



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio Nacional en Salud: Diagnostico
Molecular y Efecto ambiental en enfermedades
crónico-degenerativas.

**Mecanismos dependientes del factor de
transcripción STAT-1, que inducen
inmunosupresión durante la cisticercosis
experimental murina.**

Tesis para obtener el grado de:

Biólogo.

Presenta:

Alonso Jossael Saucedo Espinosa

Director de tesis:

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El trabajo aquí presentado fue realizado en el área de Citometría de Flujo del Laboratorio Nacional en Salud de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Se financió con recursos del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA)-UNAM números IA209720, IA205622 e IN212722, y con recursos del Programa de Apoyo a Profesores de Carrera (PAPCA) de la FES Iztacala clave: FESI-PAPCA-2021-2022-24. Asimismo, recibí una beca para titulación del programa PAPIIT DGAPA UNAM.

Agradezco a la MVZ. Georgina Díaz Herrera por su apoyo en el manejo adecuado de animales de bioterio.

Al Dr. Rafael Saavedra Durán por la donación de los ratones utilizados, y a la Dra. Araceli Pérez López, por su apoyo en los espacios para la realización de mi proyecto

México. 2022.

“La esperanza es una cosa buena, quizá la mejor de las cosas, y nada bueno se muere nunca”

Stephen King.

“Quisiera encontrar la forma de mostrarles que no son mis dueños. Si voy a morir, quiero morir siendo yo mismo.”

Los juegos del hambre.

“La belleza siempre viene con pensamientos oscuros”

Wish I had An Angel.

Nightwish.

Agradecimientos.

Tengo mucho que agradecer porque a pesar de que no entendemos el porque de las cosas, tenemos el poder de decidir salir todos los días y afrontar al mundo. Por lo que esto es principalmente para mi. Felicidades compañero, lo logramos. Un paso a la vez y no dudes de lo fuerte y capaz que eres.

A lo que sea que reces, querido lector, Dios (Jehová, Ala, Universo... Incluso LUCA) gracias; solo tu sabes cuantas veces imploro tu ayuda en los momentos mas difíciles en el proyecto. Lo logramos.

A mi Familia.

A mi abuela Gloria que ha sido fundamental en mi formación como persona, en especifico en la parte espiritual, en la bondad y fuerza.

A mi tía Angélica por ser un modelo de profesionalismo, carácter y filantropía (a veces jajajaja)

A Mau por su ayuda y sus consejos.

A mi tía Maricela por enseñarme a escribir, a no conformarme y superarme todos los días.

A Ana Laura, por siempre estar ahí para darme un abrazo sincero, un consejo y regañarme, gracias por tanto.

Y en especial a mi madre. Por ser todo para mi, mi cómplice, mi soporte y sobretodo por ayudarme a siempre mirar hacía arriba, a tratar de ser mejor, a ser valiente . Te amo, esto es por ti.

Al Laboratorio Nacional.

A Stephanie por haber sido guía en el labo, y ser una persona excelente conmigo.

A Eli, que siempre nos recuerda que hay momentos en los que es mejor estar relajado y que todo fluya. Gracias.

A Victoria por ser mi compañera de chisme y experimentos. Gracias.

A Eds y a Sebas, mucha suerte y éxito.

A la Dra. Itzel que siempre le digo lo orgulloso que estoy de ella y además ser una guía y un modelo a seguir, sin tu compañía, y sin tu amistad, sin tus palabras de apoyo esto no seria posible.

Al Dr. Efraín, porque me esta dando una de las lecciones de vida mas fuertes que he tenido. Obligarme a confiar en mi mismo y aumentar mi fuerza... aun cuando nadie apueste por ti.

Al Dr. Terrazas por adoptarme en su equipo desde mi lejano 2º semestre, por mostrarme el mundo de la inmunología y nutrir esa pasión por la ciencia al pasar el tiempo.

Y a los integrantes del sínodo: Dra. Mónica Mendoza, Dr. José Luis y la Dra. Martha Salcedo.

A mis Amigos.

A mis amigos de la carrera: Isaac, Fernando, Alexis y Javier, por haber sido el equipo de trabajo donde compartí viajes, practicas, comidas y tragos. Mucho éxito amigos.

A mi comadre Angie con la que compartí momentos únicos en la carrera, gracias por siempre amiga.

A Alejandro, que me compartió de esa confianza (que a ti te sobra en exceso ja ja ja ja)

A Rubén que me recuerda que hay tiempo para una cerveza (copa de vino para mi) y que nunca hay que darnos por vencidos.

Y Akary y Tanit por ser ese salvavidas en los momentos de soledad, sin ustedes en la pandemia me hubiera vuelto mas loco, gracias por las cubas amigos.

También, a mis amigos cercanos que han estado conmigo desde la prepa para apoyarme, reírnos, salir de fiesta o incluso un simple café, el cual puede alumbrarnos incluso en los momentos mas oscuros: Uriel, Ale, Cesar, Mary e Ian.

En especial a mi mejor amigo Leonardo, que nunca me ha dejado solo, y es mi cómplice en crímenes en conciertos, fiestas, salidas. Muchas gracias Leo.

Finalmente al pasar el tiempo hay personas que se van de nuestra vida, su llegada y su partida nos enseñan algo. Siempre. Sin los consejos y el amor de Shay, hoy no seria la persona que soy. A pesar de que ya no estés conmigo, gracias por haber motivado a hacer esta tesis.

*“Adieu, goodbye, auf Wiedersehn
Die Zeit mit dir war schön”*

Adieu

Rammstein.

Índice.

Agradecimientos	4.
Resumen	9.
1. Introducción	10.
1.1 <i>Taenia crassiceps</i>	10.
1.1.2 ciclo de vida.....	10.
1.1.3 Infección	11.
1.1.4 Cepa ORF	12.
1.1.5 Respuesta Inmunológica experimental en la infección con <i>T.crassiceps</i>	12.
1.2 Linfocitos T supresores	14.
1.2.1 Células T reguladoras	14.
1.2.2 Mecanismos de supresión.....	14.
1.3 Células mieloides supresoras	15.
1.3.1 Macrófagos alternativamente activados	16.
1.4 Inmunosupresion	17.
1.4.1 Anergia	17.
1.5 PD1	17.
1.5.1 Estructura de PD1	17.
1.5.2 Señalización y ligandos de PD1	18.
1.6 Tim-3.....	19.
1.6.1 Estructura de Tim3	19.
1.6.2 Señalización y ligandos de Tim3.....	20.
1.7 STAT1.....	21.
1.7.1 Familia STAT.....	22.
1.7.2 Señalización del IFN- γ dependiente de STAT1.....	22.
1.7.3 Ratones deficientes de STAT1 en la infección con <i>Taenia</i> <i>crassiceps</i>	23.
2. Antecedentes directos	24.
3. Justificación	24.
4. Objetivos e hipótesis	24.

5. Materiales y métodos	26.
5.1 Animales.....	26.
5.1.1.Ratones	26.
5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26.
5.2.1 Extracción de DNA	26.
5.2.2 Cuantificación de DNA	26.
5.2.3 PCR	27.
5.2.4 Geles de agarosa	27.
5.3 Parásitos e infección	27.
5.3.1 Obtención de metacéctodos e infección	27.
5.3.2 Conteo de metacéctodos	28.
5.4 Células.....	28.
5.4.1 Obtención de células del peritoneo	28.
5.4.2 Conteo de células	28.
5.5 Citometría de Flujo.....	28.
5.5.1 Inmunofluorescencia de células de peritoneo	28.
5.5.2 Inmunofluorescencia de sangre	29.
5.6 Ensayo de proliferación	30.
5.7 Programas utilizados	31
5.8 Análisis estadísticos	31.
6. Resultados	32.
6.1 Genotipo del ratón <i>STAT1</i> ^{-/-}	32.
6.2 Estado de salud de los ratones	32.
6.3 Carga parasitaria	33.
6.4 Sobrevida de los ratones <i>STAT1</i> ^{-/-} a la infección por <i>T. crassiceps</i>	33.
6.5 Análisis de poblaciones celulares en peritoneo por citometría de flujo. Fase aguda.....	34.
6.5.1 Linaje Mieloide.....	34.
6.5.1.1 Macrófagos F480+.....	34.
6.5.1.2 Células mieloides Gr1+.....	37.
6.5.2 Linaje linfoide	37.

6.5.2.1 Linfocitos Natural killer.....	38.
6.5.2.2 Células B	39.
6.5.2.3 Linfocitos T CD3+.....	41.
6.5.2.4 Células T reguladoras	43.
6.5.2.5 Linfocitos T CD4+.....	45.
6.5.2.6 Linfocitos T CD8+.....	46.
6.6 Análisis de poblaciones celulares en peritoneo por citometría de flujo. Peritoneo. Fase crónica.....	47.
6.6.1 Linaje Mieloide.....	47.
6.6.1.1 Macrófagos F480+.....	48.
6.6.1.2 Células mieloides Gr1+.....	49.
6.6.2 Linaje linfoide	50.
6.6.2.1 Linfocitos Natural killer.....	50.
6.6.2.2 Células B	51.
6.6.2.3 Linfocitos T CD3+.....	52.
6.6.2.4 Células T reguladoras	54.
6.6.2.5 Linfocitos T CD4+.....	55.
6.6.2.6 Linfocitos T CD8+.....	56.
6.7 Ensayo de proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ peritoneales....	57.
6.8 Bazo. Fase aguda y fase crónica	59.
7. Discusión	62.
8. Conclusiones	70.
9. Anexo	71.
10. Bibliografía.....	72.

Resumen: *Taenia crassiceps* es un platelminto endoparásito de la clase céstoda que infecta a zorros rojos, lobos y perros, y que se distribuye de manera endémica en el hemisferio norte de América, Europa y Asia. Diferentes publicaciones han demostrado lo compleja que es la relación del sistema inmunológico del hospedero y la infección por *T. crassiceps*. En estas investigaciones se ha tratado de terminar el papel que juega el sistema inmune en la susceptibilidad o resistencia hacia este parásito. En los estados iniciales de la infección en ratones BALB/c hay una respuesta Th1 aguda con altos niveles de IL-2, interferón gamma (IFN γ) y óxido nítrico (NO), para posteriormente abrir paso a la infección crónica con un perfil Th2 caracterizada por una alta secreción de citocinas antiinflamatorias principalmente IL4 y IL-13, además, IL-6, IL-9, IL-10, IL-25, IL-33 y TGF- β . La consecuencia de esta secreción es la activación y proliferación de linfocitos T con un perfil Th2, y se ha sugerido que también de células T reguladoras. En el presente trabajo se infectó hembras BALB/C (WT) y STAT1 K.O y mediante citometria de flujo se analizó al linaje mieloide y linfoide en la fase aguda (tres semanas) y la fase crónica (diez semanas) así como los marcadores de activación y supresión. Los datos sugieren que a lo largo de la infección hay un perfil supresor mediado por linfocitos T CD4+ en ratones WT, mientras que en ratones ausente de STAT1, hay un perfil anergico mediado por las células NK y los linfocitos T CD8+.

1. Introducción.

1.1 *Taenia crassiceps*.

Taenia crassiceps es un platelminto endoparásito de la clase céstoda que infecta a zorros rojos, lobos y perros, y que se distribuye de manera endémica en el hemisferio norte de América, Europa y Asia (Lescano *et al*, 2013)(Willms *et al*, 2009). Los seres humanos son considerados como un hospedero intermedio, aunque este tipo de infección es muy rara. La literatura médica solo reporta 10 casos hasta el 2011 en pacientes inmunocomprometidos (Lescano *et al*, 2013).

