



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la respuesta inmune a la
calreticulina recombinante de *Taenia
solium* (rTsCRT) en ratones Balb/c
inmunizados vía intraperitoneal (IP)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Mariana Dinazar Chávez Vargas

TUTORA

M. en C. Mayra Yolanda Cruz Rivera

Ciudad Universitaria, CDMX

2021





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.

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Estudio de la respuesta inmune a la calreticulina recombinante de Taenia solium (rTsCRT) en ratones Balb/c inmunizados por vía intraperitoneal (IP)

realizado por **Mariana Dinazar Chávez Vargas** con número de cuenta **310030524** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Espiridión Ramos Martínez

Propietaria Dra. Mayra Silva Miranda

Propietaria M. en C. Mayra Yolanda Cruz Rivera
Tutora

Suplente Dr. Jonadab Efraín Olguín Hernández

Suplente Dra. Guillermina Avila Ramírez

Handwritten signatures of the five members of the division: Espiridión Ramos Martínez, Mayra Silva Miranda, Mayra Yolanda Cruz Rivera, Jonadab Efraín Olguín Hernández, and Guillermina Avila Ramírez.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 4 DE MARZO DE 2021

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Hoja de datos

1. Datos del alumno

Mariana Dinazar Chávez Vargas
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
310030524

2. Datos del tutor

M. en C Mayra Yolanda Cruz Rivera (mayracr@yahoo.com)
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina,
UNAM.

3. Datos del sinodal 1

Dr. Espiridión Ramos Martínez (espiri77mx@yahoo.com)
Unidad de Investigación en Medicina Experimental Facultad de Medicina,
UNAM

4. Datos del sinodal 2

Dra. Mayra Silva Miranda (mayra_1203@yahoo.com.mx)
Catedrática CONACyT-IIB UNAM Departamento de Inmunología

5. Datos del sinodal 3

Dr. Jonadab Efraín Olguín Hrnandez (efra004@gmail.com)
Laboratorio Nacional en Salud. Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en
Enfermedades Crónico-degenerativas Facultad de Estudios Superiores
Iztacala, UNAM

6. Datos del sinodal 4

Dra. Guilermina Ávila Ramírez (guilleavila@yahoo.com)
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina,
UNAM.

7. Datos del trabajo escrito

“Estudio de la respuesta inmune a la calreticulina recombinante de *Taenia solium*
(rTsCRT) en ratones Balb/c inmunizados por vía intraperitoneal (IP)”

69 p.

2021

DEDICATORIA

A mis padres que desde niña me enseñaron a no darme por vencida, por ser un ejemplo de fortaleza y dedicación, por todo el amor, compañía y apoyarme en cualquier decisión, ¡LOS AMO!

A mi hermano por la paciencia, el amor y el apoyo incondicional. ¡TE AMO!

A mi abuela que desde niña me enseñó a no darme por vencida, por toda la paciencia cuando salimos y la perdía, los desayunos donde nos íbamos solas sin decir nada, eres la mejor chetis ¡te amo!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias.

A la Dra. Ana Flisser Steinbruch por haberme aceptado en su laboratorio y darme consejos en cada seminario.

A la M. en C. Mayra Cruz por estar en todos los experimentos, por darme mis cocos y después palabras de aliento cuando se morían mis células, enseñarme y ayudarme a analizar, por todas las salidas recreativas, las pláticas, los consejos, la ida a la sierra y pasarme el mejor playlist de salsa. ¡Eres la mejor tutora! ¡Te quiero mucho!

A la Dra. Guillermina Avila quien me aceptó en el servicio social y me tuvo horas pipeteando para que mis curvas salieran, gracias por los consejos y ayudarme en mis experimentos ¡te quiero!

A mis amigos del laboratorio de Inmunomodulación y agentes patógenos que hicieron mi estancia muy agradable: Job que aunque me hacía enojar porque siempre llegaba tarde le agradezco que me ayudara en mis experimentos, las pláticas cuando corríamos geles hasta las 10 de la noche, por esperarme muchas veces para no regresarme sola, todos los cafés helados y brindarme su amistad, a Lau Pérez que ha estado ayudándome desde el primer día que llegue, las risas durante las necropsias, todas las pláticas y consejos, a Lau Sánchez por los ánimos cuando no salían las cosas y las pláticas, a Fer que a pesar de que cuando llegó al lab no me saluda hoy la considero una gran amiga, a Xime por las risas, comidas y ayudarme a inmunizar, a Karlita por todos los momentos divertidos como las carreras de sillas, las comidas ¡Los quiero mucho!

Al bioterio de la Facultad de Ciencias y a Hospital General, IMSS por la aportación de ratones.

Al Centro de Instrumentos-Citometría de flujo de Centro Médico Siglo XXI, IMSS y a

la unidad de citometría de flujo de la coordinación general de servicios experimentales del CINVESTAV por la ayuda en la adquisición de muestras.

A mis amigos de la carrera Cesardo, Juan y Marissa por todos los momentos divertidos, las salidas a bailar, al cine, las comidas. ¡Los quiero!

A Noemi y Mónica por los viajes, conciertos, las pláticas en la madrugada riendo de nuestras desgracias, por siempre apoyarme ¡las quiero!

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de linfocitos B.....	15
Figura 2. Estructura química de las inmunoglobulinas.....	16
Figura 3. Estructura de las distintas clases de inmunoglobulinas	17
Figura 4. Activación y diferenciación de linfocitos TCD4+.....	21
Figura 5. Respuesta inmune general a helmintos	26
Figura 6. Dominios estructurales y funcionales de la calreticulina humana	28
Figura 7. Resumen de las diversas funciones de TcCRT	30
Figura 8. Plásmido pET-23aCRT	31
Figura 9. Distribución evolutiva de tejidos linfoides.....	33
Figura 10. Diseño experimental para la caracterización del tipo de respuesta inmune en ratones Balb/c	37
Figura 11. Análisis de la expresión y purificación de la rTsCRT en geles de poliacrilamida	46
Figura 12. Estrategia de análisis para la identificación de las poblaciones en células de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos	48
Figura 13. Inmunofenotipo de linfocitos en células de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos	49
Figura 14. Titulación de anticuerpos anti rTsCRT	51
Figura 15. Selección de citocinas.....	52
Figura 16. Intensidad media de fluorescencia.....	53
Figura 17. Modelo de la respuesta inmunológica de linfocitos, inmunoglobulinas y citocinas a la rTsCRT	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Grupos funcionales de citocinas.....	23
Cuadro 2. Clases y subclases de inmunoglobulinas en determinados mamíferos ..	34

ABREVIATURAS

CRT	Calreticulina
rTsCRT	Calreticulina recombinante de <i>Taenia solium</i>
E/S	Excreción-secreción
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Ig	Inmunoglobulina
Erp57	Proteína de retículo endoplásmico 57
CBA	Cytometric Bead Array
BCR	Receptor de células B
TCR	Receptor de células T
CTL	Linfocitos citotóxicos
NK	Natural killer
NCR	Receptores citotóxicos naturales
NKT	Natural killer T
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
IL	Interleucina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
IFN- γ	Interferón- γ
NLM	Ganglios linfáticos mesentéricos
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
LB-Amp	medio LB+ampicilina
MFI	Intensidad media de fluorescencia
RE	Retículo Endoplásmico
IP	Intraperitoneal
O.D	Densidad óptica
rpm	Revoluciones por minuto
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopranosido
BSA	Albúmina sérica bovina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
PBS	Buffer de fosfato salino
PBS+SFB	Buffer de fosfato salino + suero fetal bovino
DPBS	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco

H ₂ O dd	Agua destilada
PE	Ficoeritrina
Dpi	Días post-infección
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
DSS	Diocilsulfosuccinato de sodio

CONTENIDO

	Página
1- Resumen	12
2- Introducción.....	13
2.1 Sistema Inmune.....	13
2.2 Linfocitos	14
2.3 Linfocitos B.....	14
2.4 Inmunoglobulinas.....	15
2.5 Clases de Inmunoglobulinas.....	16
2.5.1 IgG.....	17
2.5.2 IgA.....	18
2.5.3 IgE.....	18
2.5.4 IgD.....	18
2.5.5 IgM	19
2.6 Linfocitos T	19
2.7 Citocinas	22
2.8 Células Natural Killer	24
2.9 Linfocitos NKT.....	25
2.10 Respuesta inmune a helmintos	25
2.11 Calreticulina.....	27
2.12 Calreticulina de otros parásitos.....	29
2.13 Calreticulina de <i>Taenia solium</i>	30
2.14 Capacidad inmunomoduladora de la rTsCRT.....	32
2.15 Respuesta inmune de ratones BALB/c	33
3- Justificación	35
4- Hipótesis	35
5- Objetivos	35
5.1- General.....	35
5.2- Particular.....	36

6- Diseño experimental	37
7- Materiales y métodos	38
7.1 Expresión	38
7.2 Purificación	38
7.3 Tinción de plata	39
7.4 Ratones	40
7.5 Consideraciones éticas	40
7.6 Inmunización.....	40
7.7 Cultivo de células de bazo y mesentéricos	41
7.8 Tinción celular para inmunofenotipo	41
7.9 Determinación de anticuerpos IgG total, IgG1, IgG2a e IgA por ELISA	42
7.10 Cuantificación de citocinas en suero, por Citometría	43
7.11 Análisis estadístico	43
7.12 Carta de bioética	44
8- Resultados	45
8.1 Expresión y Purificación	45
8.2 Inmunofenotipo	46
8.3 Determinación de anticuerpos IgG total, IgG1, IgG2a e IgA por ELISA	49
8.4 Cuantificación de citocinas en suero, por Citometría	52
9- Discusión	54
10- Conclusión	61
11- Referencias	62

1. RESUMEN

La calreticulina (CRT) es una proteína que se expresa en células nucleadas, es multifuncional y altamente conservada en células eucariontes. Se le han asignado funciones múltiples como: el ser chaperona de tipo lectina, participar en la señalización y en el almacenamiento del calcio y participar en la regulación de la actividad lítica de perforinas de células T. La CRT forma parte de los productos de excreción-secreción (E/S) de varios helmintos, y se ha demostrado que induce una respuesta tipo Th2, como en el caso del nematodo *Helimogsomoides polygyrus* (Hp), donde los linfocitos T CD4⁺ de ratones inmunizados con CRT producen IL-4 e IL-10.

En este trabajo se analizaron algunos mecanismos de la respuesta inmune inducida en ratones BALB/c hacia la calreticulina recombinante de *Taenia solium* (rTsCRT) la cual fue expresada en bacterias *Escherichia coli* BL21, transfectadas con el vector pET23a-TsCRT y donde posteriormente se indujo la sobre-expresión de la proteína con Isopropil β-D-1-tiogalactopranosido (IPTG).

El estudio incluyó el análisis de la concentración de anticuerpos anti-rTsCRT (IgG, IgG1, IgG2a e IgA) en el suero de los ratones por medio de ELISA, además se realizó un ensayo de CBA (Cytometric Bead Array) para evaluar la concentración de las citocinas con un perfil mixto Th1/Th2: IL-4, IL-6, IL-2, TNF-α, IL-5, IFN-γ, IL-13 e IL-10.

Los resultados mostraron un incremento significativo en la población de linfocitos B, en el bazo, en comparación al grupo control, mientras que, en los ganglios linfáticos mesentéricos, no se encontraron diferencias significativas, ambos grupos se mantuvieron en porcentaje celular similar.

En la titulación de anticuerpos anti-rTsCRT, se vió una diferencia cuando utilizamos para inmunizar a la proteína electroeluida a diferencia de, cuando se le sumaba la diálisis al proceso de purificación, en este último caso, se observó un incremento para IgG total, así como la subclase IgG1 e IgA en los ratones inmunizados.

Con respecto a la determinación de la concentración de las citocinas, se observó una mayor producción de IL-4, IL-5 e IL-13 en el grupo inmunizado con calreticulina, mientras que el grupo control tuvo una concentración similar de todas las citocinas, concluyendo que la respuesta Th2 es la predominante.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Sistema inmune

La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa del organismo contra antígenos propios y externos. También, el sistema inmunitario comprende todas aquellas células y moléculas responsables de la respuesta frente a agentes extraños y potencialmente dañinos para el organismo (Puertas *et al.*, 2006).

El sistema inmune está estructurado en 2 niveles. La inmunidad innata tiene como función principal distinguir entre los agentes externos potencialmente patógenos de aquellos que no lo son, para lo cual cuenta con barreras físicas como la piel y las mucosas, así como con moléculas circulantes que incluyen los reactantes de fase aguda y el sistema de complemento, las células fagocíticas, natural killer, y citocinas, como los interferones y el factor de necrosis tumoral (Gallastegui *et al.*, 2002).

De igual manera la inmunidad adaptativa, también denominada adquirida, es un mecanismo de respuesta más evolucionado, que es estimulado de forma específica tras la exposición a un determinado agente extraño, aunque la activación completa de estos mecanismos requiere varios días, se adquiere mayor especificidad e intensidad de la respuesta alcanzada, así como capacidad de generar memoria en caso de enfrentarse al mismo antígeno nuevamente. Existen dos tipos de inmunidad adaptativa: humoral y celular (Brandan *et al.*, 2007). Los principales elementos implicados en la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos (B y T), las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos, monocitos, etc.), las inmunoglobulinas y las citocinas, que van a organizar y coordinar el comportamiento de los componentes celulares (Puertas *et al.*, 2006).

2.2 Linfocitos

Los linfocitos son, por excelencia, las células relacionadas con la respuesta inmunológica adaptativa, aunque hace poco se describió que también participan en la respuesta inmunológica innata (Pavón *et al.*, 2016).

Durante el desarrollo fetal, los linfocitos son generados en el hígado, pero tras el nacimiento esta función tiene lugar en la médula ósea, de donde salen en un estado inmaduro transicional para culminar su maduración en órganos linfoides secundarios, principalmente el bazo o en ganglios linfáticos mesentéricos (Chung *et al.*, 2003).

En estado de reposo suelen poseer grandes núcleos redondeados con cromatina muy compactada y escaso citoplasma. Su concentración en la sangre periférica de un adulto humano sano es entre $1.1-3.7 \times 10^6$, mientras que en el ratón es de $2.0 \pm 0.8 \times 10^6$ linfocitos/mL, lo que representa de 20 a 50% de los leucocitos totales en circulación (Pavón *et al.*, 2016).

Los linfocitos se clasifican en tres grandes grupos: a) linfocitos T o derivados del timo; b) linfocitos B o derivados de la bursa de Fabricio (como originalmente se describió en aves) o de médula ósea en mamíferos (del inglés Bone Marrow), y c) células NK.

2.3 Linfocitos B

Los linfocitos B al entrar en contacto con su antígeno, se diferencian en células plasmáticas (Pavón *et al.*, 2016) las cuales son responsables de la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas, que son capaces de reconocer un vasto repertorio de antígenos. Además, los linfocitos B juegan un papel fundamental como células presentadoras de antígeno a los linfocitos Th CD4⁺ y desempeñan funciones inmunoregulatoras (Pavón *et al.*, 2016) y un papel importante en la inflamación.

En el proceso de desarrollo, maduración, respuesta específica de antígeno y diferenciación terminal, los linfocitos B se caracterizan por la expresión de diversas moléculas de membrana que acompañan la expresión del receptor específico para el antígeno (B-cell Receptor, BCR) (**figura 1**). (Murphy *et al.*, 2017, por ejemplo, el marcador CD19 el cual funciona como el componente de señalización dominante de

un complejo multimolecular en la superficie de las células B maduras (Vélez *et al.*, 2015).

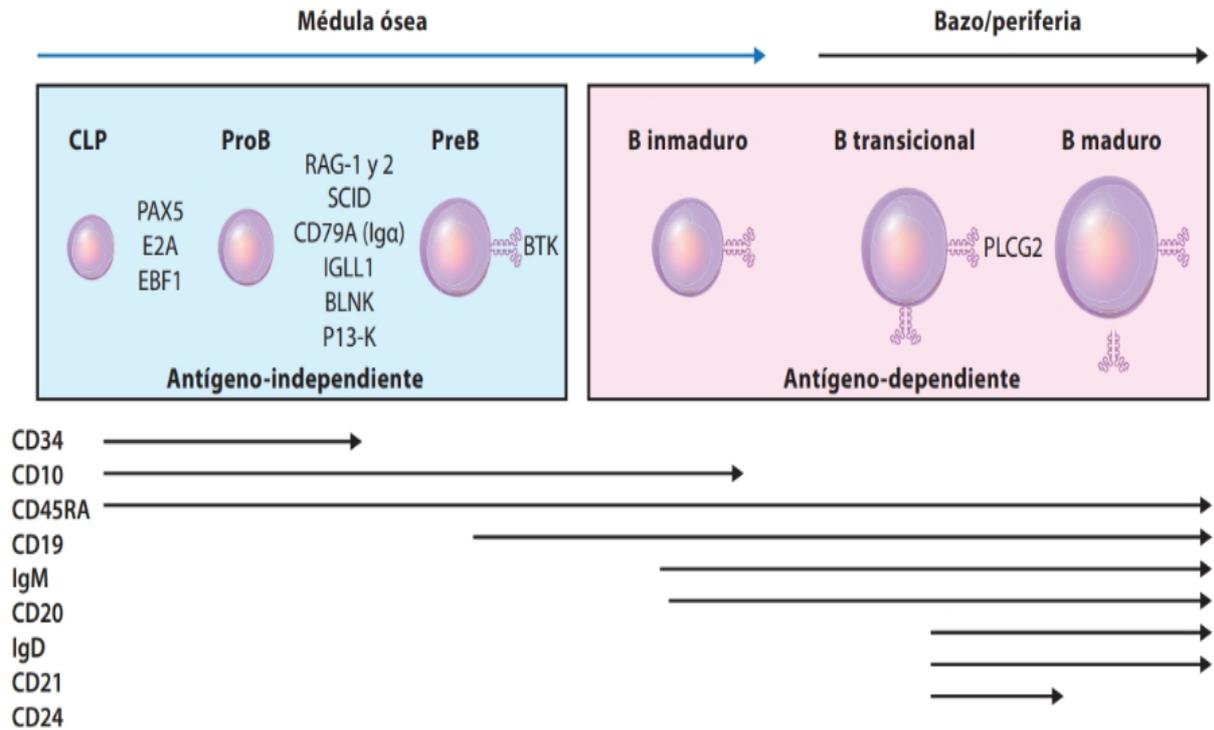


Figura 1. Desarrollo de linfocitos B. Cada día se producen millones de linfocitos B maduros, los cuales atraviesan por etapas de maduración identificables mediante la expresión de marcadores de superficie distintivos. Las etapas más tempranas de la diferenciación ocurren en la médula ósea, a partir de un precursor linfocítico común (CLP). Posteriormente ocurren procesos de diferenciación del linaje linfocítico B (linfocito pro B), que llevarán a la expresión del BCR en la superficie del linfocito (linfocito B inmaduro), lo cual permite el reconocimiento de antígenos, el inicio de la fase de maduración antígeno dependiente. Tomada de Pavón *et al.*, 2016.

2.4 Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Ig) son moléculas glicoproteicas (90% polipéptidos, 10% carbohidratos). El anticuerpo típico es una Ig del tipo G (IgG), la cual está constituida por dos unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño (figura 2) que tienen la capacidad de unirse específicamente con un antígeno o un inmunógeno (Robledo, 2009).

