras de citocinas antiinflamatorias

como la IL-10 e IL-4 (Peón, 2017; Serrano, 2009). De acuerdo a nuestros hallazgos, sugerimos que los TcES podrían estar induciendo una respuesta antiinflamatoria, la cual impediría la activación de células Th17, lo que se ve reflejado en la disminución de las citocinas pertenecientes a este perfil. Para corroborar lo anterior, proponemos incluir en nuestros análisis a la citocina IL-4. Asimismo, analizar la citocina TGF- $\beta$ , ya que, como mencionamos anteriormente, el TGF- $\beta$  junto con la IL-6, es necesaria para la diferenciación de las células Th17.

Finalmente realizamos una correlación de Pearson entre la cantidad de tumores y los niveles de IL-17, y observamos una correlación positiva, donde a mayor cantidad de tumores aumenta la concentración de IL-17A e IL-17F. La IL-17 parece ser de gran importancia en el modelo de CAC, ya que Hyun y colaboradores en 2012, utilizaron ratones deficientes de IL-17A y observaron que estos ratones desarrollaban menos tumores y registraban menores cantidades de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . De igual manera, se ha encontrado que pacientes con cáncer de colon que poseen células Th17 infiltradas en los tumores, registran una menor sobrevida que aquellos que presentan un perfil inflamatorio Th1 (Su et al, 2010; Tosolini et al, 2011). Lo anterior concuerda con nuestros resultados, ya que observamos que la IL-17A, IL-17-F y la IL-22 se encontraron elevadas en los grupos con CAC. Nuestros resultados sugieren que existe una relación entre la IL-17 y la progresión tumoral en el modelo murino de CAC y, sumado a que los TcES impidieron la producción de las citocinas del perfil Th17, los TcES podrían ser utilizados para disminuir el progreso tumoral. Sin embargo, se requiere evaluar el efecto de los TcES sobre las citocinas del perfil Th17 con mayor profundidad en otros órganos como en los NM, el colon, y directamente en los tumores.

En el presente estudio administramos 100  $\mu\text{g}$  de TcES al inicio del segundo ciclo del CAC, y no observamos un efecto sobre el porcentaje y la activación de las células Tregs, lo cual puede deberse a la dosis y el tiempo de administración de los TcES. Pelly y colaboradores en 2017, observaron que se puede reducir el porcentaje de células Tregs mediante la infección secundaria con helmintos, lo que convierte a las células Tregs en células T efectoras productoras de IL-4. Pastille y colaboradores en 2017, indican que la respuesta inmune varía dependiendo de la etapa en la que se realiza la infección con helmintos, y esto tiene un efecto en la progresión tumoral. Por otra parte, en un modelo de EAE utilizando 250  $\mu\text{g}$  de TcES, se observó una respuesta antiinflamatoria alta, donde la IL-17 disminuyó en comparación con los ratones a los que no se les suministraron los TcES (Peón et al, 2017). Esto es interesante porque a pesar de que utilizamos una dosis baja de TcES parece que estos productos influyen más en las células del perfil Th17 que en las células Tregs. En adición a esto, la cantidad de lesiones poliposas que presenta el grupo CAC+TcES, nos hace pensar que la modulación del CAC depende de otros mecanismos más allá del paradigma Th1-Th2, y en donde incluimos a las células Th17, lo cual es útil para tratar enfermedades autoinmunes, inflamatorias e incluso enfermedades parasitarias (Serrano, 2008; Fuss, 2008; Nutman, 2015).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, podemos concluir que la administración intraperitoneal de 100  $\mu\text{g}$  de TcES no tiene efecto en el porcentaje y la activación de las células Tregs, sin embargo, la tendencia a disminuir que se observa en las células  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  podría deberse a que los TcES activaron a otras células supresoras como los MAAs o las MDSCs. La dosis de 100  $\mu\text{g}$  de TcES, tampoco genera cambios en el número de tumores mayores a 2 mm, ni en la concentración de citocinas inflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF-