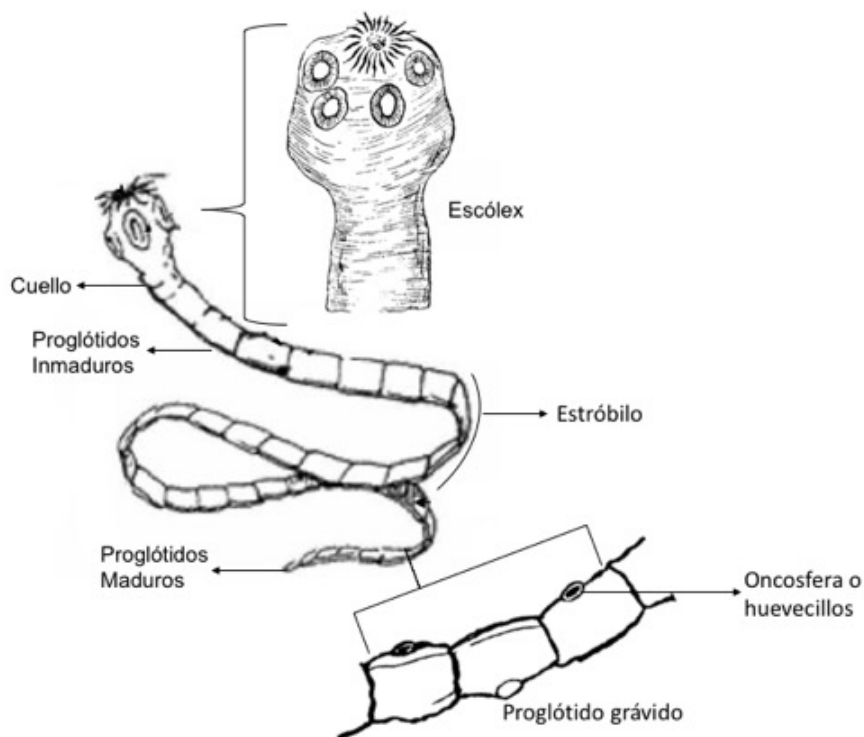


Fig. 1. Morfología de *T. crassiceps*. Los organismos de la clase céstoda usualmente presentan un escólex, un cuello y el estróbilo el cual está dividido en proglótidos que al madurar (un proglótido grávido) llevan consigo huevecillos que salen por la heces del hospedero (Freeman *et al* en 1962).

1.1.2 Ciclo de vida

La forma adulta de *T. crassiceps* infecta a zorros, perros, lobos y felinos (hospederos definitivos). Este parásito se sitúa en el intestino y posteriormente libera huevos los cuales serán excretados en las heces. Las heces serán devoradas por pequeños mamíferos como roedores y conejos (hospederos intermedios), donde el huevo se desarrollará en larva o metacéstodo. El roedor infectado será consumido por

depredadores carnívoros, completando el ciclo de vida (Fig. 2) (Lescano *et al*, 2013) y (Willms *et al*, 2009).

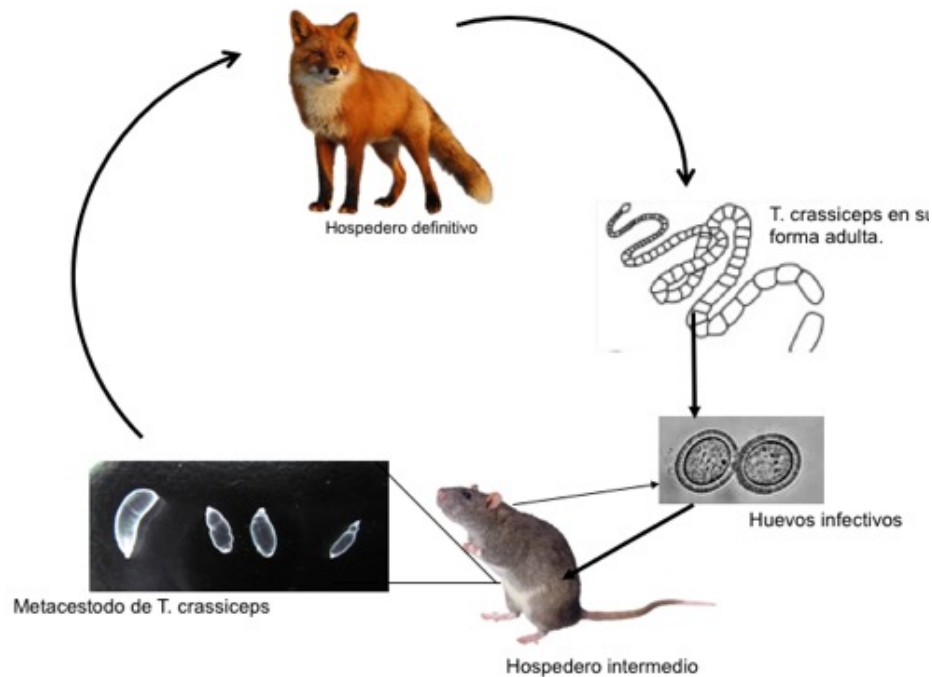


Fig. 2 Ciclo de vida de *T. crassiceps*. En el hospedero definitivo, madura la forma adulta de *T. crassiceps* y forma a los huevos los cuales salen en las heces y son consumidos por los hospederos intermedios, donde se forman los metacéstodos. Posteriormente los hospederos intermedios pueden llegar a ser consumidos por los hospederos definitivos (Lescano *et al*, 2013).

1.1.3 Infección.

En infecciones naturales, la forma adulta de *T. crassiceps* se aloja en el intestino del hospedero definitivo, mientras que el cisticerco se ha encontrado en el tejido subcutáneo de roedores, así como en la cavidad pleural y el peritoneo de acuerdo a lo descrito por Freeman *et al* en 1962.

T. crassiceps tiene una alta tasa de infección así como una gran capacidad de reproducción dentro del grupo de invertebrados. Se han encontrado varias cepas de *T. crassiceps* en diferentes hospedadores como *Vulpes*, *Alopex*, *Canis*, *Felis* y *Putorius*. Además, se han descubierto diferentes cepas de estados larvales en hospederos intermedios las cuales ayudan a la comprensión del fenómeno de la inmunoregulación (Willms *et al*, 2009). Por otro lado, se ha documentado la

neurocisticercosis mediada por *T. crassiceps* en tejido cerebral de ratones y gatos así como en la medula espinal de algunos primates (Lescano *et al*, 2013).

1.1.4 Cepa ORF

Los estudios con cepas de metacéstodos de *T. crassiceps* han resultado de gran utilidad para el entendimiento y la investigación en la regulación de la respuesta inmune. La cisticercosis causada por *T. crassiceps*, en particular en el peritoneo en donde el parasito se multiplica por gemación, ha sido de interés por los científicos para entender el papel de diferentes componentes celulares y moleculares. Se han aislado diferentes cepas del parasito; WFU, HYG, KBS y ORF (Ruiz-Monroy *et al*, 2013). En 1952, el Dr. Freeman aisló la cepa ORF de larva de *T. crassiceps* la cual mostraba una alta tasa reproducción y además, contaba con una mutación, la cual no le permitía al metacéstodo desarrollar el escólex, lo que evita la etapa adulta. (Freeman, 1962), (Dorais *et al*, 1969). Actualmente la cepa ORF es la más empleada en experimentación peritoneal en ratones, por su alta capacidad de reproducción por gemación (Freeman, 1962), (Ruiz-Monroy *et al*, 2013). Este modelo de cisticercosis ha permitido estudiar aspectos inmunológicos, genéticos y hormonales, además ha orientado la investigación de la infección en humanos ya que los cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium* presentan alta homología, ambos estimulan al sistema inmune del hospedero mediante antígenos complejos (Ruiz-Monroy *et al*, 2013).

1.1.5 Respuesta Inmunológica experimental en la infección con *T. crassiceps*

Diferentes publicaciones han demostrado lo compleja que es la relación del sistema inmunológico del hospedero y la infección por *T. crassiceps*. En estas investigaciones se ha tratado de terminar el papel que juega el sistema inmune en la susceptibilidad o resistencia hacia este parásito (Willms y Zurabian, 2009).

Los parásitos helmintos han desarrollado diferentes mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero, de esta manera el parasito completa su ciclo de vida, se desarrolla y prolifera (Peón *et al*, 2013). Artículos previos donde se publican hallazgos en el modelo murino, mencionan que el sistema inmune es responsable

del deterioro de la cavidad peritoneal del del ratón, además en investigaciones de cisticercosis experimental recientes, demuestran que en los estados iniciales de la infección en ratones BALB/c hay una respuesta Th1 aguda con altos niveles de IL-2, interferón gamma (IFN γ) y óxido nítrico (NO), para posteriormente abrir paso a la infección crónica con un perfil Th2 o anti-inflamatorio dominante, el cual promueve directamente la susceptibilidad hacia el parásito (Willms y Zurabian, 2009) (Terrazas *et al*, 1998)(Peón *et al*, 2013). Entonces, durante la infección con *T. crassiceps*, la respuesta tipo Th2 está caracterizada por una alta secreción de citocinas antiinflamatorias principalmente IL4 y IL-13, además, IL-6, IL-9,IL-10, IL-25, IL-33 y TGF- β . La consecuencia de esta secreción es la activación y proliferación de linfocitos T con un perfil Th2, y se ha sugerido que también de células T reguladoras (Tregs) con un fenotipo supresor, así como de células mieloides donde destacan los macrófagos activados por la vía alternativa (Peón *et al*, 2013)(Adalid-Peralta *et al*, 2021).

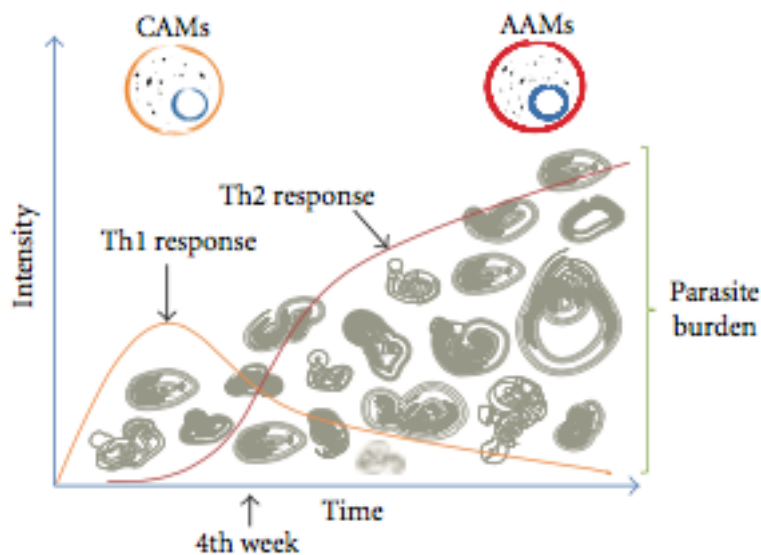


Fig. 3 Respuesta inmunológica ante *T. crassiceps*. Tras la infección hay una respuesta Th1 o inflamatoria donde activaran células del sistema inmune como los macrófagos activados por la vía clásica. Posteriormente de acuerdo a las investigaciones previas, habrá un cambio a una respuesta Th2 dando paso a citocinas antiinflamatorias y a células como los macrófagos alternativamente activados (Peón *et al*, 2013).