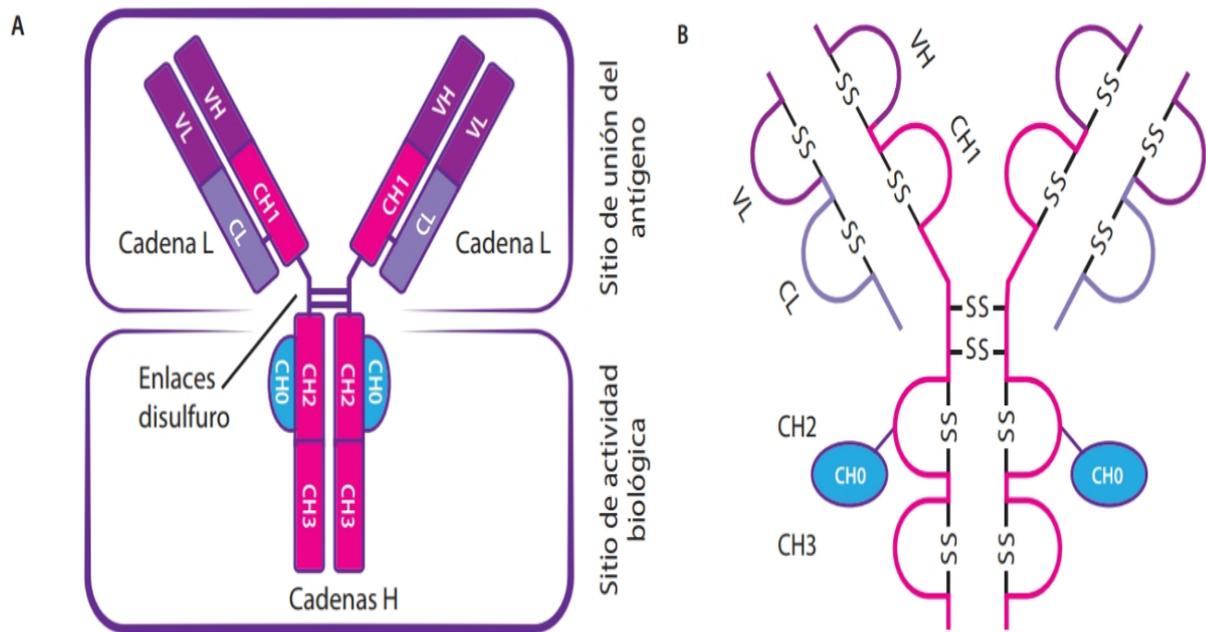


Figura 2. Estructura química de las inmunoglobulinas. **A.** Un anticuerpo está formado por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que están unidas por enlaces disulfuro (Cadena L (VH y VL) y una región constante (CH y CL). Los residuos de carbohidratos se encuentran unidos al dominio CHL. **B.** Los dominios de inmunoglobulinas están formados por alrededor de 110 aminoácidos y tienen un enlace disulfuro intracadena que forma un asa; los dominios amino terminal corresponden a las regiones V de ambas cadenas. Tomada de Pavón *et al.*, 2016.

2.5 Clases de Inmunoglobulinas

En el suero y en las secreciones corporales los anticuerpos siempre forman mezclas heterogéneas, sin embargo, sus diferencias en tamaño y peso han permitido identificar las distintas clases de inmunoglobulinas (**figura 3**). Todos los anticuerpos monoméricos están formados por dos cadenas H y dos cadenas L (**figura 2**), unidas entre sí por enlaces disulfuro. Si un anticuerpo se somete a una reducción con 2-mercaptoetanol, las cadenas se mantienen unidas por enlaces no covalentes, pero si la reducción ocurre en condiciones de acidez, las cadenas se separan (Pavón *et al.*, 2016). Se han identificado cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgE, IgD e IgM, las cuales tienen funciones diferentes (ver a continuación) (Wong *et al.*, 2016).

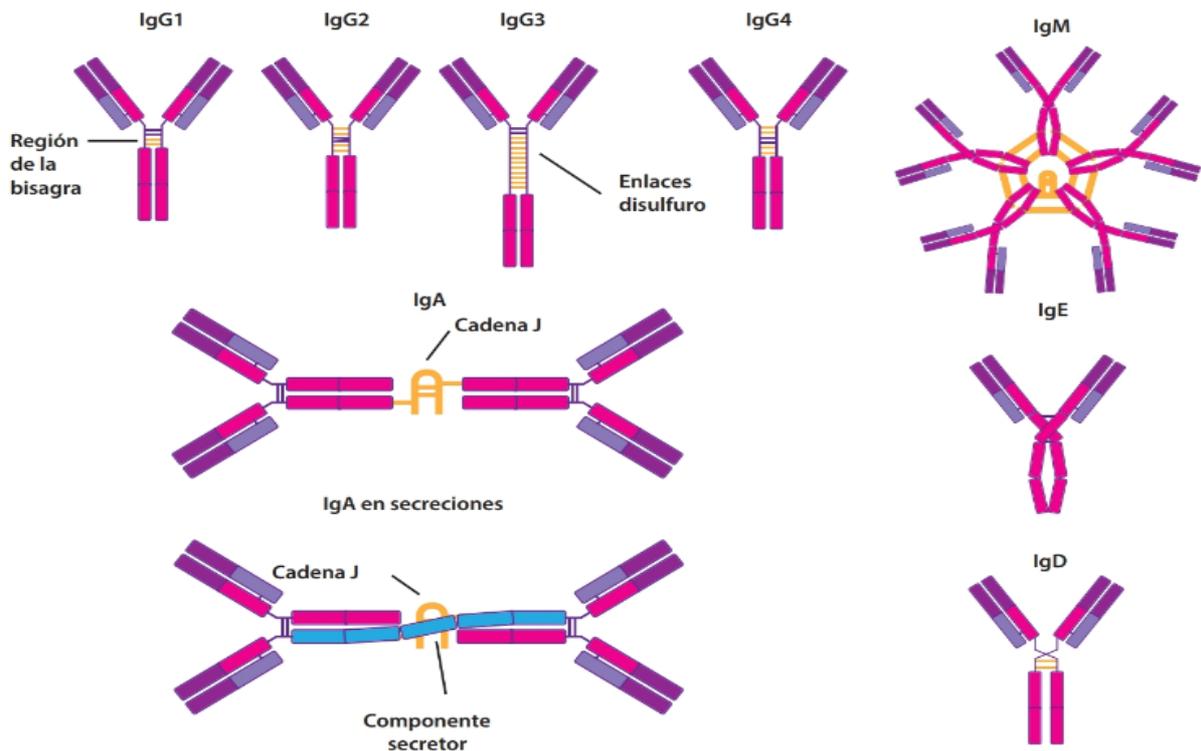


Figura 3. Estructura de las distintas clases de anticuerpos. Se muestran los dominios que forman las cadenas pesadas (H) (rosa) y las cadenas ligeras (L) (violeta). Sólo algunas inmunoglobulinas contienen la región de bisagra (IgG, IgA e IgD). Las subclases de IgG difieren en la disposición y el número de los enlaces disulfuro (líneas amarillas y moradas) que unen a las cadenas H. La IgM y la IgE tienen un dominio constante extra. La IgA puede presentarse en forma polimérica y sus monómeros están unidos por la cadena J; si la IgA proviene de las secreciones de las mucosas, los monómeros también están enlazados por el componente secretor (azul). Tomada de Wong *et al.*, 2016.

2.5.1 IgG

Son las inmunoglobulinas más abundantes en el suero (75 a 80%) y se producen durante la respuesta secundaria contra un antígeno, las diferentes subclases se presentan en proporciones muy diferentes. La IgG1 es la subclase más frecuente (más del 60 %), seguida de la IgG2 (aproximadamente un 18 %), mientras que IgG3 e IgG4 se encuentran en mucha menor proporción (Murphy *et al.*, 2017). Los anticuerpos IgG se difunden con facilidad, por lo que también son abundantes en el líquido extracelular, y son muy eficientes en la neutralización de toxinas, virus y bacterias. Además, los anticuerpos IgG activan complemento, siendo la más eficiente la subclase IgG3, seguida de IgG1 e IgG2 mientras que la subclase IgG4 carece de esta propiedad. Las células fagocíticas tienen receptores que reconocen

la fracción Fc de los anticuerpos IgG; estos receptores permiten que los anticuerpos IgG funcionen como opsoninas (Gallastegui *et al.*, 2002).

2.5.2 IgA

Representan de 10 a 15% de las inmunoglobulinas séricas, pero son los más abundantes en las secreciones corporales como la saliva, las lágrimas, la leche materna y el moco de las vías bronquiales, genitourinarias y digestivas. En las secreciones corporales son esenciales para mantener un equilibrio con la microbiota comensal, así como para neutralizar toxinas y prevenir infecciones por medio de la exclusión de los microorganismos, este mecanismo consiste en la formación de una capa de hidratación alrededor de los microorganismos recubiertos con IgA, la cual es repelida por las mucinas hidrofóbicas en la superficie de las mucosas; lo que inhibe la adherencia de estos microorganismos. La IgA es ineficiente para la fijación de complemento y para la opsonización, mientras que en las mucosas evita el desarrollo de una respuesta inflamatoria exagerada en contra de la microbiota comensal (Wong *et al.*, 2016).

2.5.3 IgE

La concentración sérica de los anticuerpos IgE es mucho menor que la de las otras clases de anticuerpos, cerca de 0.005%, abundan en las mucosas, están involucrados en los procesos alérgicos (hipersensibilidad tipo 1) que ocurren en la piel (dermatitis atópica, eczema), la nariz (rinitis), las vías respiratorias altas (asma) y el tracto gastrointestinal (alergias a alimentos); también juega un papel importante en la infección contra helmintos (Amarasekera, 2011). Una vez que las moléculas de IgE recubren al parásito helminto, se favorece su unión con los mastocitos del tejido y los eosinófilos circulantes a través de los receptores de IgE. La interacción de la IgE con sus receptores en las células de la respuesta inmune inicia una cascada de reacciones que resulta en la liberación de histamina y otras sustancias tóxicas hacia el exterior (Abbas *et al.*, 2004).

2.5.4 IgD

Constituye aproximadamente 0.2% de las inmunoglobulinas séricas, se puede detectar junto con la IgM monomérica, en la superficie de los linfocitos B vírgenes. Algunos estudios señalan que la IgD induce la infiltración de neutrófilos y basófilos, y es considerada un marcador temprano de la activación de células B; puede tener un papel regulador, por ejemplo estimular la respuesta protectora de anticuerpos de los isotipos IgM o IgA, o interferir con la replicación viral; asimismo participa en la generación y mantenimiento de las células B de memoria, y se le señala como parte importante en la transición de un estado de susceptibilidad a la inducción de tolerancia de células B. Es un potente inductor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-1; también induce la liberación de IL-6, IL-10 e IL-17 (Arce *et al.*, 2003).

2.5.5 IgM

Representa de 5 a 10% de las inmunoglobulinas séricas; se encuentra de manera monomérica en la superficie de los linfocitos B vírgenes, además, la IgM es la primera inmunoglobulina que se produce durante una respuesta humoral y, aunque tiene baja afinidad por su antígeno, presenta una alta avidéz, ya que puede unirse en forma simultánea a diferentes epítomos en el antígeno debido a su forma pentamérica (Wong *et al.*, 2016).

Es eficiente para la aglutinación y la neutralización de microorganismos y toxinas; debido a su elevado peso molecular, difunde de modo ineficiente, por lo que se encuentra en bajas concentraciones en el líquido extracelular, es más eficaz que la IgG en la activación del complemento, opsonización, neutralización de virus y aglutinación. Dado que son muy grandes, las moléculas de IgM rara vez entran en los fluidos tisulares, ni siquiera en los lugares de inflamación aguda (Tizard, 2009).

2.6 Linfocitos T

Los precursores de los linfocitos T se originan en la médula ósea y migran al timo, donde alcanzan su madurez, después de un proceso de selección de los timocitos (linfocitos T inmaduros), previo a la liberación de estos en el torrente circulatorio (Killeen *et al.*, 1998). Constituyen la inmunidad celular, especialmente orientada a la eliminación de microorganismos que residen y proliferan en el interior de las células

del huésped, y por lo tanto no son accesibles a los anticuerpos circulantes. Se dividen según su función en (Modigliani *et al.*, 1996).

Linfocitos T citotóxicos o linfocitos CD8⁺ encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular, mediante la interacción con el complejo "péptido-MHC-I"; Las células CD8⁺ reconocen a las células infectadas por cualquier patógeno y las destruyen a través de las moléculas perforinas, granzimas, FasL, que activan la apoptosis de la célula (Rosenstein *et al.*, 2015).

Linfocitos T cooperadores o linfocitos CD4⁺, que desempeñan un rol fundamental en la función del sistema inmune, puesto que colaboran con linfocitos B en el desarrollo de una respuesta humoral mediada por anticuerpos, estimulan y mantienen una respuesta celular T citotóxica mediada por linfocitos TCD8⁺, modulan la función de macrófagos, regulan la respuesta inmune contra una gran variedad de agentes patógenos y controlan la respuesta a antígenos propios, previniendo el desarrollo de autoinmunidad (Vergara, 2009). También se encargan de iniciar la cascada de la respuesta inmune coordinada mediante la interacción con un complejo "péptido-MHC-II". Cuando se activan, los linfocitos CD4⁺ se especializan, diferenciándose a su vez en linfocitos efectores, que se distinguen por el tipo de citocinas que producen (**figura 4**):

Th1 tiene a su cargo muchas funciones entre ellas la producción de anticuerpos IgG que promueven la opsonización (es decir, anticuerpos que se unen a receptores Fc de alta afinidad de fagocitos e interactúan con el sistema de complemento, segregan fundamentalmente IFN- γ , IL-2 y TNF- α ; son importantes frente a la respuesta celular y la inflamación (Owen *et al.*, 2014);

Th2 segregan principalmente IL-4 e IL-5, IL-10 e IL-13: son importantes en las reacciones alérgicas y en la defensa frente a parásitos extracelulares (Abbas *et al.*, 2004);

Th17, denominados así porque segregan IL-17, además de IL-22; son los principales mediadores en algunas reacciones alérgicas, y parecen estar implicados en el desarrollo de enfermedades como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal. Su principal acción se relaciona con la

secreción de citocinas como IL-17, que reclutan neutrófilos a los lugares de infección. Estos neutrófilos ingieren y matan a los microbios extracelulares, sirven para mantener la función normal epitelial en el intestino y la piel (Dong, 2008).

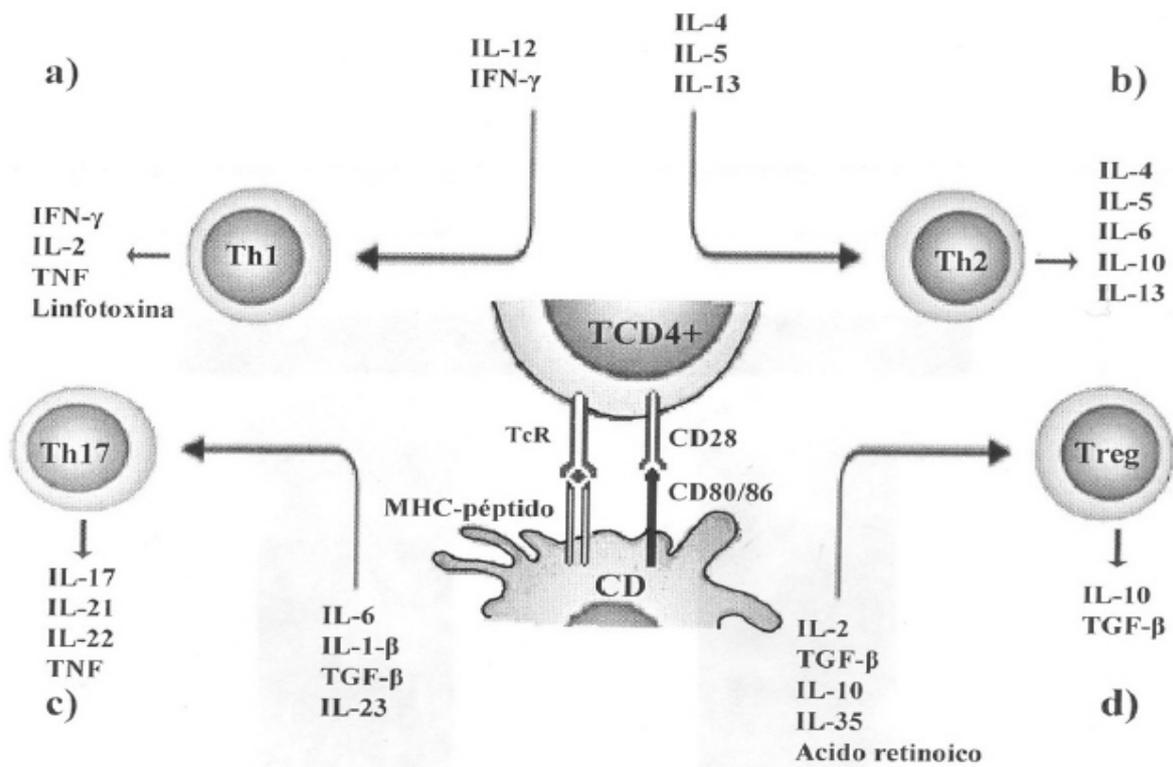


Figura 4. Activación y diferenciación de linfocitos TCD4+. La activación y diferenciación de linfocitos TCD4+ requiere el reconocimiento por el TCR, del complejo MHC/péptido presentado por la célula dendrítica (CD), señales accesorias de co-estimulación (como la interacción CD28-CD80/86) y la presencia de citocinas que inducen la expansión clonal y diferenciación de los linfocitos. **a)** En presencia de IL-12 e IFN- γ , se generan linfocitos Th1 que secretan IL-2, IFN- γ , TNF y Linfotoxina. **b)** Las citocinas IL-4, IL-6, e IL-13 inducen la diferenciación de la subpoblación Th2, que secreta IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. **c)** La presencia de IL-1 β , IL-6, IL-23 y de TGF- β , activa la diferenciación de linfocitos Th17, que secretan IL-17, IL-21 e IL-22. **d)** En presencia de TGF- β , IL-2, IL-10 y ácido retinoico, induce la diferenciación de linfocitos T reguladores, que secretan IL-10 y TGF- β . Tomada de Vergara, 2009.

2.7 Citocinas

La actividad de las citocinas se reconoció por vez primera a mediados de la década de 1960-1969, cuando se encontró que sobrenadantes derivados de cultivos *in vitro* de linfocitos contenían factores solubles, por lo general proteínas o glicoproteínas, que podían regular la proliferación, diferenciación y maduración de células del sistema inmunitario (Owen *et al.*, 2014).

Las citocinas son un grupo extenso y heterogéneo de glicoproteínas de bajo peso molecular secretadas por diversos tipos celulares, fenómeno al cual se llama pleomorfismo. Se unen a receptores de señalización presentes en varios tipos celulares, sobre todo leucocitos, y regulan las funciones de las células involucradas en la respuesta inmunológica innata o adaptativa. Hay citocinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias (**cuadro 1**).

Cada citocina se une a un receptor de superficie celular específico generando cascadas de señalización celular que alteran la función celular. Esto incluye la regulación positiva o negativa de diversos genes y sus factores de transcripción que resultan en la producción de otras citocinas, o un aumento en el número de receptores de superficie para otras moléculas, o la supresión de su propio efecto mediante retro regulación (Owen *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Grupos funcionales de citocinas en función de la respuesta inflamatoria

Citocina	Secretada por	Blancos y efectos
Interleucina-1 (IL-1)	Monocitos, macrófagos, células endoteliales y epiteliales	Inflamación, fiebre
Interleucina-12 (IL-12)	Macrófagos, células dendríticas	Células NK: influye sobre la inmunidad adaptativa (promueve el grupo Th1)
Factor de necrosis tumoral-α (TNF-α)	Macrófagos, monocitos, neutrófilos, células T activadas y células NK	Interviene en la inflamación, la apoptosis
Interleucina-6 (IL-6)	Macrófagos, células endoteliales y células Th2	Influye sobre la inmunidad adaptativa (proliferación y secreción de anticuerpos de la línea de células B)
Interferón-γ (IFN-γ)	Macrófagos, células dendríticas, células infectadas por virus	Aumenta la expresión de MHC clase I y II y activa células NK, macrófagos
Interleucina-2 (IL-2)	Células T	Proliferación de células T y B, activación y proliferación de células NK
Interleucina-4 (IL-4)	Células Th2, mastocitos	Promueve la diferenciación Th2; cambio de isotipo hacia IgE
Interleucina-5 (IL-5)	Células Th2	Generación y activación de eosinófilos, estimula el crecimiento de células B, aumenta la secreción de Ig

Tomada de Owen, 2014

2.8 Células NK (Natural Killer)

Las células NK constituyen una tercera rama de las células linfoides, junto con los linfocitos B y T del sistema inmunitario adaptativo; todas se diferencian a partir del progenitor linfoide común hacia tres líneas separadas, son linfocitos que presentan receptores provenientes de la línea germinal, tienen actividad citotóxica contra células transformadas o infectadas por virus, en especial mediante un mecanismo que involucra dos tipos de receptores, los receptores encargados de la inhibición de la actividad citotóxica incluyen a los miembros de la familia KIR (del inglés Killer Immunoglobulin-Like receptors, o receptores asesinos parecidos a inmunoglobulina) encargados de reconocer moléculas del HLA (del inglés Human Leukocyte Antigen, o antígeno leucocitario humano) clases A, B y C, así como el NKG2A, que reconoce moléculas HLA-E (Pavón *et al.*, 2016).