$\alpha$ . Sin embargo, los TcES incrementaron la producción de IL-6 y evitaron la producción de IL-17A, IL-17F e IL-22, lo cual sugiere fuertemente que los TcES tienen una relación directa con las células de la respuesta Th17. Basándonos en la correlación de Pearson que realizamos, sugerimos que la concentración de las citocinas IL-17A e IL-17F influye en la progresión tumoral. Se requiere realizar más experimentos, administrando dosis más elevadas de TcES, comenzando con 200  $\mu$ g de TcES a partir del segundo ciclo y hasta finalizar la inducción al CAC. De igual manera se propone analizar a las células y citocinas de los perfiles Th1, Th2, Th17 y Tregs que pudieran estar presentes en el infiltrado tumoral para dilucidar mejor los mecanismos de acción de la respuesta inmune durante el CAC, así como de los efectos inmunomoduladores de los TcES.

## **Anexo.**

### **Soluciones utilizadas.**

#### **Cuantificación de proteínas y electroforesis en gel.**

- Gel separador

Acrilamida- bis al 3%, Tris-base pH 8.8, SDS al 20%, agua destilada, TEMED y persulfato de amonio al 10%.

- Gel concentrador

Acrilamida-bis al 3%, Tris-base pH 6.8, SDS al 20%, agua destilada, TEMED y persulfato de amonio al 10%.

- Solución desteñidora

Metanol al 5% y ácido acético al 7%.

- Buffer de corrida

Se utilizaron, 14.4 g de glicina, 3.025 g de Tris Base y 1 g de SDS, se disolvieron en agua destilada, finalmente se aforó a 1 L.

- Solución de poliacrilamida (stock)

Acrilamida 15 g, Bis-acrilamida 0.4 g, se afora a 50 ml con agua destilada. Resguardar en refrigeración.

- Tris Base pH 8.8

Se tomaron 9.075 g de Tris Base y se aforó a 50 ml con agua destilada, se ajustó a pH 8.8.

- Tris Base 6.8

Se tomaron 3 g de Tris Base y se aforó a 50 ml con agua destilada, se ajustó el pH a 6.8.

- SDS 20%

Se tomaron 2 g de SDS y se diluyeron en 10 ml de agua destilada.

- Solución persulfato de amonio al 10%

Se tomaron 0.1g de APS, y se afora a 1 ml con agua.

- BSA (Albúmina de suero bovino) 100 µg/ml

Se tomó 1 mg de BSA mezclado con 10 ml de agua destilada.

### **Soluciones para análisis de células.**

- Solución de lisis de eritrocitos

NH<sub>4</sub>Cl 39 mM, KHCO<sub>3</sub> 2.5mM y EDTA.2Na 0.02mM.

Las soluciones para el CBA así como el Buffer FACS se utilizaron como indica el distribuidor.

- Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Gibco™) preparado como indica el distribuidor.

### **Soluciones para técnica histológica.**

- Alcohol-xilol 1:1. 100 ml de alcohol absoluto y 100 ml de xilol.
- Alcoholes 90%, 80 y 70%, se diluyeron con 10, 20 y 30 mililitros de agua destilada cada uno.
- Alcohol ácido, alcohol al 70% y 1% de HCl.
- Agua amoniacal al 2%. Agua destilada y amoniaco.



## **Literatura citada.**

Allen, J. E., y Maizels R. M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*. 11(6). 375-388.

Amarnath, S., Mangus, C. W., Wang, J. C., Wei, F., He, A., Kapoor, V., Foley, E. J., Massey, R. P., Felizardo, C. T., Riley, J. L., Levine, B. L., June, C. H., Medin, J. A. y Fowler, D. H. (2011). The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Science translational medicine*, 3(111). 1-13.

Atreya, R. y Neurath, M. F. (2005). Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 28, 187–196.