1.2 Linfocitos T supresores

1.2.1 Células T reguladoras (Tregs)

En los últimos años se ha investigado la participación de las células Tregs y su relevancia en la inmunomodulación causada por la infección de *T.crassiceps*. Esta subpoblación de linfocitos que presenta un fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ y funge un papel primordial en el control de la respuesta inmunológica por diferentes mecanismos (Ruiz-Monroy *et al*, 2013).

Esta pequeña subpoblación de Linfocitos T CD4, expresa de manera constitutiva la molécula CD25 que es la cadena alfa del receptor para la IL-2, una citocina necesaria para la activación y proliferación de los linfocitos (Chavez-Sanchez *et al*, 2017). Además, uno de los descubrimientos más importantes fue la identificación de Forkhead box P3 (Foxp3), un factor de transcripción que participa en el desarrollo y función de las células Tregs humanas y murinas. Hoy en día Foxp3 es reconocido como el gen maestro controlador de las células Tregs y además es el principal marcador molecular de esta subpoblación (Hori y Sakaguchi, 2003)(Parias *et al*, 2010)(Fontenot *et al*, 2003). Las células T reguladoras que originalmente se diferenciaron en el timo, se les llama células Tregs Naturales (nTregs), aunque algunos autores proponen definir las como células Tregs timicas (tTregs). El desarrollo de la células tTregs depende de la selección en el timo originando una célula con fenotipo estable, expresión del factor Foxp3 y una actividad supresora constitutiva (Chavez *et al*, 2017). En 1995 Sakaguchi y colaboradores, demostraron en su amplio estudio sobre las células T reguladoras que estas constituyen entre el 5% al 10% de células T CD4+ en sangre periférica en ratones adultos sanos.

1.2.2 Mecanismos de Supresión

Diferentes investigaciones han establecido el papel de las células Tregs, el cual es mantener la tolerancia inmunológica así como evitar enfermedades autoinmunes. Las Tregs suprimen a los linfocitos CD4+ y CD8+, así como su producción de citocinas, también suprimen la producción de anticuerpos por las células B y la función de otras células, como NK y células dendríticas. Los mecanismos de acción de las Treg han sido agrupados principalmente en: supresión por contacto,

supresión por citocinas y supresión por disrupción metabólica (Dario A,A. *et al* 2008)(Olguín *et al* 2021). La supresión por contacto necesita de la interacción célula con célula, dicho proceso incluye moléculas que las células Tregs expresan en su superficie como son LAG3 y CTLA-4 que al interactuar con sus ligando en la célula blanco interfieren en el desarrollo y la proliferación celular (Chavez *et al*, 2017). En cuanto a la supresión por citocinas, las células Tregs pueden suprimir las respuesta inmune secretando citocinas en el medio como IL-10., IL-35 y TGF- β . La IL-10 es una citocina antiinflamatoria que disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras en la celula dendrítica (DC). Por otro lado, TGF- β es una molécula pleiotrópica que en estudios *in vitro* se asocia con la supresión de linfocitos T efectores y linfocitos citotóxicos (Guzman-Flores *et al*, 2013). Finalmente, la supresión por disrupción metabólica hace referencia a que las células Tregs expresan con alta afinidad el receptor de la IL-2, esto hace que consuman esta citocina del medio; al “secuestrar” a la IL-2, la célula Treg interrumpe con el desarrollo de células efectoras (Dario A,A. *et al* 2008) (Sánchez-Barrera *et al*, 2022).

1.3 Células mieloides supresoras

Las células supresoras de origen mieloides (MDSC) fueron descritas en enfermedades inflamatorias agudas, principalmente en cáncer. Sin embargo, en estudios posteriores también se encontraron presentes en enfermedades autoinmunes e infecciones. Son un grupo heterogéneo de células mieloides que se pueden diferenciar en granulocitos, macrófagos y células dendríticas. Este grupo de células han sido caracterizadas con marcadoras de origen mieloides: Gr-1+ y *Macrophage-1 antigen* (Mac-1) en roedores, mientras que en humano son CD33+ y CD11b+. Estas células tienen un papel muy importante en la disminución de la inflamación exacerbada (Gimeno *et al*, 2011)(Becerra-Díaz, 2015). En ratones se ha establecido dos subpoblaciones de MDSC de acuerdo a la expresión de los epítomos de Gr-1: granulocitos CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} y los monocíticos CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} ambos tipos celulares son capaces de suprimir la respuesta de las células T, sin embargo, solos las MDSC monocíticas se pueden diferenciar

en macrófagos y células dendríticas maduras (Hayle *et al*, 2012). Asimismo, las células mieloides granulocíticas se diferencian en neutrófilos.

1.3.1 Macrófagos alternativamente activados.

Los macrófagos son células mononucleares, fagocíticas de origen mieloide que tienen un papel fundamental en la respuesta inmune. Ha sido bien establecido que el microambiente, los antígenos microbianos, junto con las células T efectoras y las citocinas que producen influyen en el estado de activación de estas células (Becerra-Díaz, 2015).

La caracterización de los macrófagos clásicamente activados (caM ϕ) se define por la inducción de moléculas microbianas inflamatorias como los lipopolisacáridos, así como un microambiente tipo Th1 con altos niveles de IFN- γ y TNF- α . Estos macrófagos contribuyen a la respuesta inflamatoria, además son productores de óxido nítrico, tienen una alta expresión del MHC tipo II y CD86 así como una gran capacidad de presentación de antígeno (Noël *et al*, 2004).

Por otro lado, los macrófagos alternativamente activados (aaM ϕ) están presentes en la fisiología del organismo, en la homeostasis y en la reparación tisular. Asimismo, se ha demostrado su participación en alergias, fibrosis y en infecciones parasitarias con helmintos (Becerra-Díaz, 2015).

En la infección causada por *T. crassiceps*, durante las primeras 4 semanas hay una respuesta Th1 y M1, donde posteriormente existe un cambio inducido por el parásito hacia un perfil Th2 con altos niveles de IL-4, IL-13, IgG1, IgE. Este cambio de microambiente estimula a los aaM ϕ a producir PGE₂ e IL-6, así como bajos niveles de NO e IL-12. Todo lo anterior beneficia el desarrollo del parásito. Hay estudios que indican que estos macrófagos están relacionados con la susceptibilidad o resistencia a la infección a través de la activación de factores de transcripción como STAT6, sin embargo, aun no está se está dilucidando el papel de esta población (Noël *et al*, 2004)(Hayle *et al*, 2012).

1.4 Inmunosupresión.

1.4.1 Anergia

El agotamiento celular es un estado de hipoactividad en las células T, caracterizado por una baja producción de citocinas, y moléculas citotóxicas, baja expresión de receptores de activación y una alta expresión de receptores inhibidores de la activación. Al principio este fenómeno se estudió en infecciones virales, pero actualmente se ha identificado en infecciones bacterianas, parasitas y cáncer. La anergia en linfocitos T CD4+ y CD8+ ha sido definida por la alta expresión de receptores, en específico: PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, 2B4, BTLA y CD160 (Splitt *et al*, 2018).

1.5 PD-1

Programmed cell death protein 1 (PD1 o CD279), es un receptor que se describió en la células T activadas mediante la vía presentación de antígeno y TCR. Es un inhibidor muy importante y único debido a la amplia gama de funciones de sus señales reguladoras en la homeostasis inmunológica, tolerancia, infecciones crónicas y cáncer (Sharpe *et al*, 2018). PD-1 regula negativamente tanto a la respuesta inmune innata como adaptativa, ya que es expresada en linfocitos T activados, natural killer (NK), linfocitos B, macrófagos, células dendríticas (DCs) y monocitos (Han *et al*, 2020).

1.5.1 Estructura

PD-1 y sus ligandos pertenecen a la familia de receptores B7/CD28/CTLA-4 los cuales son glicoproteínas tipo 1, de 55 KDa formada de 288 aminoácidos con un dominio extracelular tipo inmunoglobulina (*IgV-like*), un dominio unido a la membrana y una cola citoplasmática con dos tirosin-cinasa en la base (Han *et al*, 2020) (M. Zak *et al*, 2017).

La proteína PD-1 esta codificada en el gen *Pdcd1* localizado en el cromosoma 2 humano y en el ratón en el cromosoma 1 (Vargas-Rojas *et al*, 2008). Los estudios de la estructura de PD-1 (específicamente en relación con su ligando PD-L1/2) siguen siendo de interés debido a su participación estrecha con el progreso de

diferente tipos de cáncer. Por ejemplo, la interacción de PD-1 y su ligando permitió el desarrollo de moléculas moduladoras que se unen a PD-L1 inhibiendo el complejo PD-1/PD-L1 *in vitro*, demostrando que este complejo forma una interfaz estructural muy similar a la interfase de los dominios Fv de la unión al antígeno de los anticuerpos y a la del receptor de linfocitos T (TCR) con el MHC.

1.5.2 Señalización y ligandos de PD1

Se han descrito dos ligandos: PD-L1 (CD274; también conocido como B7-H1) y PD-L2 (CD273; también denominado B7-DC), ambos son glicoproteínas transmembranales tipo 1 con dominios extracelulares tipo IgC e IgV (Vargas-Rojas *et al*, 2008). La expresión de PD-1 y de sus ligandos se han descrito en diferentes tipos celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa; PD-L1 se expresa constitutivamente en linfocitos T y B, macrófagos y células dendríticas (Patsoukis *et al*, 2020) (Vargas-Rojas *et al*, 2008). Por otro lado, la expresión de PDL2 se restringe a células dendríticas, macrófagos, y células B. Ambos ligandos son inducidos por la estimulación en un microambiente inflamatorio (Sharpe *et al*, 2018).

Mucho de lo que actualmente se sabe de la señalización de PD-1, es gracias al estudio de las células T activadas. PD-1 tiene dos motivos tirosin en el dominio citoplasmático que cuando se unen con su ligando, se fosforilan formando Tirosinfosfatasas (PTPs) como SHP2. Estas últimas inactivan cinasas, lo cual antagoniza las señales positivas que ocurren cuando se activa el TCR y CD28 afectando la señal río debajo de proteínas activadoras como PI3K-AKT, RAS cinasas ERK, VAV; dando como resultado la disminución de la activación de la células T, su proliferación, sobrevivencia, producción de citocinas y alteración del metabolismo (Vargas-Rojas *et al*, 2008)(Sharpe *et al*, 2018). Al activarse la señalización de PD-1 por sus ligandos, hay una señal intracelular la cual resulta en la baja producción de citocinas como los interferones, el TNF y la IL-2, lo cual se ve reflejado en la proliferación celular, la diferenciación y sobrevida celular (Vargas-Rojas *et al*, 2008).

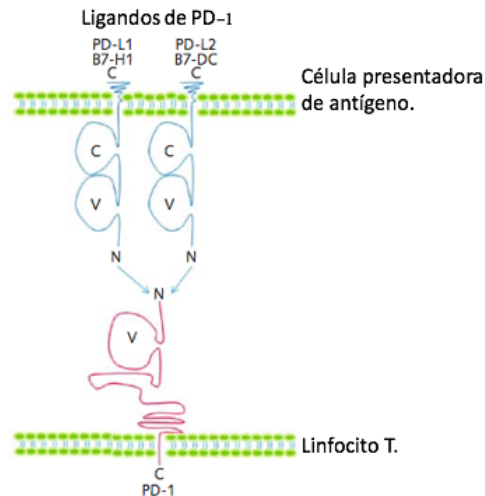


Fig. 5 Estructura de PD-1 en el linfocito T, uniéndose a sus ligandos PDL-1 y PDL-2 en la célula presentadoras de antígeno (Sharpe *et al*, 2018).