Los receptores activadores de las células NK también se pueden clasificar en dos grupos: los que reconocen moléculas del MHC-I y los que reconocen otros tipos de moléculas como el grupo de los receptores NCR incluye las moléculas NKp46, NKp30, NKp44 y NKp80, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. NKp46 y NKp30 se expresan constitutivamente en las células NK. El gen que codifica para NKp46 se encuentra en el cromosoma 19, en una región que contiene genes para varios tipos de receptores de los leucocitos, se demostró que NKp46 reconoce directamente proteínas virales como la hemaglutinina del virus de influenza y la hemaglutinina y neuraminidasa de los virus Sendai y parainfluenza (Pessino *et al.*, 1998).

La actividad citotóxica mediada por células NK es aumentada por el IFN- α producido en etapas tempranas durante infecciones virales, un ejemplo de regulación por retroalimentación positiva en la inmunidad innata. Además de liberar mediadores citotóxicos, las células NK activadas también secretan citocinas pro inflamatorias, IL-6 y TNF- α , así como IFN tipo I y II, IFN- γ , un potente activador de macrófagos que también ayuda a activar la respuesta adaptativa (Murphy *et al.*, 2008).

2.9 Linfocitos NKT

Los linfocitos NKT son un subconjunto heterogéneo de linfocitos T que comparten marcadores de superficie y características funcionales de las células NK y los linfocitos T convencionales. La mayoría de los linfocitos NKT expresan CD16, CD56 y NK1.1, así como un receptor TCR $\alpha\beta$ semi invariante que reacciona con antígenos de naturaleza glicolípídica presentados por la molécula CD1d por parte de las APC, de igual manera pueden modular la respuesta inmunológica por medio de su capacidad para expresar citocinas de tipo Th1 y Th2 de forma simultánea; su distribución en los tejidos es amplia y pueden encontrarse en el tejido linfoide primario y secundario, lo mismo que en el hígado, el pulmón, el tejido neural y la sangre periférica. Recientemente se reportó una asociación entre la disminución en el número de NKT y el desarrollo de cáncer o metástasis (Pavón *et al.*, 2016).

A diferencia de las células T convencional que reconocen péptidos unidas a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II, las células NKT reconocen estructuras lipídicas y glicolípídicas unidas a moléculas CD1d. Se encuentran principalmente en el hígado, bazo y médula ósea, y dependen del timo para su desarrollo (Middendorp *et al.*, 2009), tienen gran capacidad para producir cantidades elevadas de IL-4 e IFN- γ (Erazo-Borrás *et al.*, 2014).

2.10 Respuesta inmune a Helmintos

Los helmintos son un grupo de organismos multicelulares que afectan a los humanos y otras especies. Existen diversos modelos en ratones, que representan el espectro de las enfermedades infecciosas, y han sido útiles en analizar y caracterizar su respuesta inmune (**figura 5**). Mientras muchos microparásitos escapan del ataque inmunológico por variación antigénica o por secuestro en nichos especializados del organismo. Eventos clave entre la respuesta del parásito y el huésped es la inducción de una respuesta Th2, la activación de M Φ (macrófagos); además de la participación de células, particularmente eosinófilos y células cebadas (Gause *et al.*, 2003).

A lo largo de más de una década diversos investigadores han comprobado que los helmintos desencadenan una respuesta Th2 con una producción elevada de

citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 y poco IFN- γ (Weinstock *et al.*, 2005), por ejemplo, el establecimiento del parásito adulto de *Taenia solium* en el intestino del hámster dorado, causa una producción elevada de IFN- γ , así como la sobreexpresión de IL-4, a los 3 días post-infección (dpi), un incremento en la expresión de IL-10 a lo largo de toda la infección y baja expresión de IL-12, lo que demuestra que la respuesta principal durante la infección con *T. solium* es Th2 (Cruz-Rivera *et al.*, 2014).

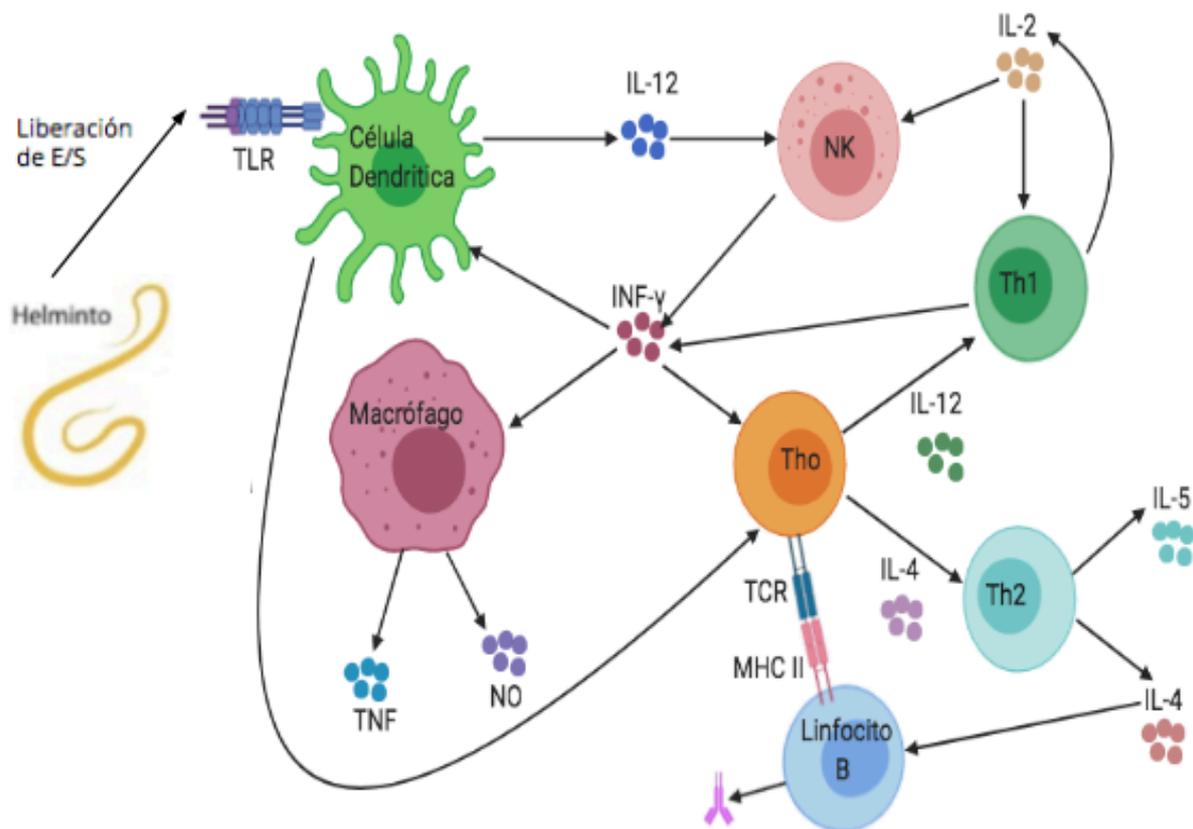


Figura 5. Respuesta inmune general a helmintos. Los helmintos liberan productos de excreción/secretión y antígenos los cuales son por reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los **receptores tipo Toll (TLR)**, posteriormente son procesados y presentados por la célula dendrítica (CD) a los linfocitos Th0 y la diferenciación hacia linfocitos Th1 o Th2 dependerá de las citocinas presentes en el medio, así mismo la CD libera IL-12 la cual estimula la producción de las células NK. Los linfocitos Th1 liberan interleucinas IL-2 e IFN- γ , los linfocitos con perfil Th2 liberan interleucinas como IL-5 e IL-4. El T_H activado interactúa ahora mediante su TCR con el complejo {epitopo-MHC-II} del linfocito B, en este contacto entre ambas células tiene lugar un intercambio de señales químicas que conduce a la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Por otro lado, la producción de citocinas, particularmente IFN- γ , por las células NK da como resultado la maduración de las CD y activa a los macrófagos que van a producir óxido nítrico y TNF.

2.11 Calreticulina

El Retículo Endoplásmico (RE) es un organelo esencial para la síntesis y maduración proteica, es un reservorio y fuente de señales de calcio (Serrano, 2009). Cualquier perturbación de sus funciones puede resultar en la acumulación de proteínas mal plegadas y con la falla posterior de su funcionamiento (Gatica, 2009). El RE contiene proteínas chaperonas que están involucradas fisiológicamente en modificaciones post-traduccionales, en la formación de enlaces disulfuro, plegamiento correcto de las proteínas (por medio de su sitio con actividad de lectina) y en la prevención de la agregación proteica de las nuevas proteínas sintetizadas, lo cual preserva la homeostasis celular (Velázquez *et al.*, 2015).

Las proteínas chaperonas pueden organizarse en tres grupos: (a) chaperonas de la familia de las proteínas “heat-shock” (Hsp), que incluye a GRP78, GRP94 y co-chaperonas; (b) chaperonas substrato- específicas como Hsp47 y (c) chaperonas tipo lectinas como Calnexina (Cnx) y Calreticulina (Crt) (Lee AS *et al.*, 2007).

La calreticulina (CRT) es una proteína que se expresa en todas las células nucleadas de organismos superiores, es multifuncional y altamente conservada en células eucariotas excepto en levaduras (Duaso, 2011). Se forma por 417 aminoácidos, está presente en el retículo endoplásmico y se ha identificado en varios parásitos, donde se ha observado que tienen un papel importante en la relación huésped-parásito (Fonseca *et al.*, 2011). Contiene tres dominios estructurales y funcionales (**figura 6**): dominio N terminal, dominio P central y dominio C terminal. La unión a átomos de Zinc, así como la actividad de chaperona está dada por la presencia de un sitio de unión a lectina en el dominio N terminal. El dominio P central es rico en residuos de prolina y tiene solamente un sitio de unión a calcio (Ca^{2+}) de alta afinidad, para la función de chaperona tipo lectina. Este dominio también interactúa con la proteína perforina, que es un componente importante de los gránulos de las células T citotóxicas. Al igual que el dominio N, el dominio P le otorga a la proteína funciones de chaperona, lo que le permite contribuir con el plegamiento correcto de proteínas y glicoproteínas recién sintetizadas; por otra parte, este dominio favorece la unión de calreticulina con la proteína de retículo endoplásmico 57 (Erp57). El dominio C terminal es crítico en el almacenamiento del

calcio en el retículo endoplásmico, contribuyendo con su homeostasis (Mejía *et al.*, 2019). Existe una cuarta región en el extremo C terminal denominada KDEL, formada por una pequeña secuencia de aminoácidos de lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y leucina, esta constituye un dominio de retención en el retículo endoplásmico para la proteína calreticulina, que permite que después de su procesamiento en el aparato de Golgi, esta sea devuelta al retículo endoplásmico y no sea transportada fuera del citoplasma (Velázquez *et al.*, 2015).

Además de su localización en el RE, la CRT se encuentra en diferentes compartimentos subcelulares como el núcleo y el citoplasma, para regular procesos celulares como son el procesamiento y presentación de antígenos en la respuesta inmune, la fagocitosis de las células cancerosas por medio de las células dendríticas, la fagocitosis de las células apoptóticas, así como la adhesión, migración y proliferación celular. Junto con otras chaperonas, participa en el plegamiento correcto de las proteínas (por medio de su sitio con actividad de lectina) (Obeid *et al.*, 2005).

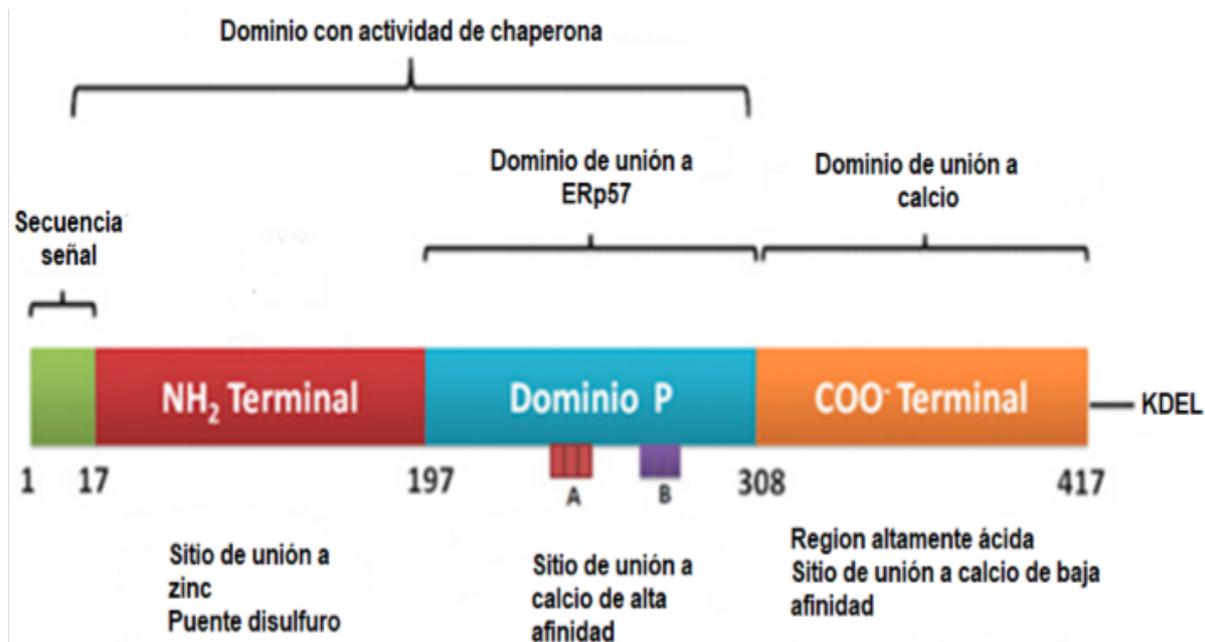


Figura 6. Dominios estructurales y funcionales de la calreticulina humana. La calreticulina posee sitios de unión a Ca^{2+} de baja y alta afinidad, así como una región que presenta gran cantidad de prolina (dominio P). En las regiones NH₂ y COOH terminales se localizan secuencia señal y retención en el retículo endoplásmico, respectivamente. Tomada de Velázquez Flores 2015.

2.12 Calreticulina de otros parásitos

La calreticulina de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT), tiene un peso molecular de 45 kDa, en su secuencia se han descrito los mismos dominios (N, P y C) con funciones similares a los presentes en CRT humana. En ensayos *in vitro*, se ha observado que TcCRT es translocada, desde el RE, a la zona de emergencia flagelar en los tripomastigotes, donde, gracias a su dominio S, captura C1 (Bergeron *et al.*, 1994) que es el primer componente de la vía clásica del sistema del complemento. La interacción de TcCRT con las colas de C1q inhibe su activación, impidiendo la iniciación de esta vía (Ferreira *et al.*, 2004).

Constituye un mecanismo de los tripomastigotes para resistir la lisis mediada por el sistema del complemento de su hospedero. Adicionalmente, la unión de C1q a TcCRT en la superficie de los tripomastigotes produce un aumento de la infectividad, ya que imitan una señal fisiológica de remoción de células en apoptosis.

Las células en apoptosis exponen CRT en su membrana, al unir C1q, se genera una señal “eat me” que es reconocida por los macrófagos, a través de su CRT (también translocada a la superficie celular) con lo que eliminan a la célula en apoptosis mediante fagocitosis, en consecuencia, la unión de TcCRT a C1q en los tripomastigotes le permite al parásito evadir la lisis mediada por el complemento y aumentar su infectividad (**figura 7**) (Bergeron *et al.*, 1994).

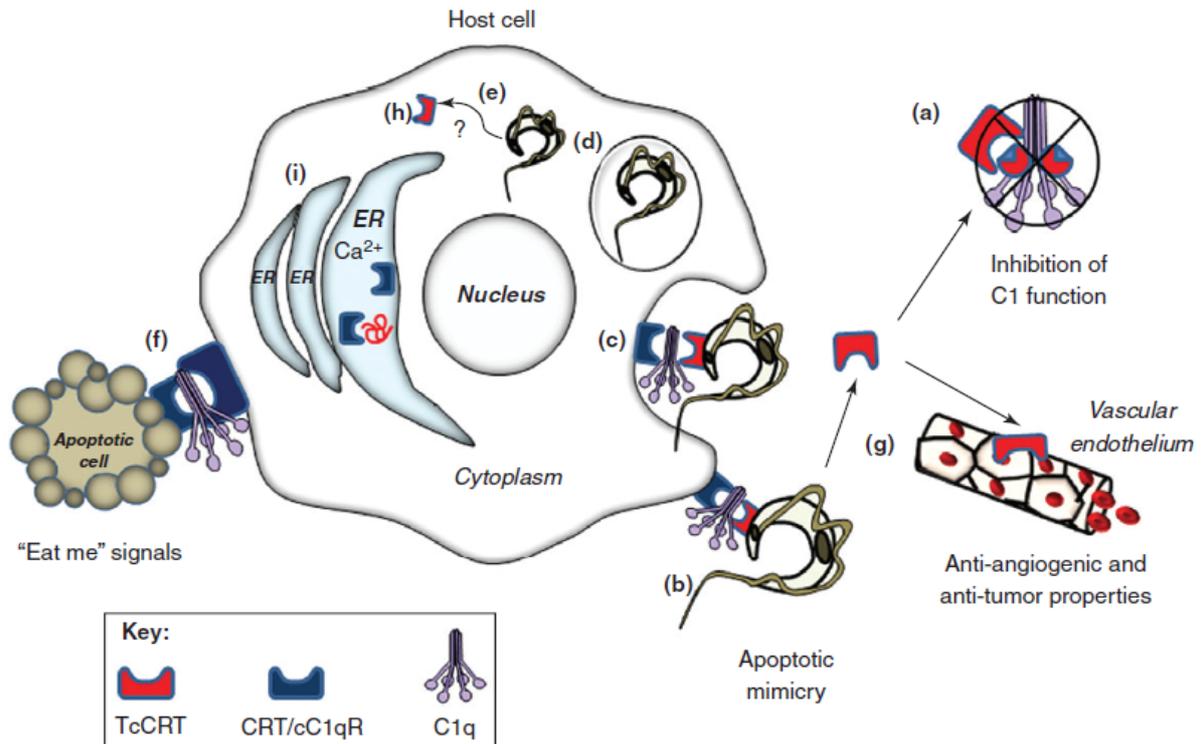


Figura 7. Resumen de las diversas funciones de TcCRT. Hasta el momento se han descrito funciones anti-tumorales, anti-angiogénicas, de inhibición del sistema del complemento y de imitación de apoptosis para TcCRT. **(a)** TcCRT interactúa con el primer componente del complemento de fase fluida C1, inhibiendo la vía clásica en las etapas de activación más tempranas. **(b)** TcCRT recluta a C1, promoviendo así la infectividad. Probablemente, C1 actúa como un puente entre los TRC del parásito y el huésped. **(c)** Este parásito invade las células de los mamíferos y **(d)** para continuar su ciclo de vida (incluida su retención en la vacuola **(e)** Quizás, la TcCRT se libera posteriormente al citoplasma de la célula huésped. **(f)** Las interacciones CRT-C1q se han descrito en las células apoptóticas como factores promotores de su eliminación. Por lo tanto, las señales de "comeme" promoverán la absorción del parásito por los macrófagos **(g)**. Además, TcCRT se une a las células endoteliales, inhibiendo su morfogénesis, migración y proliferación. **(h)** Si, dentro de la célula infectada, TcCRT cumple otras funciones relevantes para la interacción huésped-parásito es desconocido. **(i)** En los mamíferos, la CRT tiene papeles importantes en el RE derivado de su capacidad para unirse al Ca^{2+} y de su participación como chaperona en el proceso de plegamiento de proteínas. Tomada de Ramírez *et al.*, 2011.

2.13 Calreticulina de *Taenia solium*

La rTsCRT fue clonada y expresada como una proteína funcional con unión a Ca^{2+} , para esto se utilizó un plásmido recombinante pET23A-CRT **(figura 8)** con resistencia a ampicilina el cual contiene el fragmento de cDNA que codifica para la rTsCRT (Mendlovic *et al.*, 2004).