Becker, C., Stoll, S., Bopp, T., Schmitt, E., y Jonuleit, H. (2006). Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Medical microbiology and immunology*, 195(3). 113-124.

Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, F. P. y Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*. 27(1). 20.

Bosman, T., Stanley R. y Lambert R. (2014). *Colorectal cancer*. En: International Agency for Research of Cancer (IARC). 1-7 pp. Lyon, Francia. IARC.

Boyle P. y Langman, J. S. (2000). ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *British Medical Journal*. 321(7264). 805.

Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R., y Ley, T. J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27(4), 635-646.

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(7169), 566-569.

Colotta, F., Allavena P., Sica, A., Garlanda, C. y Mantovani, A. (2009). Cancer related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 30, 1073–1081.

Corthay, A. (2009). How do regulatory T cells work? *Scandinavian journal of immunology*. 70(4). 326-336.

Cruz-Reyes, A., y Camargo-Camargo, B. (2001). *Glosario de términos en parasitología y ciencias afines*. México. Plaza y Valdez. 347.

de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. y Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *European Journal of Immunology*. 34(9). 2480–2488.

Dorais, F. J., y Esch, G. W. (1969). Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental parasitology*. 25. 395-398.

Elliott, D. E., Metwali, A., Leung, J., Setiawan, T., Blum, A. M., Ince, M. N., Bazzone, L. E., Stadecker, M, J., Urban, J. F. y Weinstock, J. V. (2008). Colonization with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses mucosal IL-17 production. *The Journal of Immunology*. 181(4). 2414-2419.

Espinoza-Jiménez, A., De Haro, R., y Terrazas L. I. (2017). *Taenia crassiceps* Antigens Control Experimental Type 1 Diabetes by Inducing Alternatively Activated Macrophages. *Mediators of Inflammation*, 1-15.

Fassbender, M., Gerlitzki, B., Ullrich, N., Lupp, C., Klein, M., Radsak, M. P., Scmitt, E., Bopp, T. y Schild, H. (2010). Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cellular immunology*, 265(2). 91-96.

Feagins, L. A. Souza, R. F. y Spechler S. J. (2009). Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 6, 297–305.

Finlay, C. M., Walsh, K. P., y Mills, K. H. (2014). Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunological reviews*, 259(1), 206-230.

Finney, C. A. M., 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

Fontenot, J. D., Gavin, M. A. y Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*. 4(4). 330-336.

Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I. F., Sander, C., Kirkwood, J. M., Kuchroo, V. y Zarour, H. M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *Journal of Experimental Medicine*. 207(10). 2175-2186.

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.

Freeman, R. S. (1962). Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology*. 40(6), 969-990.

Fuss, I. J. (2008). Is the Th1/Th2 paradigm of immune regulation applicable to IBD?. *Inflammatory bowel diseases*, 14(suppl\_2), S110-S112.

Gatalica, Z., Snyder, C., Maney, T, Ghazalpour A., Holterman, D. A., Xiao, N., Overberg, P., Rose, I, Basu, G. D., Vranic, S., Lynch, H. T., Von Hoff, D. D. y Hamid, O. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. (2014) *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 23(12). 2965–2970.

Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. y Noelle, R. J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin independent mechanism. *The Journal of Immunology*. 174(4). 1783–1786.

Globocan. 2018. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Recuperado el 3 de abril de 2019 de <https://gco.iarc.fr/today/home>

Gratz, I. K., y Campbell, D. J. (2014). Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance. *Frontiers in immunology*, 5, 1-17.

Gratz, I. K., Truong, H. A., Yang, S. H. Y., Maurano, M. M., Lee, K., Abbas, A. K., y Rosenblum, M. D. (2013). Cutting Edge: memory regulatory t cells require IL-7 and not IL-2 for their maintenance in peripheral tissues. *The Journal of Immunology*, 190(9), 4483-4487. 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<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Immunology*. 173(11), 6526-6531.