1.6 TIM-3

T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM-3) es un receptor transmembranal tipo 1, la cual fue originalmente descrita y utilizada como marcador en linfocitos CD4+ cooperadores (Th1) y en linfocitos T CD8+ citotóxicos. Sin embargo, hoy se sabe que también ésta molécula esta expresada en células Tregs, Natural Killers (NK), monocitos, macrófagos y células dendríticas (Joller *et al*, 2017) (Banerjee *et al*, 2018).

Inicialmente los estudios de TIM-3 demostraron que la ausencia de esta molécula generaba alta tasa de enfermedades autoinmunes, por lo tanto, se sugirió como un regulador de la respuesta inmune. A menudo, a TIM-3 se le designa como un receptor “*Checkpoint*” y como un marcador de agotamiento celular, sin embargo la discusión sigue ya que la función de esta molécula va de la mano con el contexto, el tejido y la patología en particular (Banerjee *et al*, 2018).

1.6.1 Estructura

TIM-3 pertenece la súper familia de las Ig; tiene un N-terminal y un dominio IgV seguido de un dominio tipo mucina que tiene sitios donde se realiza glicosilación, después tiene su dominio transmembranal. El C-terminal se encuentra en el citoplasma con residuos de tirosina los cuales serán fosforilados en la señalización

de esta molécula (Banerjee *et al*, 2018)(Zhang *et al*, 2018). En estudios recientes, el dominio C-terminal y los residuos de tirosina tienen un papel considerable en la regulación de la señalización (Joller *et al*, 2017).

1.6.2 Señalización y ligandos de Tim3

TIM-3 actúa como regulador negativo de la respuesta Th1 y de la respuesta citotóxica. Como se mencionó en el apartado 1.6.1 *estructura*, la cola en la región del C-terminal no tiene una señal inhibitoria, pero conserva cinco residuos de tirosina de los cuales dos están fosforilados y son necesarios para unirse a la proteína intracelular Bat3. Esta unión promueve señales inhibitorias río abajo. Por otro lado y de manera contraria, cuando hay ausencia de ligandos en TIM-3, los residuos de tirosina no se fosforilan, dejando inactivo a Bat3, permitiendo las funciones y la señalización de los linfocitos T. El descubrimiento de TIM-3 trajo la identificación de la familia de genes y proteínas TIM (TIM-1, TIM-3 y TIM-4) las cuales se conservan en ratón y en humanos (Joller *et al*, 2017)(Sabatos *et al*, 2003).

Se han descrito 4 ligandos para TIM-3: Galectina 9 (GAL-9), high-mobility group protein B1 (HMGB1), carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 (CEACAM-1) y fosfatidilserina (PTDSer). GAL-9 y CEACAM-1 al unirse con TIM-3, generan la fosforilación de los residuos de tirosina, activando a Bat3 y regulando negativamente las funciones de las células T, incluso induciendo apoptosis a linfocitos T CD4+ (Th1) (Joller *et al*, 2017). La interacción con el ligando PTDser tiene un papel en la eliminación de cuerpos apoptóticos y en la presentación de antígenos “cruzada”, sin embargo la afinidad con TIM-3 es baja a comparación de las otras moléculas. Finalmente, HMGB1 se expresa por las CD infiltradas en los tumores, por lo que TIM-3 compete por la unión con HMGB1 y así reduce el transporte de ácidos nucleicos a los endosomas, aminorando la respuesta inmune hacia el tumor (Banerjee *et al*, 2018).

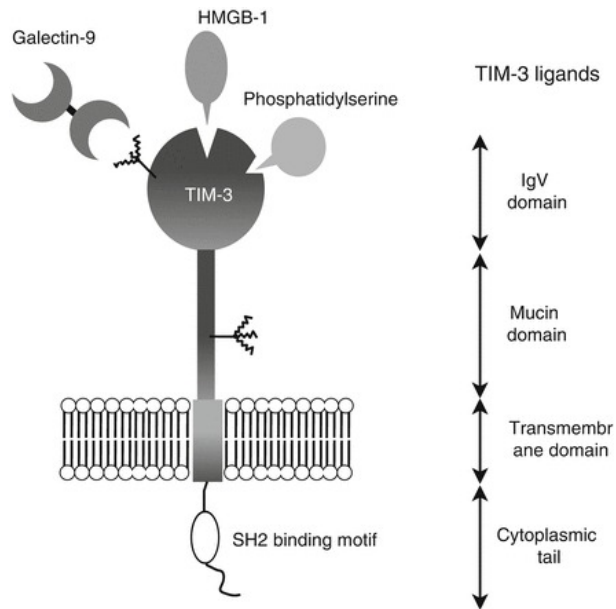


Fig. 6 Estructura de TIM-3. Sus tres ligandos Galectina 9, HMGB-1 y fosfatidilserina.

1.7 STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1)

La vía de señalización de STAT1 parte de la activación por receptores en la membrana celular y en consecuencia por la fosforilación constante río abajo, lo que activa genes de transcripción en el núcleo. STAT1 es un factor de transcripción vital en la respuesta inmunológica adecuada ante diferentes antígenos. STAT1 Es un punto importante y principal en la señalización del IFN- γ , una citocina vital en la respuesta inflamatoria (Becerra-Díaz, et al, 2011). Hay pocas investigaciones de la participación de STAT1 en infecciones por helmintos, sin embargo, dado que estas vías participan en la activación en la respuesta inmune, hay evidencia de que varios parásitos modulan la actividad de esta vía. Por ejemplo, los promastigotes de *Leishmania donovani* inhiben a la IL-12, que es un inductor importante del IFN- γ , además interfiere en los mecanismos de señalización como la fosforilación de JAK1 y 2 así como de STAT-1 α (Becerra-Díaz, 2015)

1.7.1 Familia STAT

La familia STAT es un grupo de proteínas citoplasmáticas que tienen la función de factor de transcripción. Fue descrita en los años 90`s y está constituida por 7 miembros: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6. (Seavey *et al*, 2012). Presentan 5 dominios: el dominio de dimerización, Coiled-coil, el dominio de unión al DNA, SH2 y el dominio de transactivación . Su papel en la transcripción empieza cuando forman homodímeros y heterodímeros entre ellos, se translocan al núcleo, se unen a secuencias específicas del DNA y promueven la expresión génica. La dimerización es posible cuando las proteínas STAT son fosforiladas río arriba a causa de la estimulación de citocinas y su receptor. (Becerra-Diaz, et al, 2011) (Mogensen T.H, 2019).

STAT	Citocina
STAT1	IL-2, IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-27
STAT2	IFN- γ , IFN-2, IL-27
STAT3	LIF, IL-10, IL-6, IL-27, hormona de crecimiento.
STAT4	IL-12
STAT5 a/b	Prolactina, hormona del crecimiento, Trombopoyetina.
STAT6	IL-4, IL-13

Tabla 2. Miembros de la familia STAT y las citocinas y factores se señalizan (Seavey *et al*, 2012).

La familia STAT participa en las vías de señalización necesarias en la respuesta inmunológica, promoviendo la secreción de más interleucinas y factores de crecimiento, suscitando la migración y la diferenciación de las células del sistema inmune. (Becerra-Diaz, et al, 2011).

1.7.2 Señalización del IFN- γ dependiente de STAT1

La vía JAK/STAT se caracterizó primero en los interferones tipo I, señalando la importancia que esta vía tiene en la respuesta inmune contra los virus.

Posteriormente se estableció que la señalización mediada por el IFN- γ también era dependiente de las vías de la familia STAT y estaba presente en células T activadas y células natural killer (NK) fungiendo un papel antiviral y antitumoral, además actúa como regulador en la activación de otras células como macrófagos (Au-Yeung *et al*, 2013)(Ramana *et al*, 2002). El IFN- γ interactúa con su receptor compuesto de dos subunidades IFNGR1 y IFNGR2. El receptor induce la oligomerización y activación de la Janus cinasas (JAK1 y JAK2) y este sirve como sitio de acoplamiento para STAT1. Al fosforilarse STAT1 en la tirosina 701, se dimeriza a través de homología Src-2 para translocarse al núcleo y regular la expresión génica uniéndose a secuencias GAS en los promotores de genes reguladores de IFN- γ (Ramana *et al*, 2002).

STAT1 es crucial en la señalización del IFN- γ interviniendo en el desarrollo y regulación de la respuesta Th1 o respuesta inflamatoria. Sin embargo, como se mencionó antes, existe evidencia que indica la participación de mecanismos inflamatorios principalmente al inicio del desarrollo de la infección, lo que podría ser de relevancia en así como en el ciclo de vida del helminto (Becerra-Díaz, *et al*, 2011), así como en la sobrevivencia del hospedero.

1.7.3 Ratones deficientes de STAT-1 en la infección con *Taenia crassiceps*.

De acuerdo con investigaciones directas durante la infección por *T. crassiceps* en ratones deficientes de STAT-1, existe una modulación negativa en la respuesta a IFN- γ la disminuir la capacidad de fosforilar a STAT-1 (Becerra-Díaz *et al*, 2014). Además, los ratones STAT-1 K.O desarrollan una menor carga parasitaria que los ratones control lo cual se concluye en que los ratones deficientes de STAT-1 son resistentes a la infección (Becerra-Díaz *et al*, 2014).

También en el modelo STAT1^{-/-} se altera el reclutamiento celular en la cavidad peritoneal del ratón después de las 8 semanas de infección, donde las células eran de menor tamaño y en menor cantidad (Becerra-Díaz *et al*, 2014)(Becerra-Díaz *et al*, 2021).

2. Antecedentes directos

La relación entre el sistema inmune del hospedero y *T. crassiceps* ha sido ampliamente estudiada. En nuestro grupo de investigación se han llegado a conclusiones importantes respecto a la relación entre el grupo de factores de transcripción STAT, la ausencia de STAT1 durante la infección con este parásito y la susceptibilidad o resistencia que genera. EN 2011 Becerra-Díaz y colaboradores repostaron la estrecha relación que hay entre STAT1, STAT4 y STAT6 en las infecciones con helmintos, donde hicieron hincapié en la escasa información que había sobre STAT1 en infecciones parasitarias. En 2015, Becerra-Díaz publicó una tesis doctoral donde analizaba el papel de STAT1 en respuesta a la infección con *Taenia crassiceps* en la cual podemos resaltar dos conclusiones que más adelante se abordarán; el reclutamiento mediado por CCR2 en ausencia de STAT1 en macrófagos y la expresión de PDL2 en macrófagos durante la infección, además de manera interesante reporta que la infección crónica induce una disminución de la fosforilación de STAT1 en macrófagos del peritoneo en cepa BALB/c.

3. Justificación

Hoy en día se sabe que las infecciones por parásitos helmintos aumentan año con año, por lo que es considerado un problema de salud pública. La capacidad de estos para inducir una respuesta anti-inflamatoria (Th2) es ampliamente reportada y estos estudios han servido para entender el complejo funcionamiento del sistema inmunológico.

STAT1 es un factor de transcripción en la vía canónica de la respuesta inflamatoria (Th1) por lo que al tener un modelo ausente de este, podremos estudiar su participación en los procesos de inmunoregulación en células mieloides y linfoides.

4. Objetivos e Hipótesis.

Hipótesis

Debido a que los parásitos helmintos como *Taenia crassiceps* modulan el sistema inmunológico de su hospedero, la ausencia del factor de transcripción STAT1 tendrá un efecto sobre los mecanismos de inmunosupresión durante la infección.

Objetivo general

Analizar los perfiles de las poblaciones celulares y si estos muestran un fenotipo anergico o supresor durante la infección por *Taenia crassiceps* en ausencia del factor de transcripción STAT1.