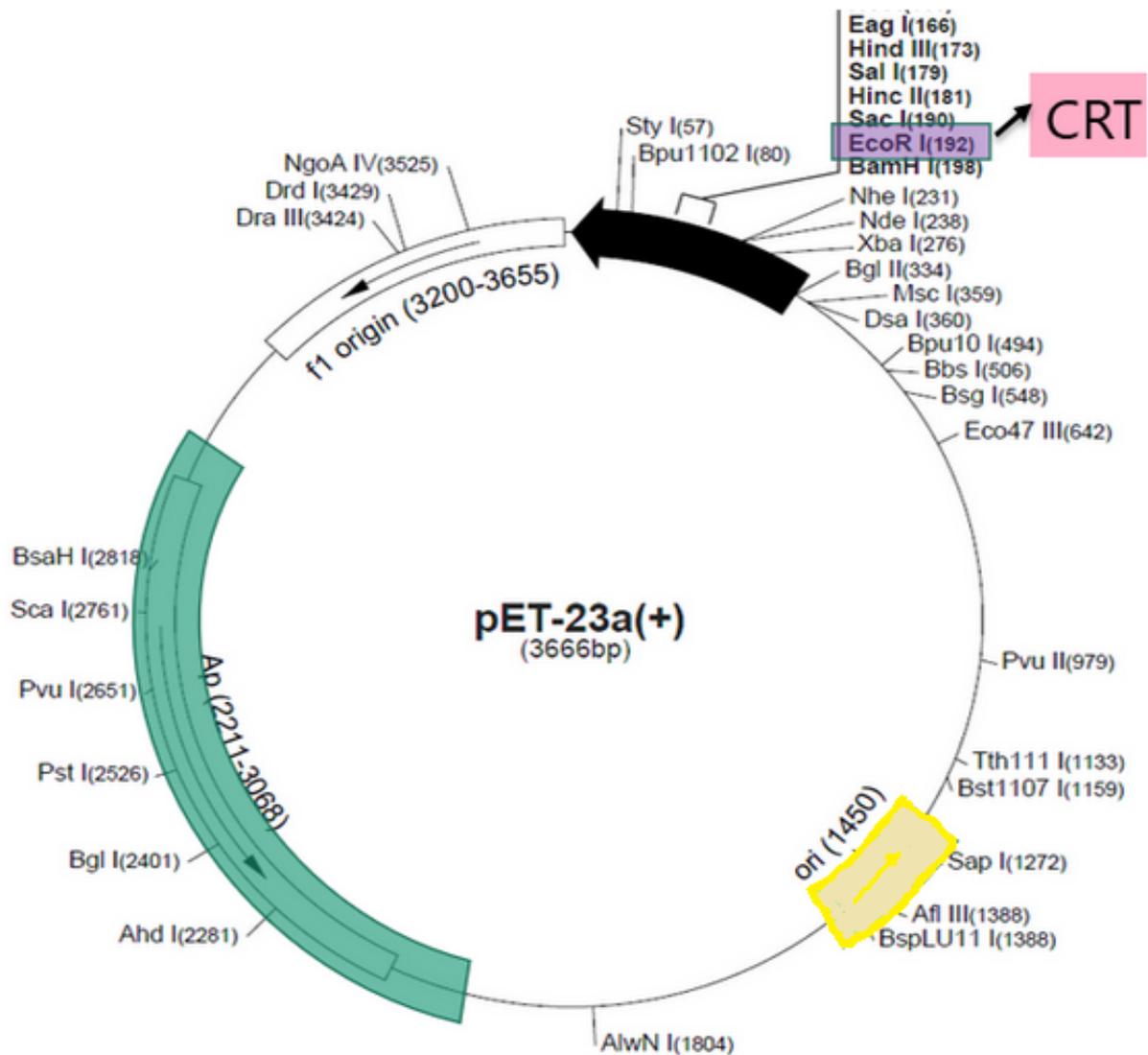


Figura 8. Plásmido pET-23aCRT. En verde el gen con la resistencia a antibiótico para la selección de las bacterias en este caso Ampicilina, en amarillo ori que es el origen de replicación, en morado EcoRI es la enzima de restricción donde se introdujo la secuencia de TsCRT.

Se ha visto que esta proteína puede ser expresada diferencialmente durante las etapas de la vida del desarrollo de *T. solium*, especialmente durante la gametogénesis y la embriogénesis, sugiriendo funciones clave en el desarrollo del parásito, asimismo se han realizado análisis de la expresión diferencial en estadios de desarrollo de *T. solium* usando anticuerpos específicos contra la calreticulina de *T. solium*, para corroborar que se localiza en el tegumento y músculos de las ventosas y róstelo tanto en el cisticerco como en el adulto, además de ser un producto de excreción-secreción del parásito (Mendlovic *et al.*2006), se observó en la etapa temprana del útero grávido, la mórula y los embriones la presencia de

TsCRT, sin embargo, la expresión disminuyó a medida que avanzaba el desarrollo embrionario y estaba ausente en las oncosferas completamente desarrolladas que estaban rodeadas por un embrión. Estos datos indican que la expresión de calreticulina está regulada espacial y temporalmente durante el desarrollo de *T. solium*, especialmente durante el desarrollo de las células germinales y la embriogénesis.

Se ha visto que la CRT de *T. solium* tiene una homología con la CRT del humano del 49.16% y con ratón del 49% (Persson *et al.*, 2002). Al igual que la del humano, la CRT de *T. solium* contiene siete histidinas, cuatro de las cuales se localizan en el dominio N en posiciones conservadas, por lo que tienen un papel importante en la interacción con Zn⁺⁺, la naturaleza ácida está dada por el alto porcentaje de ácido glutámico en el dominio C y está relacionado con alta capacidad de unir Ca⁺⁺ (Mendlovic *et al.*, 2004).

2.14 Capacidad inmunomoduladora de la rTsCRT

Como ya se mencionó, esta proteína tiene mucha relevancia, por lo que se requiere investigar su rol inmunogénico y sus funciones adicionales a las ya descritas anteriormente; entre las que destaca su capacidad inmunomoduladora.

La estimulación *in vitro* de células de bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de ratones inmunizados con rTsCRT por vía oral, induce la producción de IL-4 e IL-5 de ratones inmunizados por vía oral y subcutánea (Fonseca, *et al.* 2011). Además, se demostró que la rTsCRT induce la expresión de IL-10 en células de bazo y NLM de hámsters infectados por *Taenia solium* (Mendlovic *et al.* 2015), en un modelo de colitis inducida por TNBS, se demostró que la inmunización oral con rTsCRT protege contra la inflamación intestinal (Mendlovic *et al.* 2017). Finalmente, la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 está regulada positivamente en un modelo de colitis murino inducido por DSS, se ha visto que la rTsCRT tiene la capacidad de disminuir el grado de inflamación en el intestino de estos ratones, aunque los niveles de expresión de IL-6 fueron altos en la región media y distal del colon (Oldak *et al.*, 2019).

2.15 Respuesta inmune de los ratones Balb/c

Todos los seres vivos multicelulares, vegetales y animales, tienen sistemas de defensa celular y molecular contra agentes patógenos. Los sistemas de inmunidad innatos se encuentran en vertebrados e invertebrados, la inmunidad adaptativa, que depende de los linfocitos y está mediada por anticuerpos y células T, sólo evolucionó en el subfilo vertebrata (**figura 9**), los sitios donde se desarrollan células inmunitarias (órganos linfoides primarios) están separados de donde generan una respuesta inmunitaria (tejido linfoide secundario). De igual modo, los sitios que apoyan el desarrollo de células B y células mieloides, están separados de sitios que generan células T maduras, todos los vertebrados tienen tejido linfoide asociado al intestino (GALT), pero sólo los vertebrados con mandíbulas tienen un timo y un bazo bien desarrollados (Owen *et al.*, 2014).

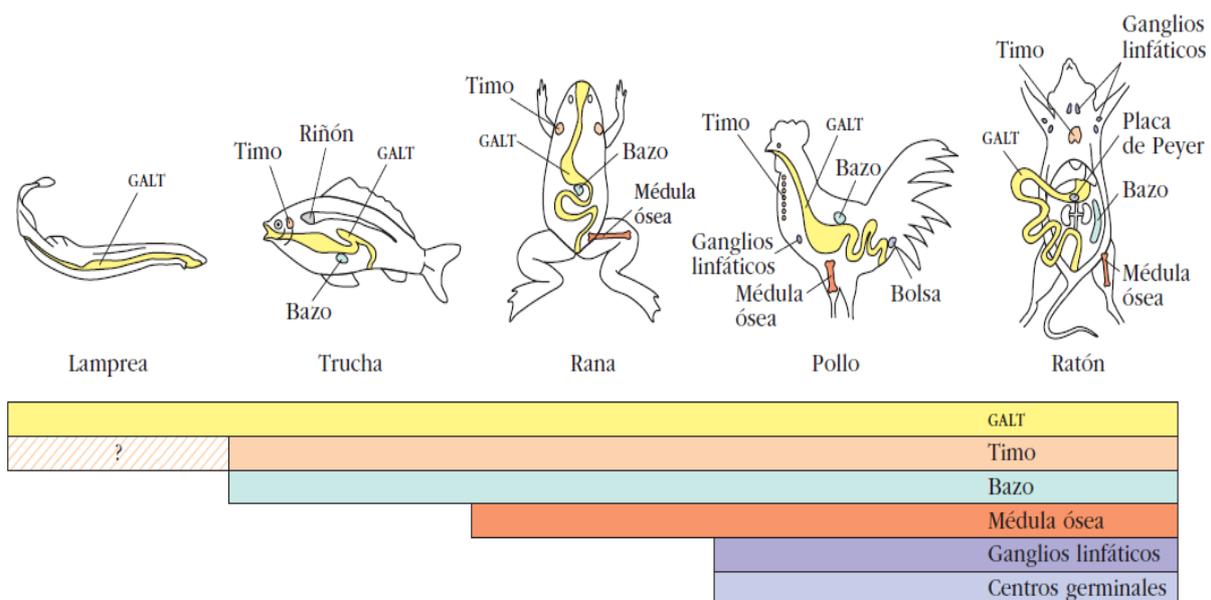


Figura 9. Distribución evolutiva de tejidos linfoides. Se muestra la presencia de tejidos linfoides y la ubicación de los mismos en varios órdenes importantes de vertebrados. Adaptado de Dupasquier y M. Flajnik, 2004.

Así mismo todos los mamíferos poseen genes que codifican inmunoglobulinas (cuadro 2), expresándose cuatro o cinco clases (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD), aunque no todas se han identificado en todas las especies.

En ratón se han identificado cinco clases de inmunoglobulinas: IgG que es la más abundante, representa un 60-70% y tiene cuatro subclases: IgG1 que representa un 20-30%, IgG2a 5-8%, IgG2b e IgG3 del 1-3%; de IgA solo dos: IgA1 e IgA2 donde,

IgA1 representa un 80-90% de la IgA sérica total y un 50-74% de las secreciones, para IgM, IgE e IgD no hay ninguna subclase (Murphy *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Clases y subclases de inmunoglobulinas en determinados mamíferos

Especie	Clases de inmunoglobulina				
	IgG	IgA	IgM	IgE	IgD
Caballo	G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7	A	M	E	D
Bóvido	G1, G2, G3	A	M	E	D
Oveja	G1, G2, G3	A1, A2	M	E	D
Cerdo	G1, G2a, G2b, G3, G4	A	M	E	D
Perro	G1, G2, G3, G4	A	M	E1, E2	D
Gato	G1, G2, G3, (¿G4?)	A	M	(¿E1, E2?)	¿?
Ratón	G1, G2a, G2b, G3	A1, A2	M	E	D
Chimpancé	G1, G2, G3	A	M	E	D
Ser humano	G1, G2, G3, G4	A1, A2	M1, M2	E	D

Tomada de Tizard, 2009.

Los ratones BALB/c tienen susceptibilidad genética a las infecciones por parásitos, por ejemplo, al protozoo *Leishmania major*, cuya eliminación requiere una respuesta de Th1, cuando los ratones BALB/c quedan infectados de modo experimental, sus células T CD4 no se diferencian hacia células Th1; en lugar de eso, producen células Th2, que son incapaces de activar macrófagos para inhibir el crecimiento de *Leishmania*, en etapas tempranas de la infección se produce IL-4 lo que al final lleva al fracaso de la eliminación del agente patógeno, y a la muerte del ratón (Murphy *et al.*, 2008).

3- JUSTIFICACIÓN

Se considera que los parásitos helmintos son expertos en modificar la actividad inmunológica de su hospedero. En el caso de la calreticulina recombinante de *Taenia solium*, se ha demostrado que induce una respuesta mezclada Th1/Th2, con predominancia de una respuesta Th2. Asimismo, se ha reportado que al inmunizar ratones BALB/c por vía oral con la proteína recombinante rTsCRT, hay un aumento en la producción de IgA en sus heces y la producción de IL-4 e IL-5 por las células de los ganglios linfáticos mesentéricos después de la reestimulación *in vitro* con la misma proteína. Ratones inmunizados por la vía subcutánea producen altos títulos de IgG en suero, siendo IgG1 el isotipo predominante, (relacionado con la respuesta Th2), mientras que las células de bazo estimuladas *in vitro* producen IL-4, IL-5 y también IFN- γ , lo que indica una respuesta inmune celular mixta Th1/Th2.

Es por ello que este trabajo busca generar evidencia que documente el tipo de respuesta inmune que se genera durante la inmunización por rTsCRT a través de la vía IP, en ratones BALB/c, identificando las poblaciones celulares: linfocitos B, linfocitos T, células NK y NKT así como, el análisis de anticuerpos y citocinas Th1/Th2 en suero.

4- HIPÓTESIS

La inmunización vía intraperitoneal de ratones BALB/c con la proteína rTsCRT inducirá una respuesta mixta Th1/Th2.

5- OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar la respuesta inmune celular y humoral de ratones BALB/c inmunizados con rTsCRT por vía intraperitoneal.

5.2 Particulares

- Transfectar e inducir la expresión en bacterias *E. coli* BL21 con el vector pET23a-TsCRT.
- Purificar la proteína rTsCRT mediante electroforesis, electroelución, diálisis y cuantificarla por el método de Lowry.
- Inmunizar ratones BALB/c por vía IP con la proteína rTsCRT.
- Obtener las células mononucleares de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos para estudiar linfocitos T, B, NK y NKT por citometría de flujo.
- Determinar el título de anticuerpos (IgG, IgG1 e IgG2a e IgA) en suero por ELISA.
- Determinar la presencia de citocinas en el suero por CBA.

6- DISEÑO EXPERIMENTAL

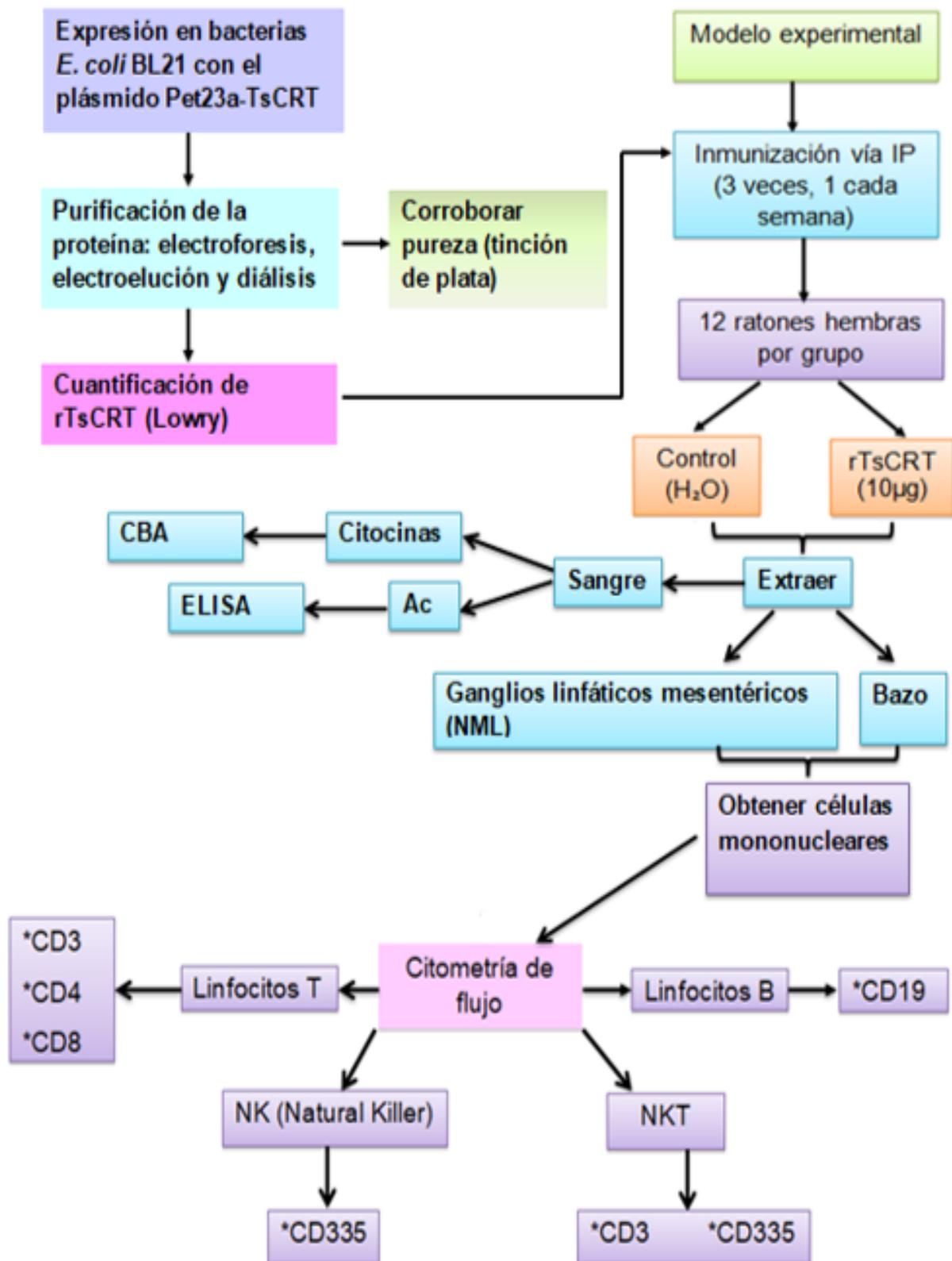


Figura 10. Diseño experimental para la caracterización del tipo de respuesta inmune en ratones BALB/c inmunizados por vía intraperitoneal con rTsCRT.

7- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Expresión

Se inocularon 100 μ L de bacterias *Escherichia coli* BL21, en 10 mL de medio LB en un matraz erlenmeyer y se pusieron en agitación constante a 250 rpm, 37°C hasta llegar a densidad óptica (O.D)₆₀₀=0.6, se incubó en hielo durante 15 minutos, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante para después re-suspender las bacterias en 5 mL de CaCl₂ 100 mM e incubarlas a 4°C por 30 minutos, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante nuevamente; la suspensión celular se re-suspendió en 500 μ L de CaCl₂ 100 mM y, se incubaron 100 μ L de bacterias competentes con 5 μ L del vector pET23a-TsCRT en hielo durante 30 minutos, posteriormente se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 minutos, se agregó 1 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm durante 1 hora, se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm para después re-suspenderlas en 500 μ L de medio LB y así sembrar 100 μ L de las bacterias en cajas Petri con agar LB-ampicilina 50 μ g/mL y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Posteriormente se seleccionaron las colonias que crecieron en las cajas LB+Amp para hacer una doble selección resemebrando las bacterias seleccionadas en agar LB-ampicilina y agar LB-ampicilina-IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopranosido) 1 mM. Se dejaron crecer las bacterias *E. coli* a 37°C durante 12 h para poder elegir las colonias que crecieron solamente en LB-ampicilina. Con la colonia seleccionada, se inocularon 25 mL de LB-ampicilina en un matraz y se dejaron crecer hasta O.D. ₆₀₀=0.6, se indujeron los cultivos con 0.75mM de IPTG hasta alcanzar O.D. ₉₀₀=0.9. Finalmente, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min y se desechó el sobrenadante, se guardaron los botones de bacterias transformadas a -20°C.