Hunter, M. M., Wang, A., Hirota, C. L., y McKay, D. M. (2005). Neutralizing anti-IL-10 antibody blocks the protective effect of tapeworm infection in a murine model of chemically induced colitis. *The Journal of Immunology*. 174(11). 7368-7375.

Hyun, Y. S., Han, D. S., Lee, A. R., Eun, C. S., Youn, J., y Kim, H. Y. (2012). Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*. 33(4). 931-936.

Infocáncer, (2019). Cáncer de colon y recto. Recuperado el 3 de abril de 2019 de <https://www.infocancer.org.mx/?i=infografia&a=cancer-colon-recto>

Jochem C. y Leitzmann M. (2016). Obesity and Colorectal Cancer. In: Pischon T., Nimptsch K. (eds) Obesity and Cancer. Recent Results in Cancer Research, vol 208. Springer, Cham.

Johdi, N. A., Ait-Tahar, K., Sagap, I., y Jamal, R. (2017). Molecular Signatures of Human Regulatory T Cells in Colorectal Cancer and Polyps. *Frontiers in Immunology*. 8, 1-9.

Kamanaka, M. S., Huber, L. A., Zenewicz, N., Gagliani, C., Rathinam, W., O'Connor Jr., Y., Wan, Y., Nakae, S., Iwakura, Y., Hao, L., y Flavell, R. A., (2011). Memory/effector (CD45RB<sup>lo</sup>) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *Journal of Experimental Medicine*. 214(12). 1-14.

Kimura, A., y Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European journal of immunology*. 40(7). 1830-1835.

Kolls, J. K. y Lindén, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 21: 467–476.

Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181.

Larsson S, y Wolk A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *International journal of cáncer*. 119(11), 2657-2664.

Ledesma-Soto, Y., Callejas, B., E., Terrazas, C., A., Reyes, J. L., Espinoza-Jiménez, A., González, M. I. y Terrazas, L. I. (2015). Extraintestinal Helminth Infection Limits Pathology and Proinflammatory Cytokine Expression during DSS-Induced Ulcerative Colitis: A Role for Alternatively Activated Macrophages and Prostaglandins. *BioMed Research International*. 1-17.

León-Cabrera, S. A., Callejas, B. E., Ledesma-Soto, Y., Coronel, J., Pérez-Plasencia, C., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Ávila-Moreno, F., Rodríguez-Sosa, M., Hernández-Pando, R., Marquina-Castillo, B., Chirino, Y. I. y Terrazas, L. I. (2014). Extraintestinal Helminth Infection Reduces the Development of Colitis-Associated Tumorigenesis *International Journal of Biology Sciences*. Aug 24;10(9):948-56.

Lescano, A. G., y Zunt, J. (2013). "Other cestodes: sparganosis, coenurosis and *Taenia crassiceps* cysticercosis." *Handbook of clinical neurology*. Vol. 114. Elsevier. 335-345.

Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., de St. Groth, B. F., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F., y Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine*. 203(7). 1701-1711.

Markowitz, S. D. y Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *New England journal of medicine*, 361(25). 2449-2460.

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, 536–541.

Nademi, Z., Slatter, M., Gambineri, E., Mannurita, S. C., Barge, D., Hodges, S., Bunn, S., Thomas, J., Haugk, B., Hambleton, S., Flood, T., Cant, A., Abinun, M., y Gennery, A. (2014). Single centre experience of haematopoietic SCT for patients with immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Bone marrow transplantation*. 49(2). 310-312.

Nutman, T. B. (2015). Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. *Parasite immunology*. 37(6). 304-313.