Objetivos particulares

- Infectar ratones con un peso minimo de 18 gr con 10 metacestodos de *Taenia crassiceps*
- Determinar el estado de salud de los ratones mediante el registro de los pesos durante las semanas de infeccion
- Analizar al linaje mieloides, F480+ y Gr1+ mediante citometria de flujo asi como sus marcadores: CCR2+, PDL1+, Gal9 y MHCII, en peritoneo.
- Analizar a la población de células T reguladores en sangre periférica mediante citometria de flujo
- Analizar a las células NK (CD49b+CD94+), las células B (CD19+) y los linfocitos T CD3+ y sus marcadores de activación: CD25+, PD1+ y TIM3+ mediante citometria de flujo en peritoneo.
- Analizar a las células T reguladoras, T CD4+ y CD8+, con sus marcadores CD25, PD1 y TIM3+ en peritoneo mediante citometria de flujo.
- Analizar el estado de anergia o supresión de los linfocitos CD4+ y CD8+ mediante un ensayo de proliferación.

5. Materiales y métodos.

5.1 Animales.

5.1.1 Ratones.

Se utilizaron ratones hembras transgénicos BALB/c-Foxp3^{EGFP} y dobles transgénicos STAT-1 Knock-out (KO)/Foxp3^{EGFP} Knock-in. Ambas cepas expresan la proteína verde fluorescente después del promotor Foxp3 y también ambas cepas fueron donadas por el Dr. Rafael Saavedra Durán del Instituto de Biomédicas, UNAM.

Los ratones se utilizaron de entre 6 a 8 semanas de edad y con un peso de entre 18 y 20 g. Todos los ratones se mantuvieron en condiciones ideales y controladas, con agua y alimento estéril *ad-libitum* en el bioterio de FES Iztacala.

5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

5.2.1 Extracción de DNA de cola de ratón.

Para asegurar que los ratones tienen un genotipo STAT-1 Knock-out (KO) se cortó un fragmento de cola de aproximadamente 1cm y se colocó en un tubo de 1.5 ml con 500 ul de buffer de lisis (Anexo 1) y 10 ul de proteinasa K (AmbionTM). Después las muestras se incubaron a 56°C durante toda la noche y en agitación en el Thermo-Shaker MC. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos. Posteriormente se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml nuevo, se agregaron 500 ul de isopropanol frío y después se mezcló por inversión. A continuación, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1ml de etanol al 75% y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos. El pellet se resuspendió en 1ml de etanol al 85% o 90% y se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante de la muestra y se dejó secar durante 1 hora. Finalmente se agregaron 100 ul de agua grado molecular estéril.

5.2.2 Cuantificación de DNA

Se cuantificaron los nanogramos de DNA presentes en 1 ul de cada muestra en el NanoPhotometer® NP80 (IMPLEN) del laboratorio Nacional en Salud de la FES Iztacala.

5.2.3 PCR

Se uso un Kit de PCR *Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED* (Ampliqon/ KAPA Biosystems). Se tomaron 200 ng de DNA de cada muestra y los primers (Tabla 2) en un volumen final de 25 ul. Las muestras de amplificaron en un termociclador (applied biosystem 2720 by life technologies) de acuerdo con los ciclos descritos en la tabla 3.

5.2.4 Geles de agarosa

Los amplicones se revelaron en un gel de agarosa al 1.2% con 1.5 ul de Bromuro de Etidio. Después de colocar las muestras en el gel, se corrieron en una cámara de electroforésis a 100 Volts por 45 minutos. Las bandas se leyeron en el sistema Gel Doc EZ imaginer (BIO-RAD) y la imagen se analizo en el programa Image Lab.

Gen	Secuencia del Primer (5'---3')	TM (Temperatura de alineación)	Amplicon (Peso molecular)
STAT-1 _R (WT)	CTGATCCAGGCAGGCGTT	57°C	172 pb
STAT-1 _F	TAATGTTTCATAGTTGGATATCAT		172 pb
NEO _R STAT-1	GAGATAATTCACAAAATCAGAGAG		275 pb

Tabla 3. Primers utilizados en el PCR para el genotipo de los ratones STAT-1 K.O

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95°C	2 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30 segundos	33 ciclos
Alineación	56°C	30 segundos	
Elongación	72°C	30 segundos	
Elongación final	72°C	5 minutos	1 ciclo

Tabla 4. Ciclos configurados en el termociclador para la PCR de los ratones STAT-1 K.O

5.3 Parásitos e infección.

5.3.1 Obtención de metacestodos de *Taenia crassiceps* e infección

Se obtuvieron los metacestodos de *T. crassiceps* en condiciones estériles, de la cavidad peritoneal de ratones con ocho semanas de infección, los cuales se lavaron

con solución salina estéril en un tubo de 50 ml, posteriormente se seleccionaron 10 metacéstodos de entre 1 y 3 mm de tamaño, se resuspendiéndolos en una jeringa de 1ml (BD Plastipack®) para infectar a otros ratones de entre 6 y 8 semanas de edad.

5.3.2 Conteo de metacestodos de *T. crassiceps*

Una vez que los metacéstodos se obtuvieron, se recuperó una muestra representativa de 10 ml en una caja Petri para su conteo. Al finalizar, el número obtenido en la muestra se multiplicó por el volumen final que se obtuvo. Esto se hizo por cada ratón infectado de manera individual, por duplicado.

5.4 Células.

5.4.1 Obtención de células de peritoneo.

Tanto en la fase aguda (3ª semana) y la fase crónica (8ª semana), se extrajeron del ratón las células del peritoneo inyectando y extrayendo solución salina estéril de la cavidad peritoneal. Las células se colocaron en tubos de 15 ml, los cuales se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos descartando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 ml de solución de lisis para eliminar eritrocitos. Una vez lavadas las células, se resuspendieron en buffer BD FACS Flow.

5.4.2 Conteo de células.

Las células se contaron por exclusión, a través del colorante azul tripano, haciendo una dilución 1:10, con la ayuda de un contador automatizado Countless II FL (ThermoFisher).

5.5 Citometría de flujo

5.5.1 Inmunofluorescencia de células de peritoneo.

Se tomaron 1×10^6 de células de peritoneo y se colocaron en tubos de 1.5 ml. Posteriormente se adicionaron los anticuerpos de interés (Ver tabla 1). Las muestras se incubaron por 30 min, en una temperatura de 4° y en oscuridad. Se agregó a cada muestra 1ml de buffer BD FACS Flow se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 300 ul de buffer BD FACSTFlow. Finalmente las muestras se analizaron de manera inmediata en el citometro Attune NxT (ThermoFisher).

5.5.2 Inmunofluorescencia de sangre.

Posterior a la infección de los ratones por *T. crassiceps*, en la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se tomó una muestra de sangre de los ratones infectados y control, para lo cual, se inmovilizó al ratón, se le cortó la punta de la cola y con las manos se oprimió para extraer la sangre (aproximadamente 3-4 gotas) se colocó en un tubo de 1.5ml con 10 ul de EDTA. Las muestras se mantuvieron en frío.

Las muestras de sangre se tiñeron con los anticuerpos respectivos descritos en la tabla 1 incubando por 30 min a 4° y en oscuridad. Después de este tiempo se agregó 1 ml de buffer FACS Flow, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. A continuación, se agregaron 500 ul de buffer de lisis por 5 minutos. Posteriormente se agregó 1ml de buffer BD FACSFLOW para detener la reacción, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Finalmente se agregaron 300 ul de buffer BD FACSFLOW y las muestras se analizaron inmediatamente en el citómetro Attune NxT (ThermoFisher).

Anticuerpos			
Inmunofluorescencia de células de peritoneo.			
Anticuerpo.	Fluorocromo	Clona	Marca
Linaje mielóide			
α -F480	APC	BM8	Biolegend
α -Gr1	BV605	RB6-8L5	Biolegend
α -CCR2	FITC	SA203611	Biolegend
α -PDL2	PE	TY25	Biolegend
α -Gal9	PerCP	R69-35	Biolegend
α -MHCII	APC/Fire	M5/114.5	Biolegend
Linaje linfóide			
α -CD49b	P.B	DX5	Biolegend
α -CD94	PECy7	18dE	Biolegend
α -CD19	RF710	1D3	TONBO biosciences
α -CD3	PerCP	145-2C11	Biolegend
α -CD4	BV421	GK 1.5	Biolegend

α -CD8	BV605	53-6.7	Biologend
α -CD25	BV711	PC61	Biologend
α -PD-1	PE	J43.1	TONBO biosciences
α -TIM-3	APC	RMT3-23	TONBO biosciences
Inmunofluorescencia de sangre.			
α -CD4	APC	GK 1.5	Biologend

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en la Inmunofluorescencia de células de peritoneo y de sangre.

5.6 Ensayo de proliferación

Una vez sacrificados los ratones, de los grupos experimentales WT control, WT infectado fase aguda, WT infectado fase crónica, STAT1 KO control, STAT1 KO infectado fase aguda y STAT1 KO infectado fase crónica se sortearon específicamente linfocitos CD4+ y CD8+ de peritoneo, con ayuda del citometro BD FACSAria fusion del laboratorio nacional en salud de FES Iztacala.

Se uso 1 μ l en 1ml de salina del colorante CellTrace™Violet Cell Proliferation Kit (5 μ M) para la cantidad de 30 millones de células. Se realizó el calculo para el numero de células sorteadas y se agrego el colorante. Se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente durante 20 minutos, en oscuridad y con repetida agitación. Después se le agregó 5 volúmenes de suero fetal bovino (ver apartado de soluciones) sin generar burbujas, se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm. Se decantó en la campana de flujo laminar y se agregó 5 ml de salina. Se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se decantó y se agregó 1 ml de medio RPMI (ver apartado de soluciones).

En una placa para cultivo de 96 pozos donde se agregó previas 24hrs α -CD3 (para cultivo celular), se agregó 200 ul de las muestras por pozo y se cultivaron las células durante 72hrs en una incubadora de O2.

Posteriormente se colocaron las muestras en tubos de 1.5 ml. Se adicionaron los anticuerpos α -CD4 y α -CD8. Las muestras se incubaron por 30 min, en una temperatura de 4° y en oscuridad. Se agregó a cada muestra 1ml de buffer BD FACS Flow se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se

resuspendió en 300 ul de buffer BD FACSTFlow. Finalmente las muestras se analizaron de manera inmediata en el citometro Attune NxT (ThermoFisher).

5.7 Programas utilizados

Las muestras adquiridas en el citometro de flujo Attune NxT se capturaron con el software Attune, y el posterior análisis de las muestras obtenidas en dicho citómetro se procesaron en el software FlowJo v12 donde se obtuvo el porcentaje de las células de interés.

5.8 Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de un factor seguido por una prueba de múltiples comparaciones de Tukey. Con el programa Prism Graph PAD. Consideramos el valor de p: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

6. Resultados.

6.1 Genotipo del ratón *STAT1*^{-/-}

Como se indicó en materiales y métodos, para verificar que los ratones eran deficientes de STAT1, se realizó un PCR punto final. Los ratones WT amplificaron la secuencia codificante para STAT1 mientras que los ratones *knock out* amplificaron la secuencia correspondiente al casete de neomicina, lo que confirma que son ratones deficientes de STAT1 (Fig. 1).