7.2 Purificación

Los botones de bacterias transformadas, se sonicaron agregando Tris-HCl 20 mM con inhibidores de proteasas (Roche Complete) más 1.5 μ g de DNAsa y RNAsa, a 40 W, 3 veces, con intervalos de 30 segundos entre cada uno, en baño de hielo. La concentración de proteína obtenida se determinó utilizando el ensayo de BioRad,

basado en el método de Bradford usando una curva de albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones de 0, 125, 250, 500, 750, 1000 y 1250 $\mu\text{g/mL}$, se leyeron con un espectrofotómetro a una absorbancia de 495 nm. Para realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se agregó 100 μg de la muestras sonicada, la cual se diluyó 1:1 con buffer de Laemmli+ β -mercaptoetanol, se mezcló la muestra, se calentó en un termoblock a 100°C durante 10 minutos, se dejó enfriar, se volvió a mezclar y se corrieron a 80 V en geles preparativos al 10% de bis-acrilamida; se hizo una tinción negativa con Imidazol 0.2 M + SDS 0.1% durante 15 minutos en agitación, se enjuagó rápidamente con H₂O bidestilada y se agregó Sulfato de Zinc 0.2N, se cortó la banda con un peso molecular aproximado de 53 KDa y se guardó a -20°C. Para electroeluir se utilizó un electro-elutor modelo 422 (Bio-Rad), en el cuál, se pusieron 8 bandas obtenidas de los geles preparativos en cada tubo de electroelución, y se electroeluyó la proteína de interés utilizando un buffer de electroelución (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 1%) dejándolos toda la noche a 5 mA por tubo, a la mañana siguiente, se hicieron tres cambios de buffer; cada uno con intervalos de 2 horas, para este paso se utilizó buffer de electroelución sin SDS. Se dializó la proteína usando una membrana de diálisis Spectra/Por[®] molecular porous membrane, la cual se hidrató por 15 minutos en agua bidestilada (dd), se puso la proteína en la membrana y se dejó en buffer de electroelución sin SDS durante 24 horas, luego se hicieron 2 cambios de buffer con un intervalo de 12 horas, todo el tiempo en agitación y a 4°C. Se realizó la cuantificación de la proteína dializada por el método de Lowry usando una curva estándar de BSA a las siguientes concentraciones (0, 125, 250, 500, 750, 1000 y 1250 $\mu\text{g/mL}$), se agregaron 5 μL de muestra por pozo con su respectivo duplicado más 25 μL del reactivo A y 200 μL del reactivo B, se dejó incubar durante 10 minutos a T ambiente y se leyó a una absorbancia de 750 nm, por último, la proteína se filtró usando un filtro millipore de 0.22 μm , se hicieron alícuotas y se guardó a -20°C hasta su uso.

7.3 Tinción de plata

Para corroborar la pureza de la rTsCRT se realizó una tinción de plata, para lo cual se colocó el gel SDS-PAGE en la solución fijadora (metanol 40% y ácido acético 10%) durante 20 minutos con agitación, se pasó a otra solución fijadora de

formaldehído (metanol 40% y 37% formaldehído) durante 20 minutos, se lavó con agua dd (bidestilada) durante 5 minutos, se decantó y se repitió dos veces más el lavado, se puso una solución de tiosulfato de sodio 0.2 g/L durante 1 minuto, se lavó con agua dd por 20 segundos, se decantó y se repitió el paso anterior. Se agregó la solución de nitrato de plata 0.1 % se dejó 15 minutos en agitación, se lavó con agua dd durante 20 segundos, se pre-incubó con 25 mL de solución reveladora de tiosulfato por 5 segundos, se decantó y se volvió a agregar 50 mL de la misma solución hasta que aparecieron las bandas y se detuvo la reacción con ácido cítrico 2.3 M.

7.4 Ratones

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad del Bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM y de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, ubicado en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, con una cama de aserrín estéril, la cual se cambiaba cada tercer día, la dieta consistió en alimento comercial para roedores y agua *ad libitum*.

7.5 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos se basaron en la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 sobre Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

7.6 Inmunización

Se inmunizaron por vía intraperitoneal (IP) 2 grupos de 12 ratones BALB/c hembras cada uno de la siguiente manera: grupo 1 con rTsCRT (10 µg) y el grupo 2 control con 100 µL agua inyectable; se inmunizaron una vez por semana durante 3 semanas seguidas, la eutanasia se hizo una semana después por medio de la inhalación de una sobredosis de Sevoflurano y se extrajo: sangre de por punción cardiaca, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos.

7.7 Cultivo de células de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos

Cada órgano por separado se colocó entre dos mallas en una caja Petri estéril y se presionó con el émbolo de una jeringa estéril para macerarlo; se adiciono 1 mL de DPBS (Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) estéril, hasta completar 3 mL para lavar las mallas y obtener las células de cada órgano en suspensión, esto se transfirió a un tubo de 15 ml, los cuales se centrifugaron 10 minutos a 500xg, se tiró el sobrenadante de cada tubo, se re-suspendió suavemente el pellet, con una solución de lisis (NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 10 mM y Na_2EDTA 0.1 mM) en el caso de las células de bazo, y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Para ambos tipos de células se adicionaron 10 mL de DPBS, se centrifugaron a 500xg durante 10 minutos y se decantó (el proceso se repitió 3 veces). Para todas las muestras se hizo un conteo celular en una cámara de Neubauer, a través de exclusión con azul de tripano diluido 1:10.

7.8 Tinción celular para inmunofenotipo

Se puso la cantidad de 1×10^6 células provenientes de cada órgano (bazo y ganglios linfáticos mesentéricos) en un tubo Eppendorf agregando la cantidad recomendada de cada anticuerpo, para Linfocitos T se usaron CD3-PECy7 (clona: 14-2C1, BD Pharmingen™): 0.75 uL por tubo, CD4-FITC (clona: GK1.5BD Pharmingen™): 0.5µL, CD8-PECY5 (clona: 53-6.7, BD Pharmingen™): 0.5 µL, para Linfocitos B: CD19-Alexa flúor 700 (clona: 6D5, BioLegend): 0.5 µL, para Natural Killer: CD335 (NKp46)-brilliant violet 421 (clona: 29A1.4, BioLegend): 0.75 µL y para NKT una tinción doble usando CD3 y CD335 en un volumen final de 100 µL de DPBS (se mezcló con vórtex) y se dejó incubar durante una hora a 4°C y se protegió de la luz, se lavaron 2 veces las células adicionando 1 mL de DPBS, se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se fijaron usando 200 µL de p-formaldehído al 4% por cada millón de células, se dejaron así toda la noche y al día siguiente se hizo un lavado con DPBS y las células se re-suspendieron en 200 µL de DPBS para adquirirlas en el Citómetro de Flujo BD LSR Fortessa y analizarlas en el software *FlowJo*® 7.6.

7.9 Determinación de anticuerpos IgG total, IgG1, IgG2a e IgA en suero de ratones por ELISA

Para la titulación de los anticuerpos IgG, IgG1, IgG2a e IgA anti-rTsCRT se utilizaron los sueros de los ratones inmunizados y controles, el procedimiento se realizó de la siguiente manera: se diluyó el antígeno (rTsCRT) en buffer de carbonatos pH 9.6 para tener una concentración final de 10 µg/mL, se forraron placas de ELISA con 100 µL por pozo y se dejó toda la noche a 4°C, a la mañana siguiente, se desechó la solución y se hicieron 3 lavados con 200 µL por pozo de PBS con tween al 0.05% (Sigma) durante 5 minutos cada uno, se agregaron 100 µL por pozo de leche descremada al 5% en PBS-tween 0.05% y se incubó la placa a 37°C durante 1 hora, nuevamente, se hicieron 3 lavados con 200 µL por pozo de PBS-tween al 0.05% durante 5 minutos cada uno. Para la determinación de IgG total se utilizó el anticuerpo anti-ratón IgG (whole molecule-px, Invitrogen), se agregó al pozo inicial, 0.5 µL en 200 µL de PBS-tween 0.05% (dilución inicial 1:400) de las muestras de suero de animales controles e inmunizados (rTsCRT), para la determinación de las subclase IgG1 se usó el anticuerpo anti-ratón IgG1 (Invitrogen) a una dilución inicial de 1:400, para IgG2a anti-ratón IgG2a a una dilución inicial de 1:200 (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*) y por último IgA usando el anticuerpo anti-ratón IgA (Invitrogen) a una dilución inicial de 1:100, en todas las placas se hicieron diluciones dobles seriadas a partir de la inicial y se dejó incubar durante 2 h a Temperatura (T) ambiente, después de la incubación se hicieron 3 lavados con 200 µL por pozo de PBS-tween al 0.05% durante 5 minutos cada uno, posteriormente se agregaron 100 µL del anticuerpo secundario (1:1000) por pozo, y se dejó incubar durante 2 horas a T ambiente, se realizaron hicieron 3 lavados más con 200 µL por pozo de PBS-tween al 0.05% y finalmente se agregaron 100 µL/pozo de la solución de sustrato (4 mg de orto-feniléndiamina+5 ml de ácido cítrico 0.1M+5 ml citrato de sodio 0.1M y 4 µl de H₂O₂ al 30%), se detuvo la reacción añadiendo 50 µL por pozo de ácido sulfúrico 2N, y se leyó la absorbancia a 490 nm.

7.10 Determinación y cuantificación de citocinas en suero, por Citometría

Se realizó en suero de los ratones utilizando un kit de arreglos citométricos de perlas (BD® Cytometric Bead Array (CBA)) de BioLegend's *LEGENDplex*, el cual consta de dos tipos de perlas (A y B) que están diferenciadas por tamaño e intensidad de fluorescencia y contiene los reactivos para realizar la cuantificación y la curva de referencia para cada una de las citocinas que se analizaron. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: agregando un volumen del buffer assay más el mix de las perlas de detección de citocinas a una dilución $\frac{1}{2}$ de lo sugerido por el proveedor, este kit contiene dos tipos de perlas: (A) que evalúan: IL-4, IL-6, IL-2, TNF- α , IL-5, IFN- γ y las (B) que evalúan: IL-13 e IL-10, está mix de perlas más buffer assay se agrega a cada tubo más un volumen (12.5 μ L) de las muestras de sueros de ratones sin diluir, así como las diluciones seriadas de la curva estándar (C7, C6, C5, C4, C3, C2, C1 y C0). Se dejaron incubar en oscuridad durante dos horas a T ambiente, se adicionó el anticuerpo de detección y se dejó incubar durante una hora más, se adicionó la solución de detección SA-PE (streptavidin-phycoerythrin) 12.5 μ L por tubo y se agitó en vórtex, se incubaron 30 minutos más a T ambiente en oscuridad, se adiciono 100 μ L de buffer de lavado 1X, se agitó, se centrifugó a 1000xg durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante (sin decantar) y se re-suspendieron en 50 μ L de buffer assay, se guardaron a 4°C en oscuridad hasta leer en el citómetro BD FACSAria II y se analizaron en el programa FCAP Array™ v1.0.2.

7.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos tenían una distribución normal y después una prueba de Mann-Whitney usando el programa STATISTICA 8.0. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Se muestra la media y desviación estándar (SD).

7.12 Carta de bioética



FACULTAD DE CIENCIAS

Facultad de Ciencias, UNAM
Cto. Exterior s/n, C.U., 04510
Ciudad de México, CDMX

Folio: T_2019_02_007

Nombre de la comisión: Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias

Nombre del autor del protocolo: Mariana Dinazar Chávez Vargas

Título del proyecto: Caracterización de la respuesta inmune celular inducida por la calreticulina recombinante de *Taenia solium* (rTsCRT) en ratones Balb/c.

Fecha de recepción: 19 de marzo de 2019

Nombre de la institución y sede de la aplicación del protocolo: Facultad de Ciencias, UNAM

Estimada Dra. Ana Flischer Steinbruch

El subcomité de Bioética de la Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias revisó el protocolo arriba mencionado.

El comité resolvió que tanto la metodología como los procedimientos de la investigación cumplen con los lineamientos bioéticos relacionados con el uso y manejo de animales de laboratorio. Los miembros del comité dan una opinión ética favorable sobre la investigación y la forma de aplicación de los procedimientos.

Dictamen: APROBADO

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, CDMX, 20 de junio de 2019

Dr. Ricardo Noguera Solano

Coordinador de la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias, UNAM

cearc@ciencias.unam.mx

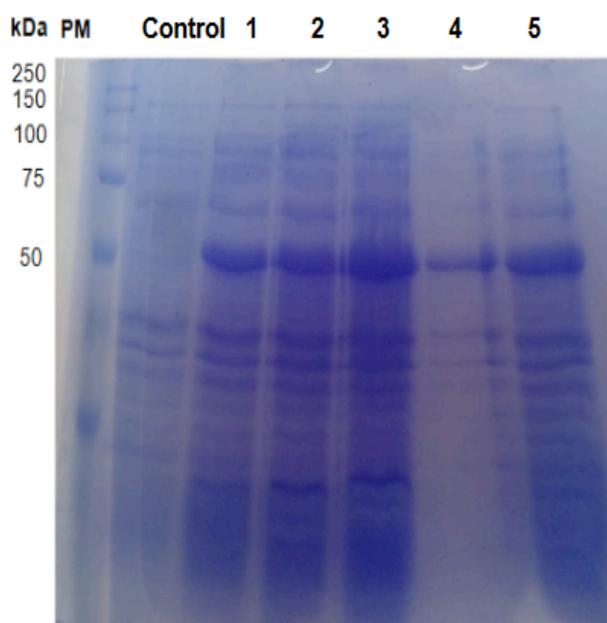


8- RESULTADOS

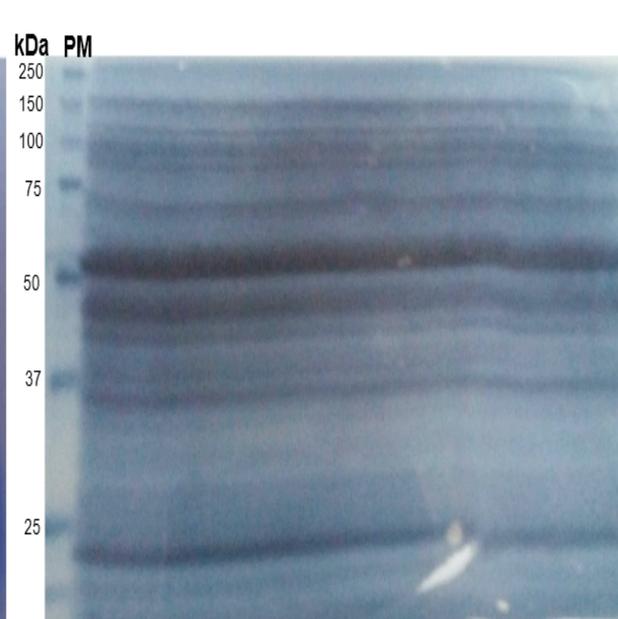
8.1 Expresión y Purificación

A través de la electroforesis SDS-PAGE, se comprobó que las bacterias *Escherichia coli* BL21 expresaron la rTsCRT, en la **figura 11A** se observa en el primer carril el control de bacterias sin expresar, en los carriles del 1-5 en un peso aproximado a los 50 KDa se observa la rTsCRT, donde el carril 4 fue el único que no tuvo una sobre expresión, además de que es el carril en el que se ven menos bandas en otros pesos moleculares. Para la purificación se corrieron geles preparativos como se puede observar en la **figura 11 B** la banda de la proteína de interés está cerca de los 50 KDa, después de la tinción negativa se cortó esta banda, se recolectaron al menos 6-8 bandas, para así electroeluir la con el uso de un electroelutor Biorad para corroborar la pureza se corrieron dos geles uno teñido con azul de coomassie donde se corrieron de 5-10 μg de la proteína por carril, en este gel se puede observar que en los carriles 1,2,3 y 6 se perdió proteína durante el proceso de purificación (**figura 11 C**) y otro para una tinción de plata (**figura 11 D**) donde por carril se corrió 0.5 μg de las distintas alícuotas electroeluidas, al final del proceso se juntó toda la proteína para hacer un stock de todos los electroeluidos, que en total fueron 7.256 mL con una concentración de 402 $\mu\text{g/mL}$.

A)



B)



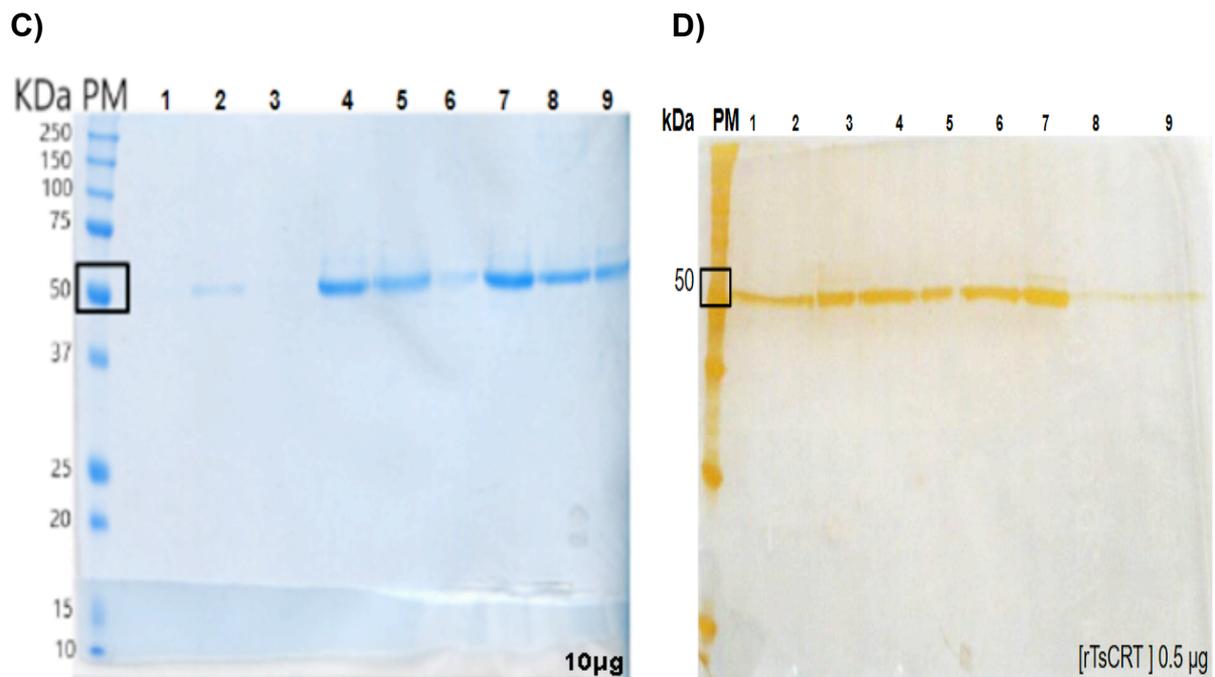
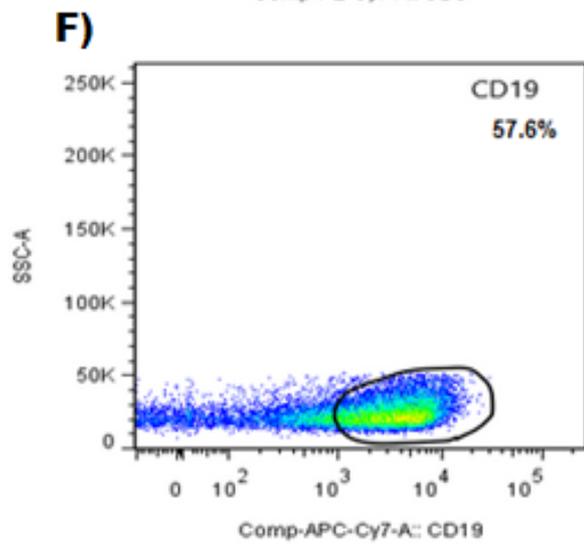
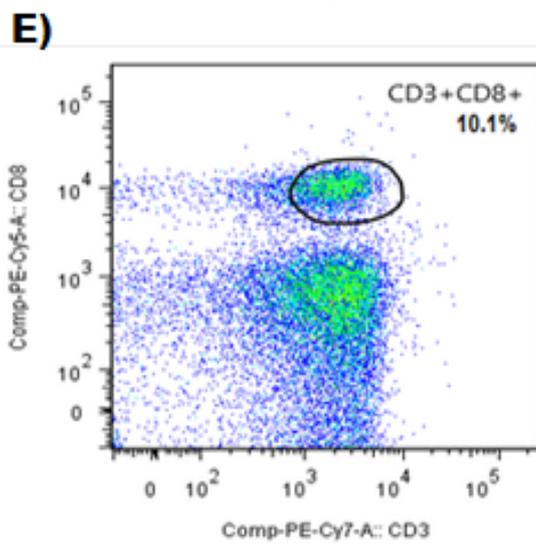
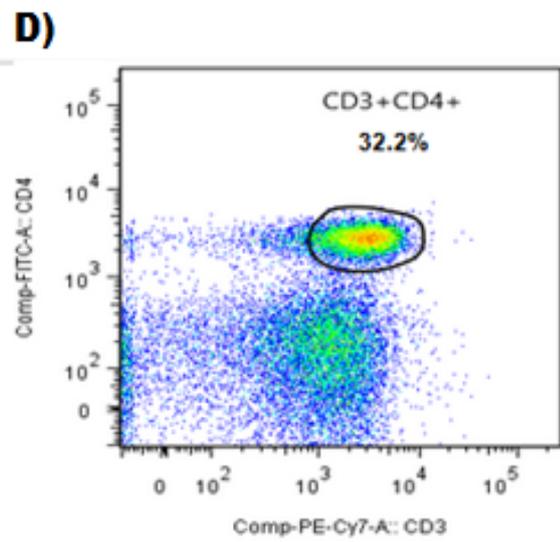
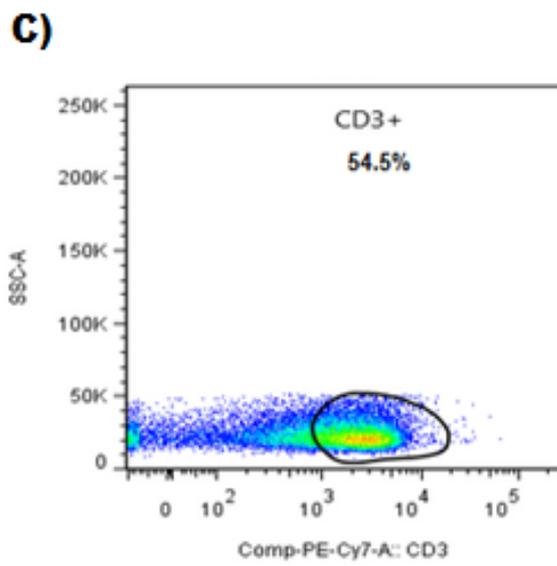
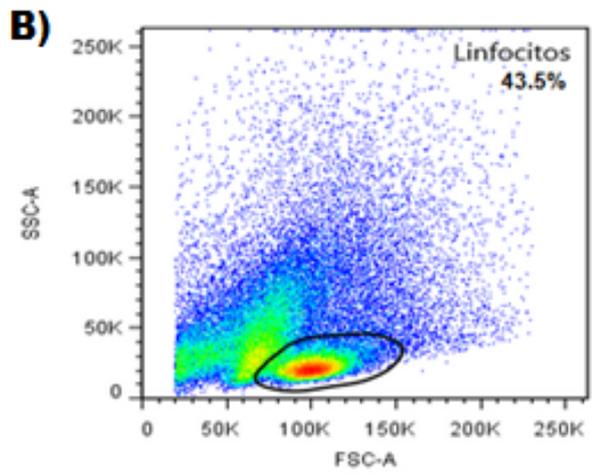
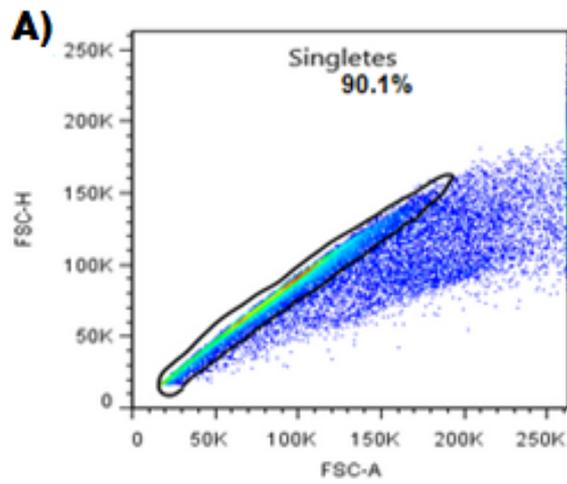