Olguín, J. E., Medina-Andrade, I., Molina, E., Vázquez, A., Pacheco-Fernández, T., Saavedra, R., Pérez-Plasencia, C., Chirino, Y. I., Vaca-Paniagua, F., Arias-Romero, L. E., Gutierrez-Cirlos, E. B., León-Cabrera, S. A., Rodríguez-Sosa, Miriam y Terrazas, L. I. (2018). Early and partial reduction in CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells during colitis-associated colon cancer induces CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell activation inhibiting tumorigenesis. *Journal of Cancer*. 9(2). 239-249.

Okamura, T., Fujio, K., Sumitomo, S., y Yamamoto, K. (2012). Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Annals of the rheumatic diseases*. 71(Suppl 2), i96-i100.

Orywal, K., y Szmitkowski, M. (2017). Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in malignant neoplasms. *Clinical and experimental medicine*. 17(2), 131-139.

Palacio, K. A. R. y Muñetón, C. M. M. (2012). Bases moleculares del cáncer colorrectal. *Iatreia*, 25(2). 137-148.

Parham, P. (2006). Cap. 1. *Elementos del sistema inmunitario y su papel en la defensa*. En: Inmunología. 1-22. Buenos Aires, Argentina. Ed: Médica Panamericana.

Pastille, E., K., Bardini, D., Fleissner, A., Adamczyk, A., Frede, M., Wadwa y M. Schuler. (2014). Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. *Cancer Research*. 74(16). 1-38.

Pastille, E., Frede, A., McSorley, H. J., Gräß, J., Adamczyk, A., Kollenda, S., Hansen, W., Epple, M., Buer, J., Maizels, R. M.; Klopffleisch, R. y Westerndorf, A. M. (2017). Intestinal helminth infection drives carcinogenesis in colitis-associated colon cancer. *PLoS pathogens*. 13(9). 1-22.

Pelly, V. S., Coomes, S. M., Kannan, Y., Gialitakis, M., Entwistle, L. J., Perez-Lloret, J., Czieso, S., Okoye, I. S., Rückerl, D., Allen, J. E., Brombacher, F. y Wilson, M. S. (2017). Interleukin 4 promotes the development of ex-Foxp3 Th2 cells during immunity to intestinal helminths. *Journal of Experimental Medicine*. 214(6). 1809-1826.

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

Peón, A. N., Ledesma-Soto, Y., Olgúin, J. E., Bautista-Donis, M., Sciutto, E. y Terrazas, L. I. (2017). Helminth Products Potently Modulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Downregulating Neuroinflammation and Promoting a Suppressive Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, 1-16.



Peón, A. N. (2017). Efecto del antígeno secretado/excretado de alto peso molecular por *Taenia crassiceps* en el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.

Povoleri, G. A. M., Scottà, C., Nova-Lamperti, E. A., John, S., Lombardi, G., y Afzali, B. (2013). Thymic versus induced regulatory T cells—who regulates the regulators?. *Frontiers in immunology*. 4, 1-22.

Renz, H., Brandtzaeg P. y Hornef, M. 2011. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 12(1). 9.

Reyes, J. L., Lopes, F., Leung, G., Mancini, N. L., Matisz, C. E., Wang, A., Thomson, E. A., Graves, N., Gilleard, J. y McKay, D. M. (2016). Treatment with cestode parasite antigens results in recruitment of CCR2+ myeloid cells, the adoptive transfer of which ameliorates colitis. *Infection and immunity*. 84(12). 3471-3483.

Reyes, J. L., Terrazas, C. A., Vera-Arias, L., y Terrazas, L. I. (2009). Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, Genetics and Evolution*. 9(6), 1115-1127.

Rodríguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., y Terrazas, L. I. (2002). Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *The Journal of Immunology*. 168(7). 3135-3139.

Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., y Levings, M. K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunological reviews*. 182(1). 68-79.

Rook, G. A. (2009). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology*. 126(1). 3-11.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., y Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*. 155(3). 1151-1164.

Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., y Anderson, A. C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*. 207(10). 2187-2194.