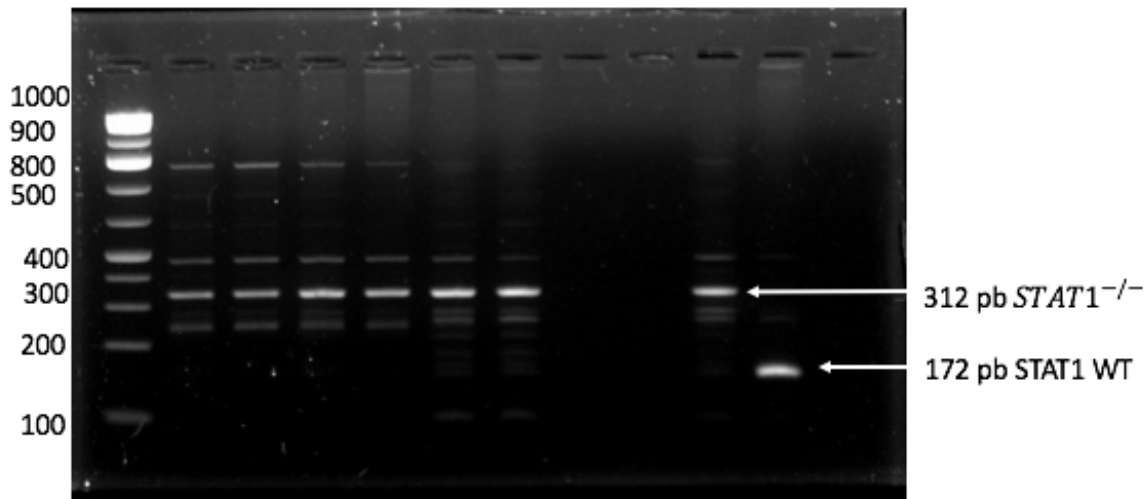


Figura 1. Los ratones *knock out* amplificaron la secuencia correspondiente al Neo casete, lo que confirma que son ratones deficientes de STAT1. Electroforesis de los ratones experimentales. Se observa las pares de base correspondientes al neo casete (STAT K.O) y al gen WT de STAT1.

6.2 Estado de salud de los ratones.

Se registró una vez a la semana el peso de los ratones de los cuatro grupos experimentales para verificar que el ratón se encontraba con buena salud. Como se observa en la figura 2. Los dos grupos control muestran una tendencia a mantener el peso; mientras que los dos grupos experimentales, aumentan de peso al transcurrir la infección.

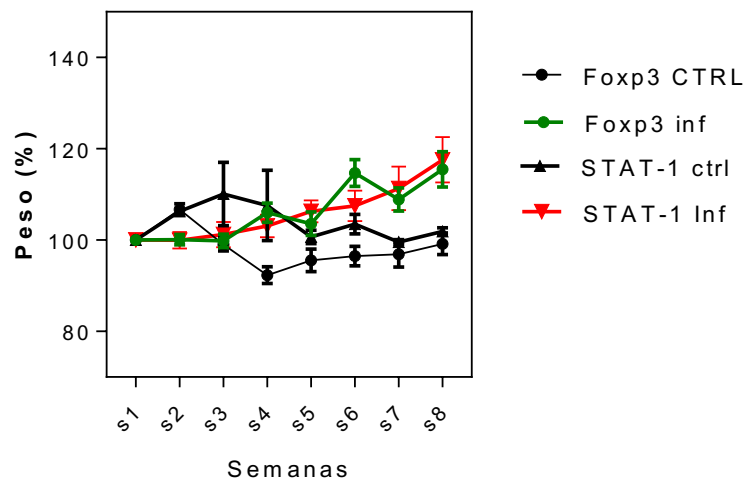


Figura 2. Los ratones de los grupos control muestran una buena salud durante las semanas de infección, a excepción de los ratones STAT1 K.O (ver apartado de sobrevida). Porcentaje del peso de los ratones. Se observa un tasa a la alta de los ratones infectados y una tasa estable para los ratones control.

6.3 Carga parasitaria en los ratones WT y *STAT1*^{-/-}

Como se mencionó en el apartado de materiales y métodos, se analizó el peritoneo que es la zona donde se desarrolla la infección, en la fase aguda y crónica.

Se sacrificó al ratón y se contó visualmente los metacéstodos. Se presenta en la figura 3 tanto en la fase aguda (Fig. 3A) como la fase crónica (3B) no hay diferencias significativas entre el grupo WT y el grupo *STAT1*^{-/-} en referencia a la carga parasitaria, no obstante los metacéstodos de los ratones deficientes de STAT1 son más grandes.

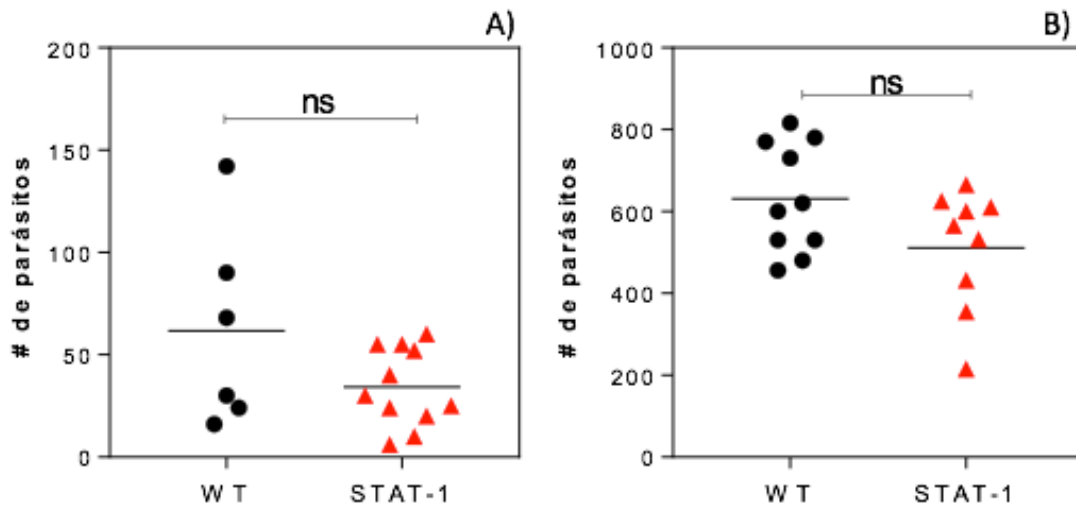


Figura 3. No hay diferencias significativas entre las cargas parasitarias de los grupos experimentales. Carga parasitaria en peritoneo de los ratones WT y ausentes de STAT1. A) En esta primera gráfica correspondiente a la fase aguda, vemos que no hay diferencias significativas entre los dos grupos experimentales B) Gráfico correspondiente a la carga parasitaria en la fase crónica donde vemos que no hay diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

6.4 Sobrevida de los ratones *STAT1*^{-/-} a la infección por *T. crassiceps*.

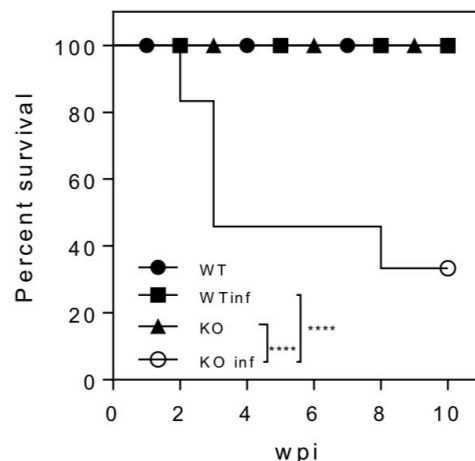


Figura 4. La sobrevida de los ratones *STAT1* infectados decae a partir de la semana tres. Gráfica de sobrevivencia de los grupos experimentales. Vemos como los grupos experimentales WT, WT infectados y KO

(*STAT1*^{-/-}) no tienen un decaimiento en la supervivencia de los ratones. Por el contrario los ratones KO (*STAT1*^{-/-}) infectados al pasar las semanas disminuye la supervivencia de éstos.

Tras la infección en los grupos experimentales nos percatamos que algunos ratones ausentes de *STAT1* morían a partir de las 3 semanas después de la inoculación intraperitoneal. Como se observa en la figura 4, podemos ver que la supervivencia del ratón *STAT1*^{-/-} decae a partir de la semana 3, en la fase aguda. Por lo que desde la perspectiva de la supervivencia; podemos decir que el ratón es susceptible, esto nos permitió tomar la decisión de analizar la fase aguda de la infección.

6.5 Análisis de poblaciones celulares en peritoneo por citometría de flujo. Fase aguda.

6.5.1 Linaje mieloide.

Está ampliamente reportada la participación del linaje mieloide en las infecciones por parásitos helmintos. En la presente investigación se aborda dos poblaciones celulares; macrófagos F480+ y las células mieloideas Gr1+, para lo cual se utilizó la estrategia de análisis como se muestra en la figura 5, a ambos grupos se les analizó los siguientes marcadores moleculares: CCR2, PDL2 y MHCII por citometría de flujo.

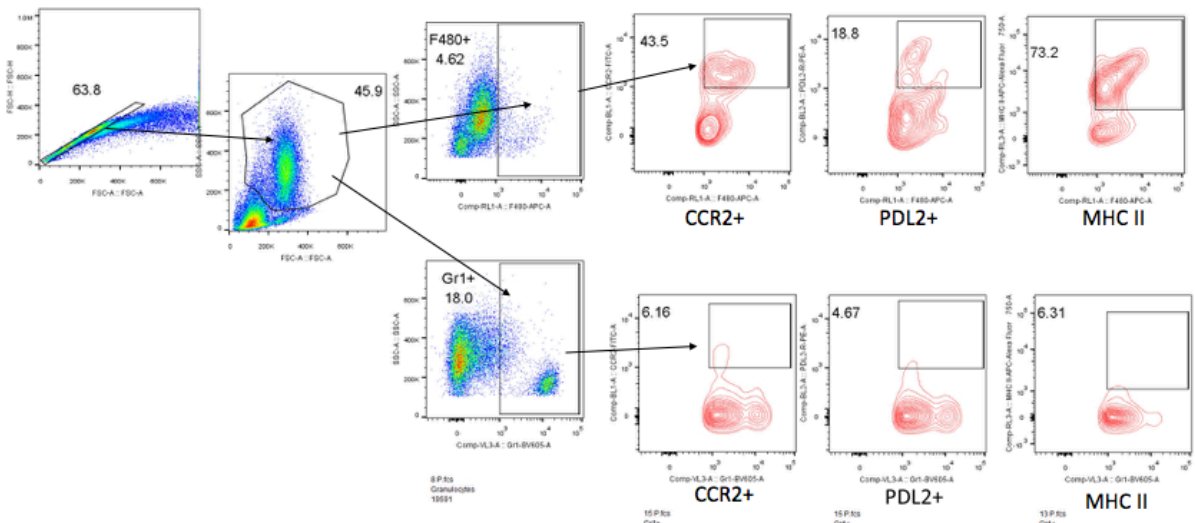


Figura 5. Estrategia de análisis de la población mieloide en la fase aguda de la infección. En primera instancia tomamos de un Plot de singlets, las células grandes y granulosas, posteriormente vamos a regionalizar con base en dos marcadores F480+ y Gr1+ y en ambas poblaciones medimos CCR2, PDL2 y MHCII. Datos representativos.

6.5.1.1 Macrófagos F480+

La participación de los macrófagos en las infecciones por helmintos ha sido reportada en nuestro grupo de investigación, por lo que analizamos en el peritoneo la participación de esta población celular durante la infección en ausencia y presencia de *STAT1*.