Figura 11. Análisis de la expresión y purificación de la rTsCRT en geles de poliacrilamida. (A) Tinción con azul de Coomassie. Extracto de los pellets de bacterias *E. coli* BL21 transfectadas, (B) Tinción negativa (zinc-imidazol) de un gel de electroforesis y tinción negativa, se observa la banda con un peso aproximado de 53 KDa (C) Análisis de los electroeluidos de rTsCRT con tinción de azul de Coomassie, (D) Análisis de los electroeluidos de rTsCRT con tinción de plata.

8.2 INMUNOFENOTIPO

Para el análisis de la población celular en el citómetro se obtuvieron gráficas de puntos (dot-plot), en donde el primer paso fue seleccionar los eventos sencillos de área del parámetro y de tamaño (FSC-A) y (FSC-H), después la población que corresponde a los linfocitos se seleccionó por tamaño (FSC) y granularidad (SSC) a partir de 20,000 eventos capturados, las poblaciones fueron seleccionadas de acuerdo al marcador correspondiente (**figura 12**).



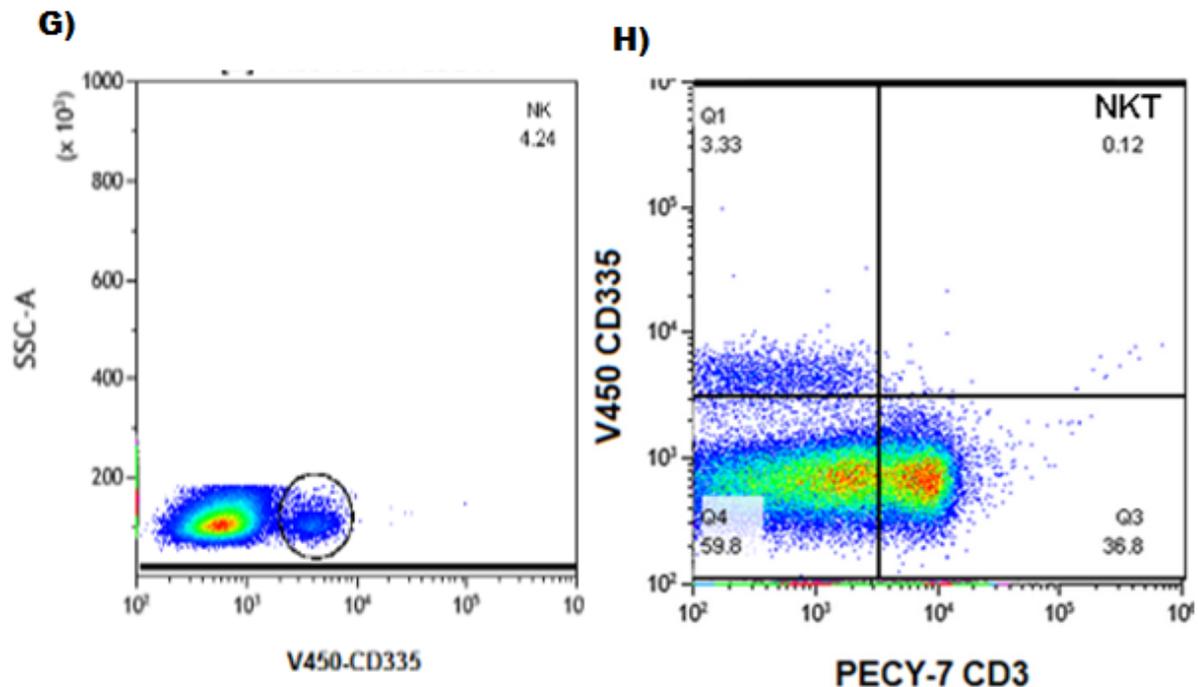
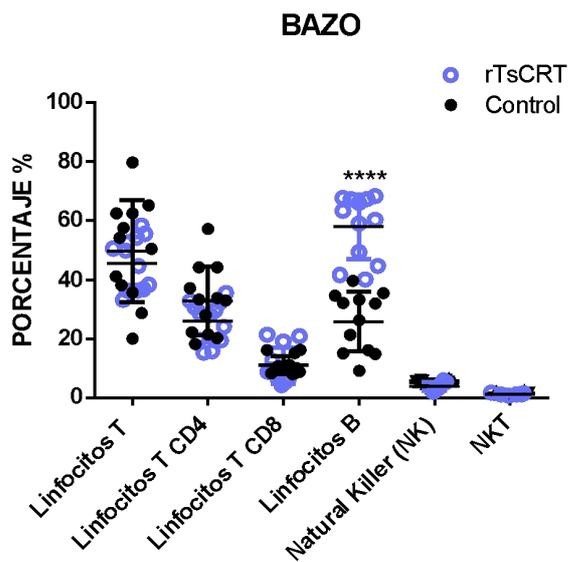


Figura 12. Análisis por citometría de flujo para la identificación de las poblaciones en células de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos. (A) Selección de eventos sencillos, **(B)** selección del patrón de linfocitos, **(C)** Población de linfocitos totales CD3+, **(D)** Población de linfocitos dobles positivos (CD3+CD4+) **(E)** Población de linfocitos dobles positivos (CD3+CD8+), **(F)** Población de linfocitos B (CD19), **(G)** Linfocitos NK (CD335), **(H)** Linfocitos NKT por cuadrante (CD3+CD335+).

Para determinar si la rTsCRT induce el aumento en el porcentaje de linfocitos T, B, NK y NKT, el primer experimento se realizó con la proteína electroeluida, en éste se observó un incremento significativo mínimo de las poblaciones de linfocitos B y una desviación estándar amplia, para su obtención y purificación de los órganos se tuvo dificultad al manejar un gran número de ratones simultáneamente, lo cual constituyó una limitante importante al momento de establecer los cultivos, además los órganos estaban muy pequeños y el número de células era mínimo por lo que en el primer experimento se hizo un pool de las células de ganglios linfáticos mesentéricos. Se propuso dializar la proteína y realizar 2 experimentos más. Se observa en la **figura 13** que la población de linfocitos B en bazo aumenta en respuesta a la inmunización con rTsCRT en ambos casos con una significancia de $p < 0.0001$, en cuanto a los demás grupos celulares se puede observar que ambos grupos el porcentaje de células es similar. En ganglios linfáticos mesentéricos el porcentaje celular de ambos grupos se mantuvo similar en todas las estirpes celulares.

A) Bazo



B) Ganglios linfáticos mesentéricos

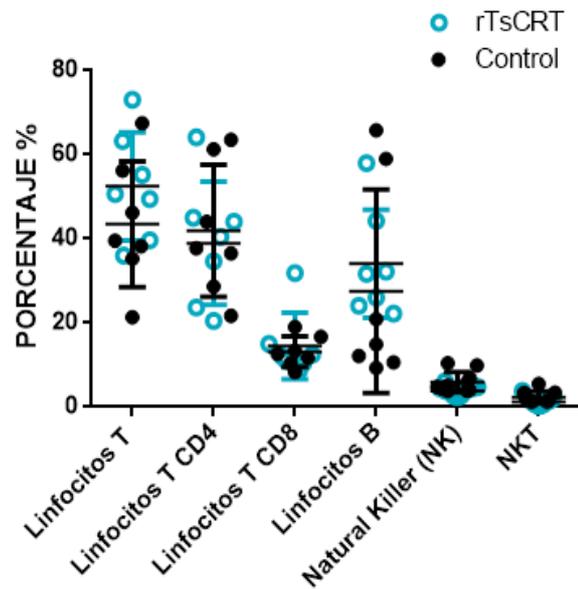


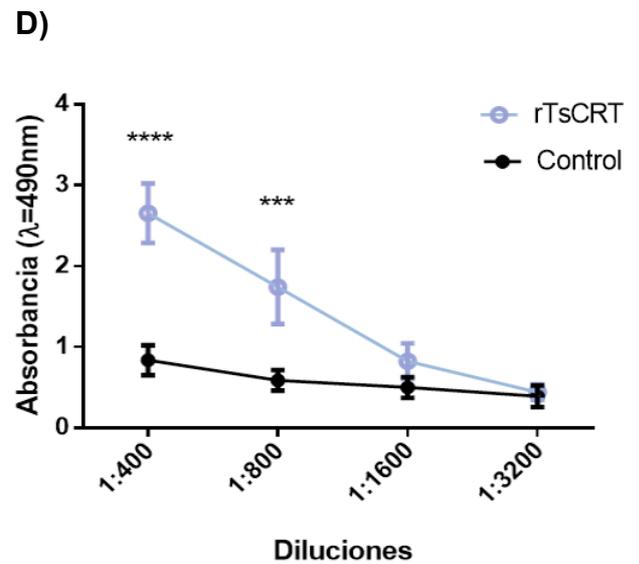
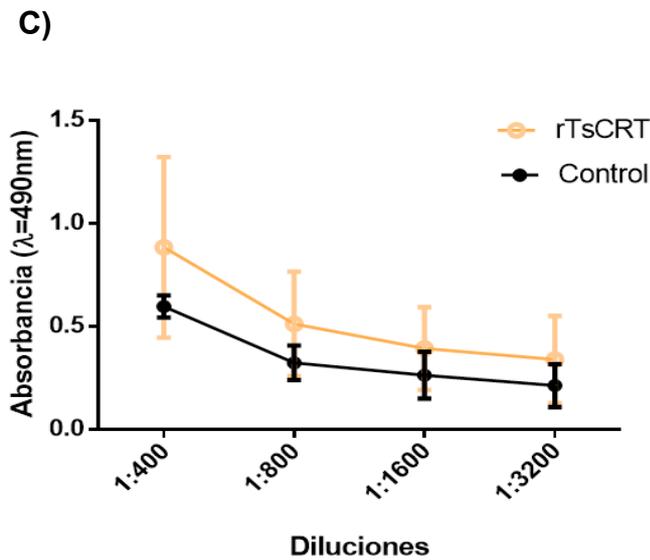
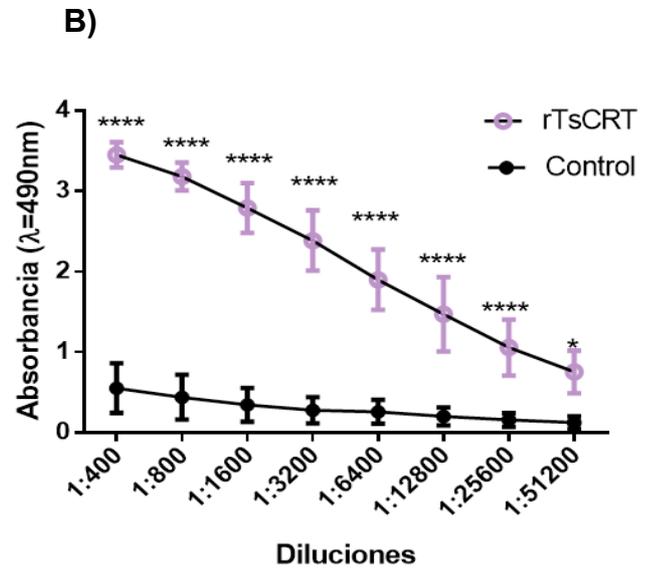
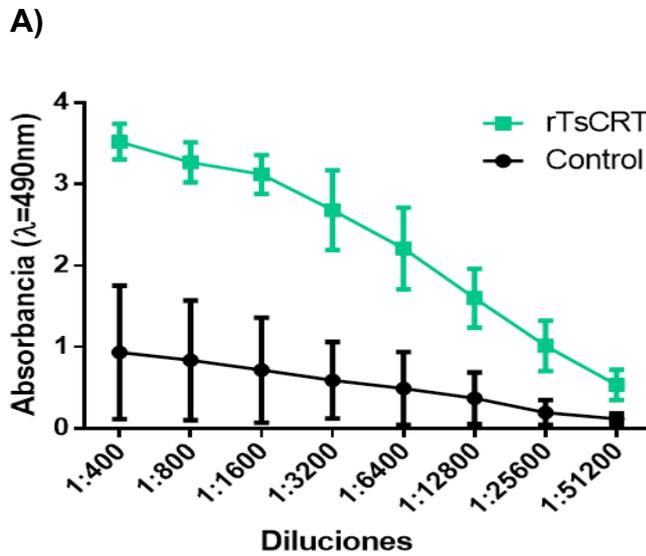
Figura 13. Inmunofenotipo de linfocitos. A) Células de bazo, **B)** Ganglios linfáticos mesentéricos. Cada punto obtenido corresponde a cada ratón y la línea horizontal a la media con la desviación estándar.

8.3 Determinación de anticuerpos IgG totales, IgG1, IgG2a e IgA en suero de ratones por ELISA

Para IgG la primer gráfica (**figura 14A**) muestra en el grupo inmunizado una densidad óptica inicial de 3.5 la cual fue disminuyendo conforme aumentaba la dilución del suero, la tendencia de la curva empezó a bajar en la dilución 1:3200, mientras que el grupo control tuvo una densidad óptica inicial de 1 y fue disminuyendo gradualmente, pero manteniendo una desviación estándar mayor, en la **figura 14B** que es donde la proteína estaba electroeluida y dializada se observa que en la dilución 1:400 la densidad óptica es de 3.5, tiene el mismo valor que la proteína solamente electroeluida, pero en el grupo control es de la mitad 0.5. Por lo tanto, la diferencia entre inmunizados y controles es más clara al analizar los resultados utilizando la proteína electroeluida, y dializada.

En las siguientes gráficas se observó una mayor diferencia en los datos obtenidos con la proteína solamente electroeluida y los que fueron electroeluidos y dializados, para la subclase IgG1 aumenta casi dos veces, la densidad óptica cuando se usa la proteína electroeluida y dializada, sin embargo, para IgG2a no se vio diferencia en

las densidades ópticas de ambas gráficas (**figura 14 E y F**) los valores se traslapan para ambos grupos, en cambio para IgA (**figura 14 H**) aumento 3 veces con respecto a la **figura 14 G** en el grupo de calreticulina.



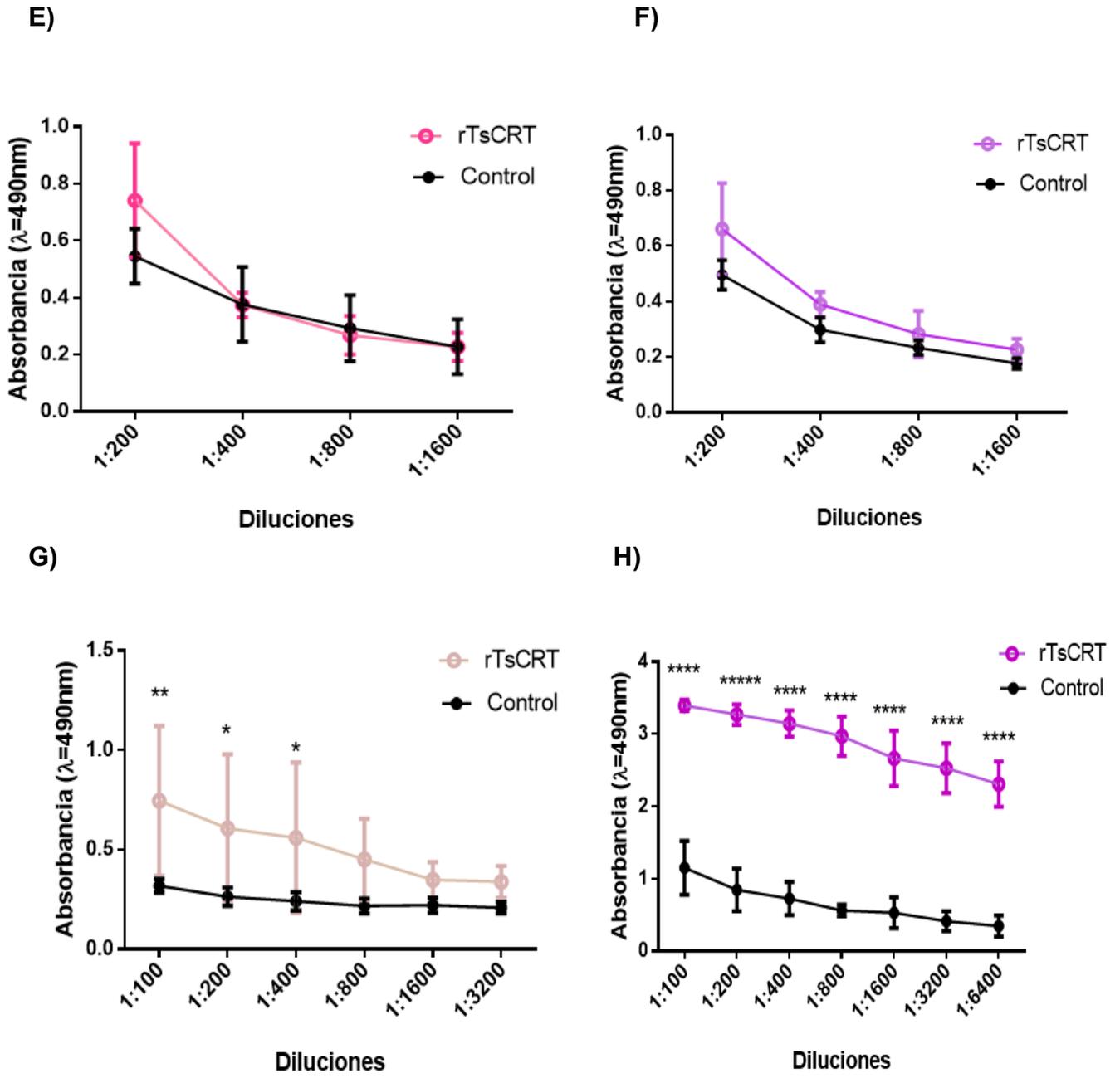


Figura 14. Titulación de anticuerpos anti rTsCRT en suero de ratones inmunizados. A) IgG con proteína electroeluida, B) IgG con calreticulina electroeluida y dializada, C) IgG1 con proteína electroeluida, D) IgG1 con calreticulina electroeluida y dializada, E) IgG2a con proteína electroeluida, F) IgG2a con calreticulina electroeluida y dializada, G) IgA con proteína electroeluida, H) IgA con calreticulina electroeluida y dializada, en todas las gráficas se muestra la media de todos los ratones al igual que la desviación estándar.