Sakuishi, K., Ngiow, S. F., Sullivan, J. M., Teng, M. W., Kuchroo, V. K., y Smyth, M. J. (2013). TIM3FOXP3 regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology*.; 2 (4): e23849-1-e23849-9.

Santarelli, R., Pierre, F., & Corpet, D. E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and cancer*, 60(2), 131-144.

Sciutto, E., Fragoso, G., Baca, M., De la Cruz, V., Lemus, L., y Lamoyi, E. (1995). Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infection and Immunity*, 63(6), 2277-2281.

Sciutto, E., Fragoso, G., Diaz, M. L., Valdez, F., Montoya, R. M., Govezensky, T., Lomeli, C. and Larralde, C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research*.77, 243–246

Seitz, H. K. y Stickel, F. (2007). Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 599.

Serrano, H. A. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología clínica*. 5. 1-5.

Siachoque, H., Satisteban, N., e Iglesias-Gamarra, A. (2011). Linfocitos T reguladores: subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. *Revista Colombiana de Reumatología*. 18(3). 203-220.

Su, X., Ye, J., Hsueh, E. C., Zhang, Y., Hoft, D. F., y Peng, G. (2010). Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *The Journal of Immunology*. 184(3). 1630-1641.

Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S. y Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer science*, 94(11), 965-973.

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), 181-189.

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*). *The Journal of parasitology*. 84(1). 74-81.

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

Terzić, J., Grivennikov S., Karin E., y Karin M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 138(6). 2101-2114.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W. H., Pagès, F., y Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer research*. 71(4). 1263-1271.

Vignali, D. A. A., Collison, L. W. y Creg J., W. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*. 8(7). 523-532.

Wang, H. Y., y Wang, R. F. (2007). Regulatory T cells and cancer. *Current opinion in immunology*. 19(2). 217-223.

Wang, L., Pino-Lagos, K., de Vries, V. C., Guleria, I., Sayegh, M. H., y Noelle, R. J. (2008). Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+ CD4+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(27). 9331-9336.

Weiner, H. L. (2001). Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and infection*, 3(11). 947-954.

Willms, K., y Zurabian, R. (2009). *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*. 137(3). 335-346.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura. T. y Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 322(5899). 271-275.

World Health Organization (WHO). (2019). Cancer Fact Sheet. Recuperado el 9 de abril de 2019 de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Mn, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schluns, K S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M. y Don, C. (2008). T helper 17 lineage differentiation is

programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . *Immunity*, 28(1), 29-39.

Zakeri A. (2017). Helminth-induced apoptosis: a silent strategy for immunosuppression. *Parasitology*. 29. 1-14.

Zaunders, J. J., Lévy, Y., y Seddiki, N. (2014). Exploiting differential expression of the IL-7 receptor on memory T cells to modulate immune responses. *Cytokine & growth factor reviews*. 25(4). 391-401.

Zepeda,N.,Solano,S.,Copitin,N.,Fernandez,A.M.,Hernandez,L., Tato, P. y Molinari, J.L. (2010). Decrease of peritoneal inflammatory CD4(+), CD8(+), CD19(+) lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. *Parasitology Research*. 107, 1129–1135

Zepeda, N., Tirado, R., Copitin, N., Solano, S., Fernandez, A.M., Tato, P. y Molinari, J.L. (2016). A *Taenia crassiceps* factor induces apoptosis of spleen CD4+T cells and TFG- $\beta$  and Foxp3 gene expression in mice. *Journal of Helminthology*. 90, 223 –231.

Zhao, D. M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J., y Shevach, E. M. (2006). Activated CD4+ CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 107(10), 3925-3932.

Zhou, Q., Munger, M. E., Veenstra, R. G., Weigel, B. J., Hirashima, M., Munn, D. H., Murphy, W. J., Azuma, M., Anderson, A. C., Kuchroo, V. K., y Blazar, B. R. (2011). Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 117(17). 4501-4510.

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, 1245–1252.