Como primer hallazgo vemos que los macrófagos F480+ tienen un aumento de la expresión de CCR2 en el grupo *STAT1*^{-/-} infectado con un porcentaje celular promedio de 50% mientras que el de los grupos control presentan un promedio de 25% de células al igual que el grupo WT infectado; por lo que concluimos que dicho aumento es dependiente de la infección y no de la ausencia de STAT1 ya que no hay diferencias significativas con respecto a los otros grupos experimentales (Fig. 6A).

En cuanto a los macrófagos F480+PDL2+ no hay un aumento y no hay diferencias significativas entre grupos experimentales (Fig. 6B).

Tampoco hay diferencias significativas entre los grupos experimentales en la población F480+MHCII+ (Fig. 6C).

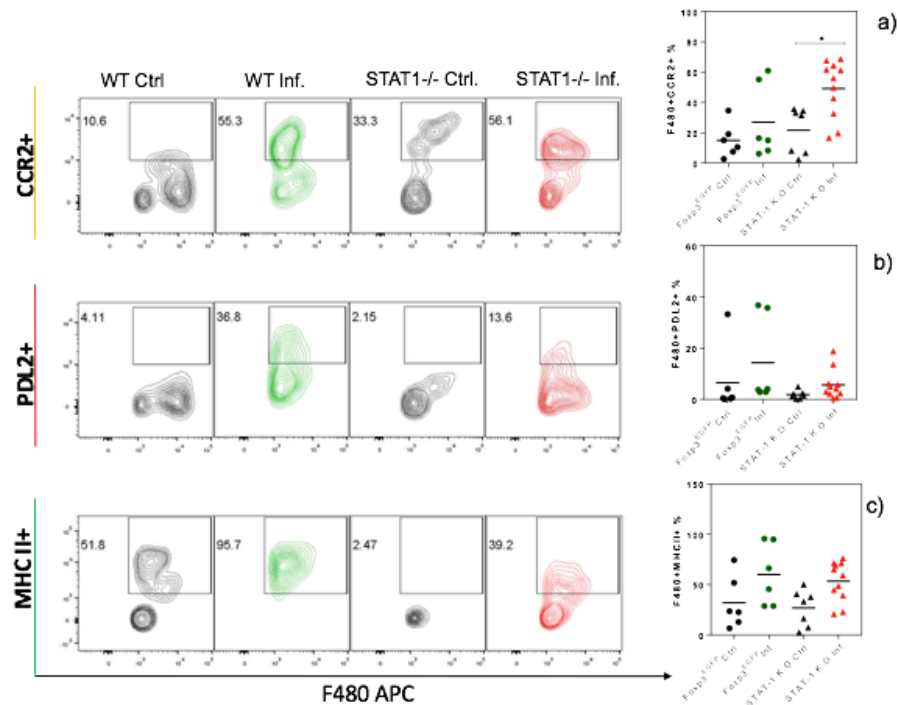


Figura 6. Dot plots de los macrófagos F480+ en peritoneo durante la fase aguda. A) Los macrófagos F480+ CCR2+ en los grupos control muestran poco porcentaje de células, solo hay un aumento significativo en los ratones infectados ausentes de STAT1 B) Las células F480+ PDL2+ no muestran diferencia significativas en ningún grupo experimental C) No hay diferencias significativas en los macrófagos F480+MHCII+ entre grupos.

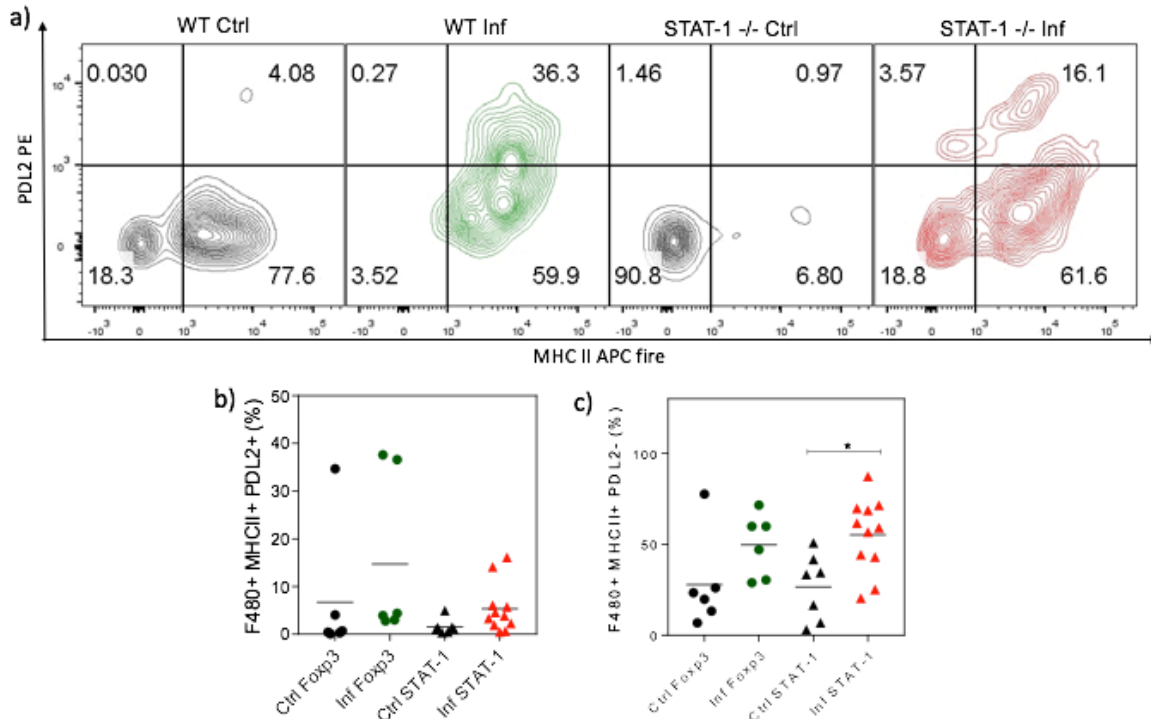


Figura 7. A) Dot plots de los macrófagos F480+MHCII+PDL2⁺ y F480+MHCII+PDL2⁻ en peritoneo durante la fase aguda B) Los macrófagos F480+MHCII+PDL2⁺ no muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales C) Las células F480+MHCII+PDL2⁻ muestran diferencia significativa en el grupo ausente de STAT1 infectado.

Finalmente decidí hacer un análisis extra en donde juntamos los marcadores: F480, MHCII y PDL2, como se observa en la figura 7b, no hay diferencias significativas entre grupos experimentales respecto a la población F480+MHCII+PDL2⁺; Sin embargo, hay un leve aumento en el grupo ausente de STAT1 de la población F480+MHCII+PDL2⁻ (Fig. 7C).

6.5.1.2 Células mieloides Gr1+

Por otro lado, las células mieloides Gr1+ no presentan diferencias significativas en el marcador CCR2 (Fig. 8A) tampoco hay diferencias entre los grupos en cuanto a la población Gr1+PDL2+ (Fig. 8B) y finalmente no hay diferencias en la población Gr1+MHCII+ (Fig. 8C).

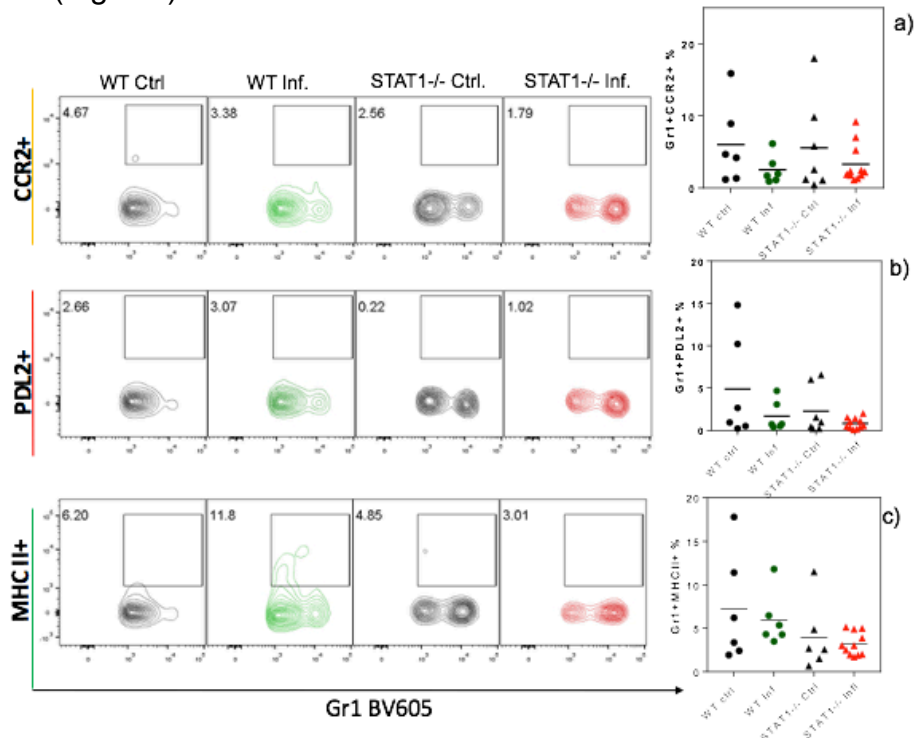


Figura 8. Dot plots de las células mieloides Gr1+ A) Las células Gr1+CCR2+ no muestran algún aumento significativo B) La población GR1+ PDL2+ no muestra diferencias significativas entre grupos experimentales C) No hay diferencias en el porcentaje de células Gr1+MHCII+ en ningún grupo.

6.5.2 Linaje linfoide en la fase aguda.

Los linfocitos son una población celular efectora importante dentro de la respuesta inmunológica y como se mencionó en la introducción, *T. crassiceps* tiene la capacidad de modular la respuesta Th1 y polarizarla hacia Th2 por lo que se tomó la decisión de abordar al linaje linfoide en peritoneo en la fase aguda de la infección. Empleamos la siguiente estrategia de análisis; se seleccionó un dot plot de tamaño contra granularidad y se regionalizó células pequeñas y no granulosa correspondientes a linfocitos. En un primer dot plot se seleccionó el marcador CD49+ y el marcador CD3+ (linfocitos CD3+).

La región de CD49+ se volvió a seleccionar para marcar las células CD49+CD94+ (*natural killers*). Volviendo al plot de tamaño y granularidad, se seleccionó la población CD19+ (células B) y CD3+.

A estas tres poblaciones se le analizaron los marcadores CD25+, Tim3+ y PD1 (Fig. 9).