8.4 Cuantificación de citocinas en suero por citometría

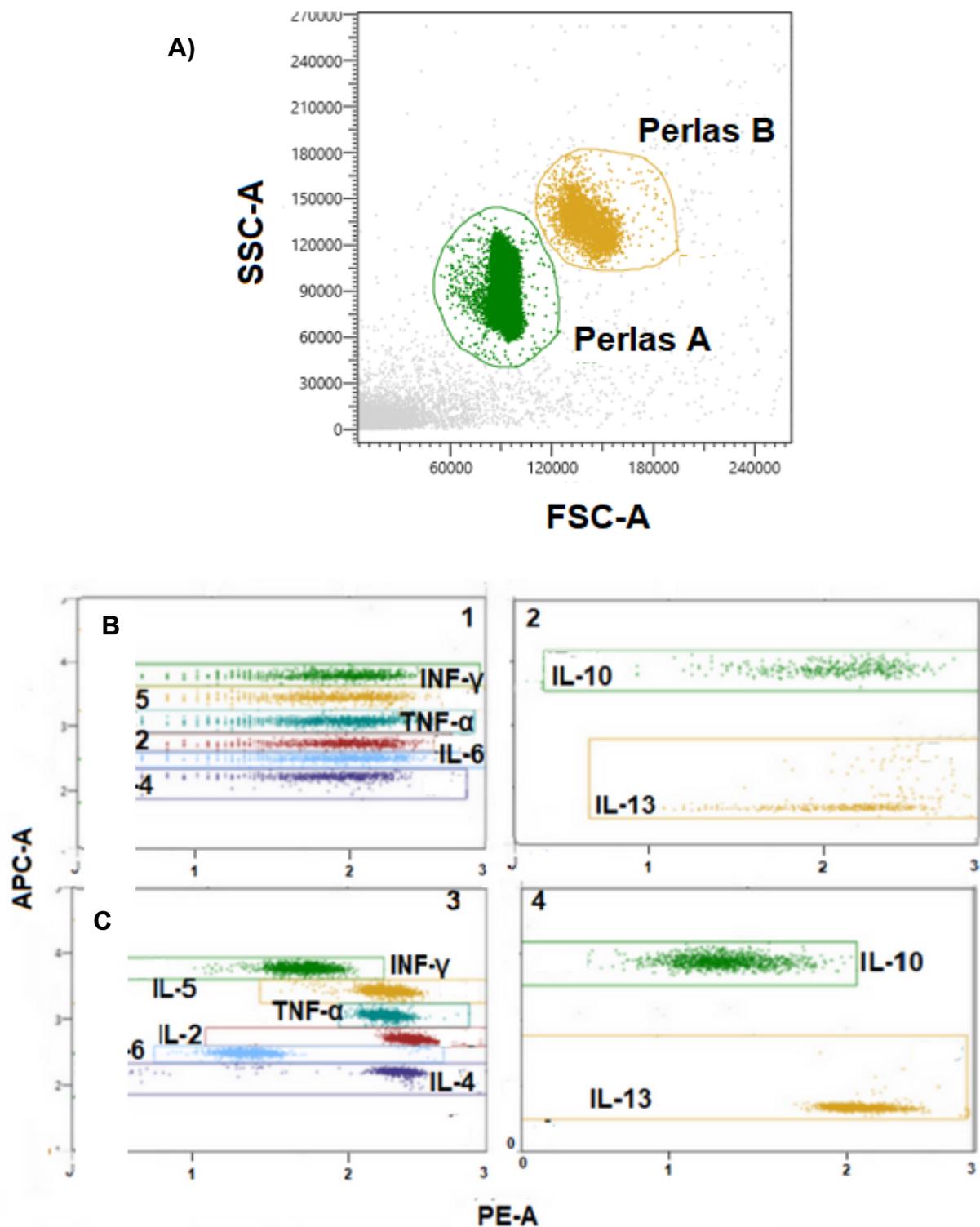


Figura 15. Selección de citocinas. (A) Selección de perlas (A y B) por tamaño (FSC) y granularidad (SSC) (B) Grupo control; 1: perlas A: IL-4, IL-6, IL-2, TNF- α , IL-5, INF- γ , 2: IL-13 e IL-10, (C) Grupo rTsCRT 3: perlas A: IL-4, IL-6, IL-2, TNF- α , IL-5, INF- γ , 4: IL-13 e IL-10.

El principio de las perlas de cuantificación (CBA) se basa en la modificación de la capacidad de fluorescencia de cada una, esta se refleja en incrementos en la intensidad media de fluorescencia (MFI) conforme aumenta la concentración de citocina.

Se hizo un primer experimento para determinar la dilución óptima de la muestra a analizar (suero de los ratones) se usó concentrado, diluido 1:5 y 1:10 al leer en el citómetro FACS Aria II y analizarlo con el software concluimos que la muestra debe usarse concentrada ya que la lectura era mínima al diluir la muestra.

Después de tener el método estandarizado se corrieron las muestras, como se observa en la **figura 16**, hubo un incremento significativo en la concentración de IL-4 ($p=0.0014$) al igual que IL-5 e IL-13 ($p<0.0001$) en los sueros de ratones inmunizados con rTsCRT, así mismo, se observa que en las citocinas donde hubo un incremento la mitad de los datos están por encima de la media por que fueron con la calreticulina electroeluida y dializada y los otros están por debajo ya que fueron con la proteína solamente electroeluida.

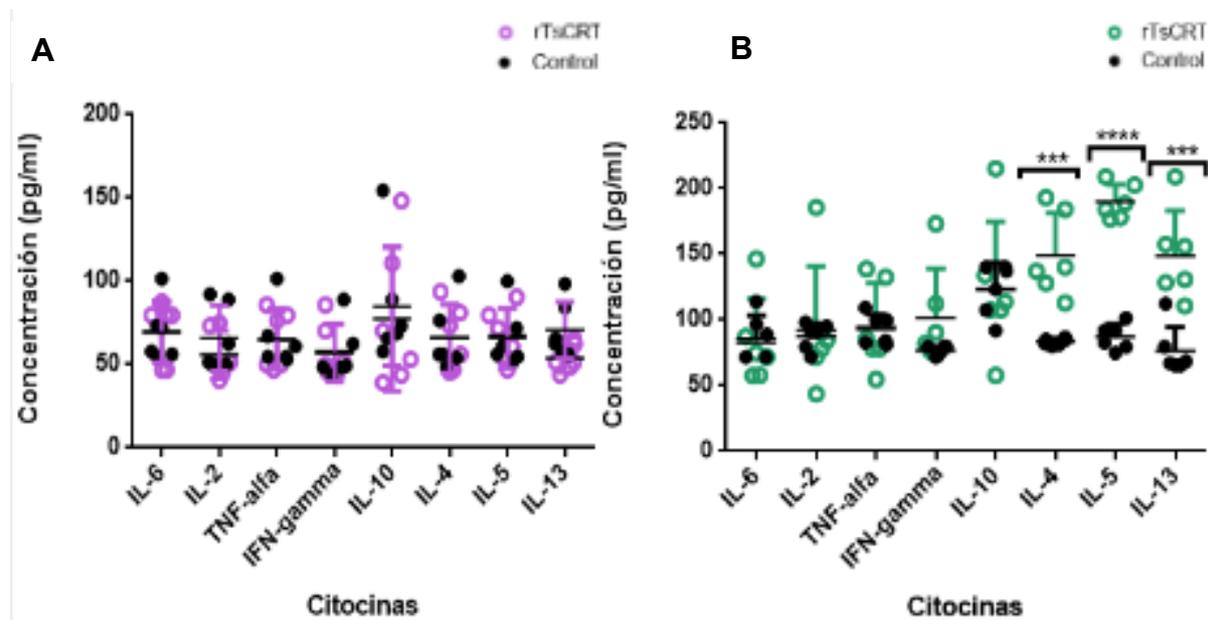


Figura 16. Determinación de citocinas por CBAs en suero de ratones. Se analizaron de manera simultánea 8 citocinas: IL-4, IL-6, IL-2, TNF- α , IL-5, IFN- γ , IL-12 e IL-10. En donde IL-4, IL-5 e IL-13 tuvieron una mayor concentración en los grupos inmunizados de rTsCRT en comparación con los controles. **A)** Se muestran los datos de los ratones que fueron inmunizados con la proteína solamente electroeluida **B)** Se muestran los datos de los ratones que fueron inmunizados con la proteína electroeluida y dializada.

9- DISCUSIÓN

Los mecanismos de la respuesta inmune en contra de los parásitos intestinales han sido ampliamente estudiados en infecciones experimentales de roedores con helmintos (Horii *et al.*, 1993 y Wilkes *et al.*, 2007). En múltiples helmintiasis la respuesta inmune protectora ha sido relacionada con respuestas de tipo Th2, estas respuestas incluyen activación de células CD4+ Th2, IgE, el incremento en los niveles de las citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 es característico (Gause *et al.*, 2003), varios reportes indican que es posible conferir protección con proteínas recombinantes (Geldhof *et al.*, 2007); por ejemplo, la inmunización de ratones con tetraspaninas de *Schistosoma mansoni* que son proteínas integrales de membrana induce una reducción del 32 al 64% en el número de promedio de gusanos adultos y una disminución del 69% en el conteo de huevos en heces (Tran *et al.*, 2006).

La proteína CRT es un objetivo tanto para células como para respuestas inmunes innatas y adaptativas (Ferreira *et al.*, 2004); es uno de los antígenos inmunodominantes que confiere protección en modelos experimentales, por ejemplo, se ha demostrado que rTsCRT induce una respuesta tipo Th2, al estimular *in vitro* linfocitos provenientes de hámsteres con teniosis (Mendlovic *et al.*, 2004) y es capaz de modular una respuesta inflamatoria (colitis) en un modelo de colitis inducida por TNBS y DSS (Oldak *et al.*, 2018), donde la mayor respuesta protectora o inmunoreguladora se le atribuye a una respuesta tipo Th2, por lo cual en este trabajo se evaluó la respuesta inmune inducida por la inmunización vía intraperitoneal con la proteína rTsCRT en ratones BALB/c.

Durante este trabajo se observó que hay un aumento significativo en la producción de linfocitos B en bazo en comparación con el grupo control lo que era de esperarse ya que esto se ha visto anteriormente en el modelo experimental de teniasis, la calreticulina de *T. solium* induce la proliferación de linfocitos de bazo de hámsteres a los 20 días después de la infección (Mendlovic *et al.*, 2011), sin embargo, en ganglios linfáticos mesentéricos (NLM) no hubo diferencias entre ambos grupos, esto podría ser debido a que en la diálisis se eliminan disolventes, sales y metabolitos pequeños, los cuales podrían interferir en la respuesta, así mismo la falta de respuesta en los NLM puede depender de las subpoblaciones de células que participan en la respuesta inmune a nivel local, esto se ha visto anteriormente

en otros estudios donde las células de linfocitos no proliferan en ganglios linfáticos mesentéricos estimulados con ninguna dosis de la proteína (5 o 10 μg) *in vitro* (León *et al.*, 2009). Se sabe que los linfocitos que alcanzan la circulación sistémica pueden no encontrar el microambiente necesario para su proliferación en órganos como ganglios mesentéricos o que algunas proteínas secretadas por nematodos son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos ya que pueden interferir con las señales de transducción de las proteínas que permiten la activación celular (Harnett *et al.* 1999) demostrando que productos secretados por helmintos pueden obstaculizar las señales de transducción en células inmunes (Pfaff *et al.*, 2002).

A su vez, en las células de ambos órganos no se vio una diferencia de los linfocitos T activados los cuales aumentan la expresión de citocinas del tipo: IL-2, IL-4 e IL-6, estos factores inducen la activación completa de los linfocitos B, aunque se ha demostrado que estas pueden activarse de manera independiente de las células T, ya que las células B responden a antígenos tales como lipopolisacáridos y polisacáridos de bacterias, y debido a que en el presente trabajo se observó una alta producción de linfocitos B se realizaron varios ELISAs, analizando la presencia y el título de anticuerpos anti-rTsCRT de clase IgG y las subclases IgG1, IgG2a e IgA, pero la purificación de la proteína representó un obstáculo porque incluye el uso de detergentes como el SDS, para su separación se hacen métodos que no alteren la integridad de la proteína, como **electroelución, cromatografía de columna y gradientes de sacarosa** (Kashino *et al.*, 2003). Se intentó inicialmente con electroelución, sin embargo, los diferentes ensayos realizados permitieron observar que la proteína aún tenía SDS ya que además de verse espumosa los datos mostraban una desviación estándar muy variable (**figura 14**) por lo que se decidió graficar los valores conforme al experimento; una gráfica donde se muestran los datos con la proteína electroeluida y otra electroeluida y dializada, de igual manera puede explicarse por los contaminantes que aún tenía ya que los extractos proteicos pueden incluir una variedad de macromoléculas (ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y otras proteínas) así como una serie de pequeñas moléculas (García *et al.*, 2013), estas últimas se pueden separar fácilmente de las proteínas por métodos basados en la talla molecular, tales como **la diálisis, la ultrafiltración o la filtración en gel** (García *et al.*, 2013), por eso, fue que se tomó la decisión de dializarla con una membrana de corte de **10,000 o 15,000 Daltones**, una ventaja de

esta técnica de purificación es la eliminación de otras proteínas o moléculas ya que el poro de la membrana usada no permite que la proteína se salga (Rubio et al., 2005).

En la evaluación de anticuerpos IgG totales se observa que, los animales inmunizados con la rTsCRT presentan una alta producción y título de IgG, la presencia de IgG indica un proceso crónico y de larga evolución, con respecto a las subclases solo se analizaron dos: IgG1 e IgG2a ya que están relacionadas a un perfil Th2 y Th1 respectivamente, aunque se observó que hubo un aumento en ambas inmunoglobulinas, especialmente el título para IgG1 es mucho más alto, mostrando una respuesta Th2 predominante y un aumento de IgG2a solo en la primer dilución, lo que indica un título mucho menor (1:200), con lo anterior podemos hablar de una respuesta Th2 predominante, pero a la vez existe una respuesta Th1. En otros estudios se ha visto que la CRT de *Necátor americanus* es reconocida por anticuerpos IgG1 anti-CRT específicos producidos por ratones infectados con *Heligmosomoides polygyrus* (Rzepecka et al., 2009).

Con respecto a IgA específica hacia rTsCRT se observó un aumento significativo en el suero de ratones inmunizados al ser una inmunización de manera intraperitoneal deducimos que es IgA del tipo sérica. Una proporción de IgA en suero se deriva de las células marginales de la zona B, la evidencia reciente sugiere que las células B activadas en el tejido linfoide pueden alojarse en la zona marginal del bazo y pueden secretarse al torrente sanguíneo. (Leong, K et al., 2014).

Las células NK constituyen una población celular que se activa de forma compleja y que responde mediante diversos mecanismos, que no solo llevan a la eliminación de la célula anormal, sino que también influyen en la activación y la respuesta de otras células de la inmunidad innata y adaptativa, la mayoría de las células NK se encuentra en los órganos linfoides, especialmente en el bazo, la sangre, pero también están ampliamente distribuidas en la piel, el intestino, el hígado, los pulmones y el útero, entre otros tejidos (Abbas et al., 2004). Sin embargo, nosotros no observamos un aumento significativo al buscarlas en órganos como bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de ratones inmunizados con la proteína recombinante, tal vez no hubo un aumento ya que este tipo de células requieren al

menos 2 señales que inducen su activación, provenientes de los diferentes receptores que expresan como el **CD16**, **CD80**, **CD43** y los recién descritos receptores de citotoxicidad natural (NCKs) (Fauriat *et al.*, 2010).

Las NKT tienen una distribución amplia en los tejidos y pueden encontrarse en el tejido linfóide primario y secundario, en este estudio no se observó un aumento significativo en el porcentaje de éstas células en ratones inmunizados con la rTsCRT en bazo, ni en NLM en comparación al grupo control. En otros estudios se ha visto que el desarrollo de estos linfocitos NKT al igual que las células T convencionales, las células NKT se desarrolla a partir de células precursoras tímicas. Las células T CD4+CD8+ inmaduras derivadas de estos precursores dan lugar al linaje de células NKT dependiente de la señalización vía moléculas CD1d expresadas por los timocitos corticales, también es independiente de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, pero dependiente de la β 2-microglobulina (β 2m), este tipo de células reconocen estructuras lipídicas y glicolípicas unidas a moléculas CD1d, co-expresión del receptor de antígeno de células T (TCR $\alpha\beta$) y receptores de células NK, especialmente NKT en ciertas cepas de ratón, estos receptores no fueron medidos en este trabajo pero podría explicar el por lo que no se vio un aumento en este tipo de células.

En cuanto a las citocinas determinadas en este trabajo, se cuantificaron de manera simultánea 8 de ellas: IL-4, IL-5, IL-13 las cuales son características de una respuesta Th2 y las citocinas IL-2, IL-6, IL-10 IFN- γ y TNF- α como indicador de una respuesta tipo Th1, en el experimento de CBA (Cytometric Bead Array), se pudo observar que los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 son mayores en los ratones del grupo inmunizado con rTsCRT, en comparación con los controles esto podría ser debido a que algún factor de transcripción es el que estimula la producción de estas citocinas, por ejemplo, el GATA-3 que actúa como un regulador maestro de la diferenciación Th2 y que aumenta la expresión de los genes de citocinas Th2 como: IL-4, IL-5 e IL-13, además, bloquea la diferenciación Th1 al inhibir la expresión de la cadena transmisora de señales del receptor para la IL-12 (Buron *et al.*, 2014).

La IL-4 se ha implicado en la respuesta inmune protectora contra los helmintos intestinales porque puede influir directamente en las células T y B, el incremento de

esta citocina es consistente con reportes previos que demuestran la habilidad de la CRT de algunos parásitos de inducir la producción de citocinas de tipo Th2, por ejemplo, se ha visto que en células mononucleares estimuladas *ex vivo* con un extracto total de *T. solium*, se encontró un alto porcentaje de células CD19+ y CD56+ en ambos grupos de pacientes (asintomáticos y sintomáticos) que tenían cisticercosis, así mismo, en los casos asintomáticos observaron un aumento en linfocitos T CD8+ y una respuesta predominantemente Th2 con altos niveles de IL-4 e IL-12 en los sobrenadantes de células mononucleares de sangre periférica y en los pacientes sintomáticos mostraron una respuesta inmune celular específica deprimida y niveles elevados de todas las subclases de IgG específicas (Chavarria *et al.* 2006) lo que demuestra la habilidad de este extracto proteico para inducir respuestas alérgicas e inmunes de tipo Th2, como fue el caso también para nosotros, la rTsCRT indujo la producción de IL-4.

La IL-5 es una citocina que estimula el crecimiento de células B y aumenta la secreción de inmunoglobulinas (Owen *et al.*, 2014), en este estudio se observó un aumento significativo de esta interleucina, lo que podría estar relacionado con el aumento en la población de Linfocitos B, y el alto título de anticuerpos IgG y dos de sus subclases IgG1 e IgG2a encontrados. En el grupo inmunizado con la rTsCRT, este aumento se ha visto antes en la inmunización oral de ratones con ésta misma proteína más la toxina colérica como adyuvante. (Fonseca *et al.*, 2011). Lo relevante de este trabajo es que no hubo necesidad de usar algún adyuvante y que la proteína recombinante (rTsCRT) sola, fue capaz de montar esta respuesta en los animales inmunizados por vía IP, aclarando que solo se usó una quinta parte de la concentración utilizada en experimentos anteriores y solo a 3 dosis.

En cuanto a IL-13 también hubo un aumento significativo, lo que sugiere que la calreticulina recombinante de *T. solium*, induce una respuesta inmune Th2, lo que podría ser el resultado de la recirculación de células productoras de IL-13 que se inducen en los mesentéricos, que llega a la mucosa del colon como células efectoras y activadores de otras poblaciones celulares. IL-13 afecta la producción de moco por parte de células caliciformes y se sinergiza con IL-4 e IL-10 en la activación alternativa de los macrófagos, esta citocina es importante porque tiene papel protector que mejora la función de barrera mucosa.

Estos resultados son consistentes con los que se observaron en hámsteres de 9 meses al inmunizarlos vía oral con cisticercos se demostró que, la calreticulina recombinante de *Taenia solium* tiene un efecto sobre la producción local de citocinas modulando la respuesta humoral y celular en el intestino, de igual manera en este trabajo se observó un incremento en la transcripción de mRNA para las citocinas IL-4 e IFN- γ en la mucosa de los animales infectados (Mendlovic et al., 2004). Las células de los nódulos linfáticos mesentéricos de ratones inmunizados vía oral produjeron IL-4 e IL-5 en respuesta a la re-estimulación *in vitro* con la proteína recombinante, lo que sugiere una respuesta inmune tipo Th2 (Fonseca et al., 2011). Cabe mencionar que pacientes asintomáticos, que presentan cisticercosis, presentan alta producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales contribuyen a una buena respuesta humoral, lo cual sugiere una respuesta citotóxica, que conlleva a la muerte del cisticerco dada en su mayoría por una respuesta inmune predominante de tipo Th2 (Chavarria et al., 2006).

Con respecto a las citocinas en las que no se ven diferencias del grupo inmunizado con el control como lo son: IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α todas con un perfil Th1 en algunos estudios en ratones C57BL/6 que fueron inmunizados vía intraperitoneal con un fragmento de los aminoácidos 39-272 de la CRT de ratón la cual ha sido expresada en *E. coli* BL21, se ha visto que en las células de los ganglios linfáticos de los ratones producen menos TNF- α e IFN- γ (Qiu et al., 2012).

La relevancia de este trabajo es que es el primero en estudiar la respuesta inmune celular y humoral al inmunizar ratones vía intraperitoneal con la proteína rTsCRT y sin adyuvante en el cual se demuestra que esta proteína es un potente estimulador de linfocitos B en bazo, y es capaz de inducir inmunoglobulinas IgG, específicamente IgG1 e IgA sérica, además de inducir citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 mostrando que la rTsCRT es capaz de inducir una respuesta inmune predominante Th2 (**figura 17**), sin embargo es necesario conocer más a detalle y profundidad el tipo de respuesta que provoca, al emplearla en diferentes dosis, vías de administración, huéspedes etc, con la finalidad de que en algún momento pueda ser empleada como reguladora de procesos inflamatorios agresivos o como proteína sinérgica con agentes antitumorales.

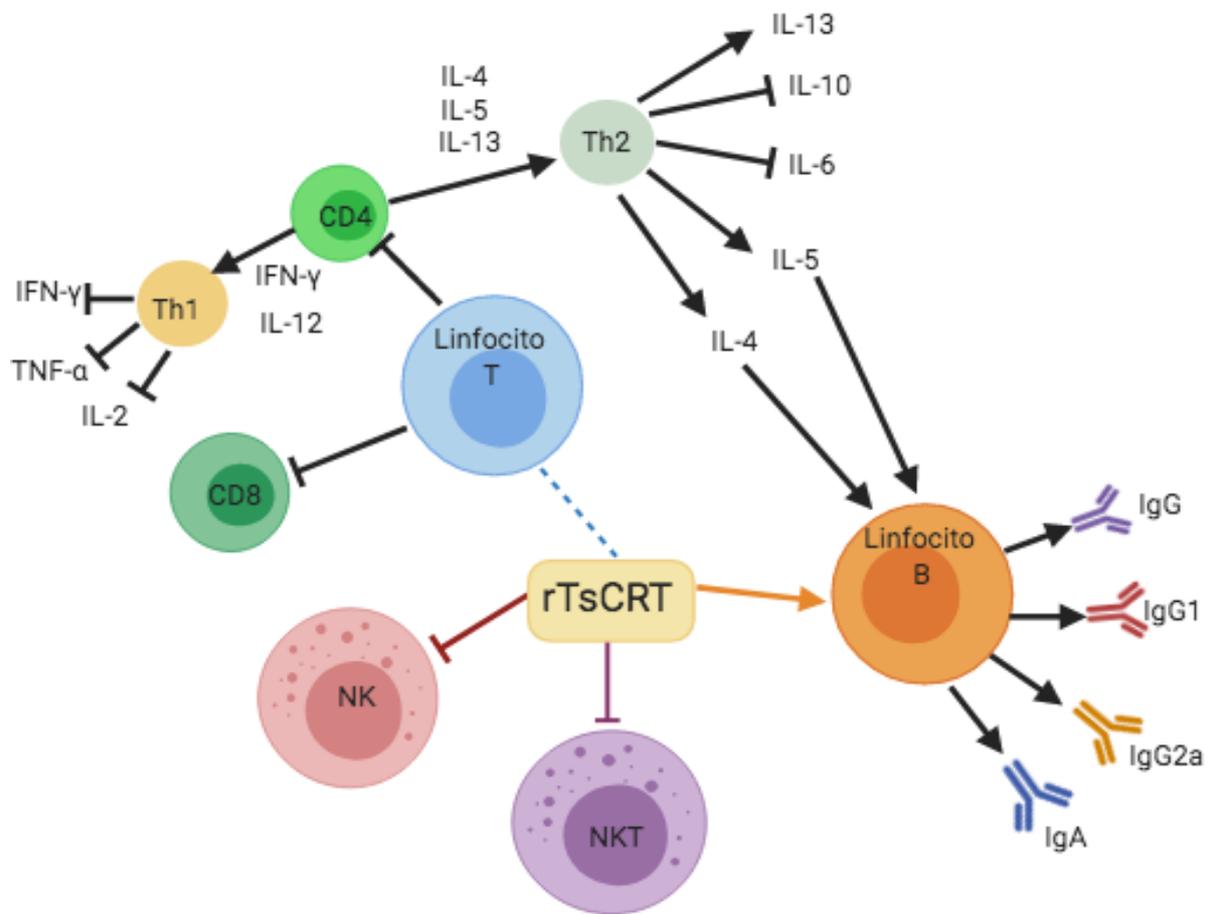


Figura 17. Modelo de la respuesta inmunológica de linfocitos, inmunoglobulinas y citocinas a la rTsCRT

10- CONCLUSIONES

- Se expresó la rTsCRT en bacterias *E. coli* BL21 con el vector pET23a-TsCRT y se obtuvieron 7.256 ml con una concentración de 402 µg/ml de proteína después del proceso de purificación.
- La inmunización intraperitoneal en ratones BALB/c con la proteína rTsCRT, incrementa el porcentaje de linfocitos B en células de bazo.
- La rTsCRT, indujo un alto título de IgG, específicamente IgG1.
- La inmunización intraperitoneal de ratones BALB/c con rTsCRT, induce la producción de IgA sérica.
- Hubo un aumento significativo en la producción de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, en el suero de ratones inmunizados con rTsCRT, lo cual nos indica una respuesta tipo Th2 predominante.

11- REFERENCIAS

Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. 6º Ed. "Inmunología celular y molecular". Sanunders-Elsevier. (2004). (pp 274 y 290)

Amarasekera, M. (2011). Immunoglobulin E in health and disease. *Asia Pacific Allergy*, 1(1), 12-15. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2011.1.1.12>

Arce Hernández, Ada A, & Villaescusa Blanco, Rinaldo. (2003). Inmunoglobulina D: propiedades y relevancia clínica. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 19(2-3)

Avila, G., Benitez, M., Aguilar-Vega, L., & Flisser, A. (2003). Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis. *Parasitology research*, 89(4), 284-289. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0605-8>

Avila, G., Aguilar, L., Romero-Valdovinos, M., Garcia-Vazquez, F., & Flisser, A. (2008). *Cytokine Response in the Intestinal Mucosa of Hamsters Infected with Taenia solium*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 170–173. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.079>

Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY, Williams DB. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends in biochemical sciences*. 1994; 19(3):124-8. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90205-4](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90205-4)

Brandan, N., Aquino, E. J., & Codutti, A. (2007). Respuesta inmunitaria. *Facultad de Medicina UNNE*.

Buron Hernández, J., & Suárez Formigo, G. (2018). Mecanismos epigenéticos en la plasticidad y flexibilidad de los linfocitos T CD4. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 34(1).

Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H.-G., & Bryceson, Y. T. (2009). *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. *Blood*, 115(11), 2167–2176. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238469>

Coppolino, M. G., & Dedhar, S. (1998). Calreticulin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 30(5), 553-558. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00153-2)

Craig, S.W. and Cebra, J.J. Peyer's patches: an enriched source of precursor for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.* 1971, 134:188-191. <https://doi.org/10.1084/jem.134.1.188>

Cruz-Rivera, M., Vaughan, G., Mendlovic, F., Vergara-Castañeda, A., Romero-Valdovinos, M., Leon-Cabrera, S., & Flisser, A. (2014). Cytokine expression at the anchor site in experimental *Taenia solium* infection in hamsters. *Veterinary parasitology*, 200(3-4), 299-302. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.019>

Chavarria A, Fleury A, Bobes RJ, Morales J, Fragoso G, Sciutto E. A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis. *Microbes Infect* 2006, 8:1082-1089. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.11.005>

Chung, J. B., Silverman, M., & Monroe, J. G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in immunology*, 24(6), 342-348. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00119-4)

Dong, C. (2008). *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming*. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 337–348. <https://doi.org/10.1038/nri2295>

Duaso Inostrosa, M. (2011). Estandarización del modelo angiogénico de tapón de Matrigel en ratón y evaluación del efecto de calreticulina de *Trypanosoma cruzi*.

Dupasquier y M. Flajnik, 2004, en *Fundamental Immunology*, 5th ed., W. E. Paul, ed., Lippincott-Raven, Philadelphia.

El Gengehi, N., R. El Ridi, N. A. Tawab, M. El Demellawy and B. L. Mangold (2000). "A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulin." *J Parasitol* 86(5): 993-1000.

[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0993:ASMKBI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0993:ASMKBI]2.0.CO;2)

Erazo-Borrás, L. V., Álvarez-Álvarez, J. A., & Trujillo-Vargas, C. M. (2014). Invariant NKT lymphocytes: Ontogeny, phenotype and function. *Inmunología*, 33(2), 51-59.

<https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2014.01.004>

Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC, et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 2004; 172(5):3042-50.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3042>

Ferreira, V., Molina, M. C., Valck, C., Rojas, Á., Aguilar, L., Ramírez, G., & Ferreira, A. (2004). Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Molecular immunology*, 40(17), 1279-1291.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.11.018>

Fonseca-Coronado, S., Ruiz-Tovar, K., Pérez-Tapia, M., Mendlovic, F., & Flisser, A. (2011). *Taenia solium*: immune response against oral or systemic immunization with purified recombinant calreticulin in mice. *Experimental parasitology*, 127(1), 313-317.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.017>

García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2), 30-39.

Gatica M.D. 2009. Estudio de moléculas chaperonas humanas involucradas en la expresión en superficie de proteínas MICA y MICB en células de melanoma. Memoria de título. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. pp. 75.

Gause, W. C., Urban, J. F., Jr, & Stadecker, M. J. (2003). The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends in immunology*, 24(5), 269–277. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00101-7)

Gallastegui, C., Bernardez, B., Regueira, A., Dávila, C., & Leboreiro, B. (2002). Inmunología. En M. C. Gamundi Planas (Coordinadora), *Farmacia Hospitalaria Tomo II* (págs. 1077-1106). Madrid: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria.

Geldhof, P., De Maere, V., Vercruysse, J., & Claerebout, E. (2007). Recombinant expression systems: the obstacle to helminth vaccines?. *Trends in parasitology*, 23(11), 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.012>

Gonzalez Rivas, E., Ximenez, C., Nieves-Ramirez, M. E., Moran Silva, P., Partida-Rodríguez, O., Hernandez, E. H., ... & Magaña Nuñez, U. (2018). Entamoeba histolytica Calreticulin Induces the Expression of Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated From Patients With Amebic Liver Abscess. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 358. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00358>

Harnett, W., M. R. Deehan, K. M. Houston and M. M. Harnett (1999). "Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein." *Parasite Immunol* 21(12): 601-608. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00267>

Horii, Y., A. I. Khan and Y. Nawa (1993). "Persistent infection of Strongyloides venezuelensis and normal expulsion of Nippostrongylus brasiliensis in Mongolian gerbils, Meriones unguiculatus, with reference to the cellular responses in the intestinal mucosa." *Parasite Immunol* 15(3): 175-179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1993.tb00597>

Jacobsen, K., Kravitz, J., Kincade, P. W., & Osmond, D. G. (1996). Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood*, 87(1), 73-82.

<https://doi.org/10.1182/blood.V87.1.73.bloodjournal87173>

Kashino Y. (2003). Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 797(1-2), 191–216. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00428-8](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00428-8)

Lee, D., Singaravelu, G., Park, B. J., & Ahnn, J. (2007). Differential requirement of unfolded protein response pathway for calreticulin expression in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology*, 372(2), 331-340. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.06.071>

Leon-Cabrera, S., M. Cruz-Rivera, F. Mendlovic, G. Avila-Ramirez, J. C. Carrero, J.P.Laclette and A. Flisser (2009). "Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination." *Methods* 49(4): 346-350. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.07.007>

Leong, K. W., & Ding, J. L. (2014). The unexplored roles of human serum IgA. *DNA and cell biology*, 33(12), 823-829. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2639>

Mejía Ochoa, M., & Acevedo Toro, P. (2019). Calreticulina: aspectos moleculares y técnicas para su detección. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 35(1).

Mendlovic Fela, Respuesta inmunitaria contra calreticulina de *Taenia solium*. *Biomédica* 2011; 31(sup.3):3-315.

Mendlovic, F., Carrillo-Farga, J., Torres, J., Laclette, J. P., & Flisser, A. (2006). Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*. *The Journal of parasitology*, 789-795. <https://doi.org/10.1645/GE-724R1.1>

Mendlovic, F., Ostoa-Saloma, P., Solís, C. F., Martínez-Ocaña, J., Flisser, A., & Laclette, J. P. (2004). Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *Journal of Parasitology*, 90(4), 891-894. <https://doi.org/10.1645/GE-3325RN>

Mendlovic, F., Cruz-Rivera, M., Ávila, G., Vaughan, G., & Flisser, A. (2015). Cytokine, antibody and proliferative cellular responses elicited by *Taenia solium* calreticulin upon experimental infection in hamsters. *PloS one*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121321>

Mendlovic, F., Cruz-Rivera, M., Diaz-Gandarilla, J. A., Flores-Torres, M. A., Avila, G., Perfiliev, M., Salazar, A. M., Arriaga-Pizano, L., Ostrosky-Wegman, P., & Flisser, A. (2017). Orally administered *Taenia solium* Calreticulin prevents experimental intestinal inflammation and is associated with a type 2 immune response. *PloS one*, *12*(10), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186510>

Middendorp S, Nieuwenhuis EE. NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol* 2009; *2*(5):393-402 <https://doi.org/10.1038/mi.2009.99>

Modigliani, Y., Coutinho, A., Pereira, P., Le Douarin, N., Thomas-Vaslin, V., Burlen-Defranoux, O., & Bandeira, A. (1996). Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. *European journal of immunology*, *26*(8), 1807-1815. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260822>

Murphy, K., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. (2017). *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science.9a. Ed. pp 162-163.

Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Muller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demaurex N, Opas M, Michalak M (2001) Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol* *154*: 961–972. <https://doi.org/10.1083/jcb.200102073>

Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Metivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* *13*: 54–61. <https://doi.org/10.1038/nm1523>

Oldak, B., Cruz-Rivera, M., Flisser, A., & Mendlovic, F. (2018). RNA Purity, Real-Time PCR Sensitivity, and Colon Segment Influence mRNA Relative Expression in Murine Dextran Sodium Sulfate Experimental Colitis. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 29(3), 61. <https://doi.org/10.7171/jbt.18-2903-001>

Owen A. Judith, P. J., Strandford A. Sharon. (2014) *kuby Inmunología*, séptima edición ed., México (pp 57-58).

Pavón Romero, Lenin; Jiménez Martínez, María C.; Garcés Álvarez, María Eugenia. *Inmunología molecular, celular y traslacional*. Editorial Wolters Kluwer, Barcelona: 2016. 160-167.

Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 1998; 188: 953-960. <https://doi.org/10.1084/jem.188.5.953>

Pfaff, A. W., H. Schulz-Key, P. T. Soboslay, D. W. Taylor, K. MacLennan and W. H. Hoffmann (2002). "*Litomosoides sigmodontis* cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis." *Int J Parasitol* 32(2): 171-178. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00350-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00350-2)

Puertas Castro, M., & Verdaguer Autonell, J. (2006). Caracterización fenotípica y funcional de los linfocitos B infiltrantes en islotes pancreáticos en ratones Nod. *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Qiu, X., Hong, C., Zhong, Z., Li, Y., Zhang, T., Bao, W., & Gao, X. M. (2012). Modulation of cellular immunity by antibodies against calreticulin. *European journal of immunology*, 42(9), 2419-2430. <https://doi.org/10.1002/eji.201142320>

Ramírez, G., Valck, C., Ferreira, V. P., López, N., & Ferreira, A. (2011). Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host-parasite interplay. *Trends in parasitology*, 27(3), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.007>

Robledo, G. B. V. (2009). Antibodies. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 52(3), 136-138.

Rosenstein, Y., Garcia-Garcia, E., & Becker, I (2015). Mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmune adquirida.

Rzepecka, J., Rausch, S., Klotz, C., Schnöller, C., Kornprobst, T., Hagen, J., & Hartmann, S. (2009). Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Molecular immunology*, 46(6), 1109-1119.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.032>

Rubio, I., Cómbita, A. L., Ortiz-Reyes, B., & Navas, M. C. (2005). Hepatitis C virus Core protein production and purification in baculovirus expresión system for biological assays. *Biomedica*, 25(1), 34-45.

Serrano A.E. 2009. Estudio de regulación de ligandos de NKG2D por interleuquina 10 y su asociación con Calreticulina, en trofoblasto y melanoma humano. Tesis Doctoral. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. pp. 105.

Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and Characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005; 105:4390-8.
<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-11-4284>

Tizard, I. R. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria* (8a. ed.). Barcelona [etc.]: Elsevier. 170-176

Tran, M. H., M. S. Pearson, J. M. Bethony, D. J. Smyth, M. K. Jones, M. Duke, T. A. Don, D. P. McManus, R. Correa-Oliveira and A. Loukas (2006). "Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis." *Nat Med* 12(7): 835-840. <https://doi.org/10.1038/nm1430>

Velázquez Flores, M. Á., Chan Torrano, R., & Ruiz Esparza Garrido, R. (2017). La Calreticulina es un componente central en la regulación de diferentes procesos fisiológicos y patológicos en la célula. *Revista de Educación Bioquímica*, 34(3), 72-80

Vélez, A. C., Castaño, D. M., Gómez, R. D., Orrego, J. C., Moncada, M., & Franco, J. L. (2015). Inmunodeficiencia común variable: caracterización clínica e inmunológica de pacientes e identificación de subgrupos homogéneos con base en la tipificación de subpoblaciones de linfocitos B. *Biomédica*, 35(1).

Vergara, U. (2009). Linfocitos T reguladores y respuesta inmune. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 24(1-2). <https://doi.org/10.5354/0719-5273.2012.18279>

Weinstock, J., Summers, R. and Elliott, D. 2005. Helminths and Harmony. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2004.041749>

Wilkes, C. P., C. Bleay, S. Paterson and M. E. Viney (2007). "The immune response during a *Strongyloides ratti* infection of rats." *Parasite Immunol* 29(7): 339-346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00945>.

Wong-Baeza I, Serafín-López J. Anticuerpos. En: "Inmunología molecular, celular y traslacional", 2016 (enero de 2016). (pp 160-167). ISBN 978-84-16004-86-7. Editores: Lenin Pavón-Romero, María C. Jiménez-Martínez, María Eugenia Garcés-Álvarez. Editorial Wolters-Kluwer, Philadelphia, USA.

Yamashita, M., Katsumata, M., Iwashima, M., Kimura, M., Shimizu, C., Kamata, T., Nakayama, T. (2000). T cell receptor-induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. *The Journal of experimental medicine*, 191(11), 1869–1879. <https://doi.org/10.1084/jem.191.11.1869>