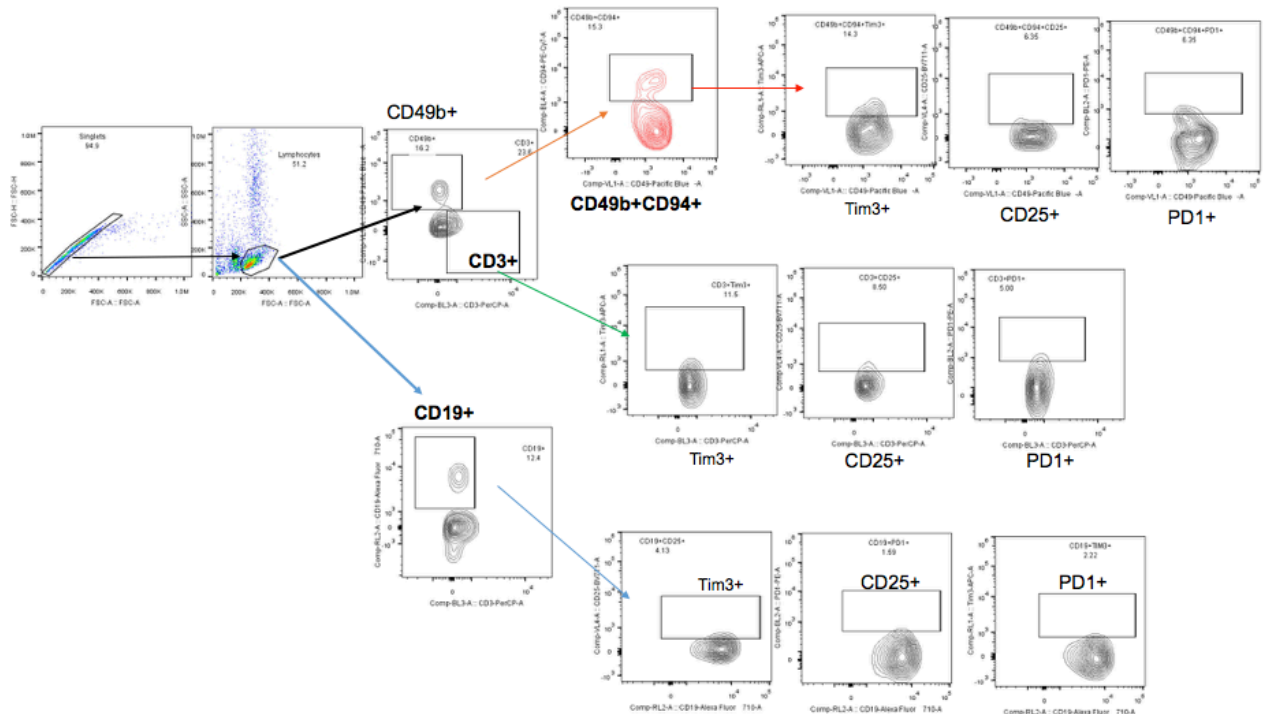


Figura 9. Estrategia de análisis de la población de células linfoides. Se dividió en tres poblaciones principales: Natural killers (CD49b+CD94+), células B (CD19+) y linfocitos T CD3+, a cada población se le analizó los marcadores Tim3, CD25 y PD1.

6. 5.2.1 Linfocitos Natural killers

Siguiendo el orden anterior, en cuanto a la población de linfocitos natural killers (CD49b+CD94+) vimos una reducción del porcentaje en el grupo infectado deficiente de STAT1 en la fase aguda con diferencias significativas sobre los demás grupos, por lo que esta reducción es dependiente de STAT1 (Fig. 10).

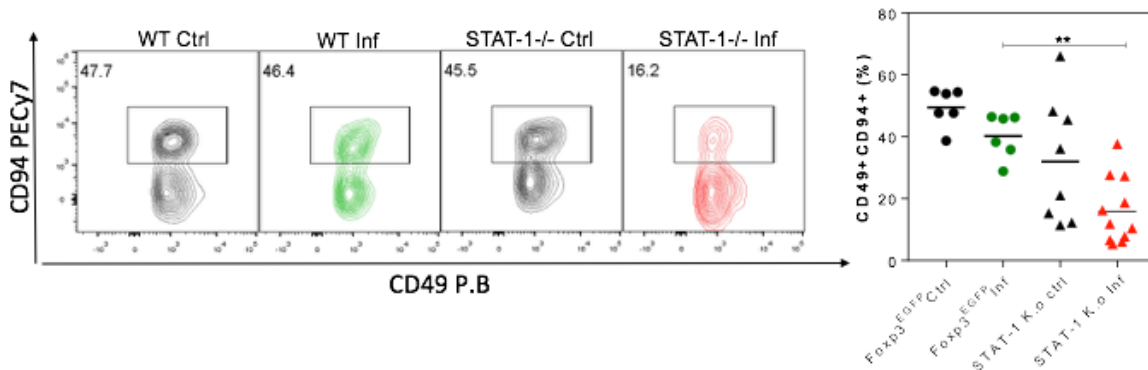


Figura 10. Plot del porcentaje de células CD49b+CD94+ totales en peritoneo durante la fase aguda. En negro se reporta los grupos WT control y STAT1^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo STAT1^{-/-} infectado. A la derecha la gráfica donde se observa una clara disminución de estas células principalmente en el grupo ausente de STAT1 en la infección.

En cuanto a los marcadores moleculares de las células NK, vemos que hay una mayor expresión de CD25 (Fig. 11A) en el grupo infectado deficiente de STAT1 con respecto a los demás grupos experimentales. Después vemos que el receptor PD1

(Fig. 11B) tiene una mayor expresión en los ratones $STAT1^{-/-}$ infectados y finalmente TIM3 (Fig. 11C) tiene un aumento significativo en el grupo $STAT1^{-/-}$ infectado. Al ver que estos receptores se expresan mas en los ratones deficientes de STAT1 lo cual sugiere que las células NK están en un estado anérgico.

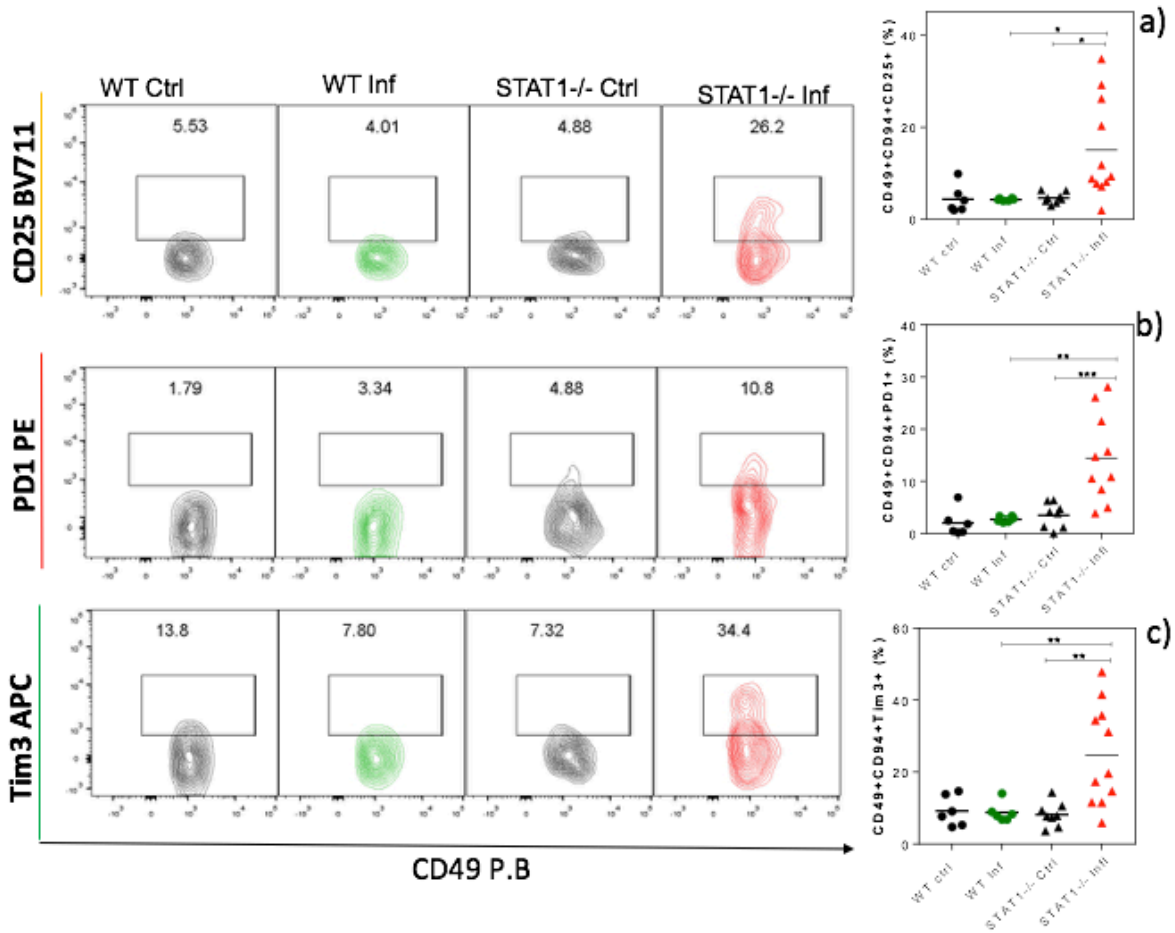


Figura 11. Marcadores de las células NK (CD49b+CD94+) en peritoneo, fase aguda. En negro se reporta los grupos WT control y $STAT1^{-/-}$ control, en verde WT infectado y en rojo $STAT1^{-/-}$ infectado.

A) Las células CD49b+CD94+CD25+ tienen un aumento significativo en el grupo ausente de STAT1 infectado. B) La población CD49b+CD94+PD1+ tiene un aumento significativo en el grupo $STAT1^{-/-}$ infectado. C) Las células CD49b+CD94+Tim3+ muestran un aumento en el grupo infectado ausente de STAT1.

6. 5.2.2 Células B

Seguidamente, analicé a la población de células CD19+ (células B), vemos que en el porcentaje total de células hay una disminución en la fase aguda en el grupos WT infectado y en el grupo infectado deficiente de STAT1 por lo que dicha reducción es dependiente de la infección y no de la ausencia de STAT1 (Fig. 12).

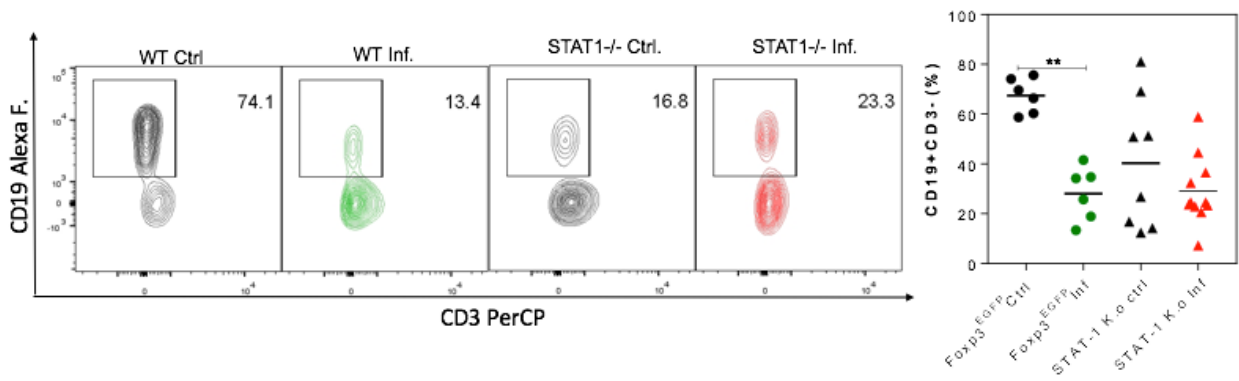


Figura 12. Porcentaje total de células CD19+ en peritoneo durante la fase aguda. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. Del lado derecho la gráfica donde muestra un aumento en los ratones control WT; mientras que en los demás grupos no hay diferencias.

El análisis de los marcadores de las células B arrojó que no hay diferencias significativas en las células CD19+CD25+ (Fig. 13A).

Por otro lado, hay un aumento de la expresión del receptor PD1 en el grupo WT infectado y en el grupo ausente de STAT1 infectado (Fig. 13B) y finalmente hay un leve aumento de Tim3 solo en el grupo *STAT1*^{-/-} (Fig. 13C) al ver el aumento de estos receptores se concluye que esta población celular tiene un perfil supresor y es a consecuencia de la infección y no de la ausencia de STAT1.

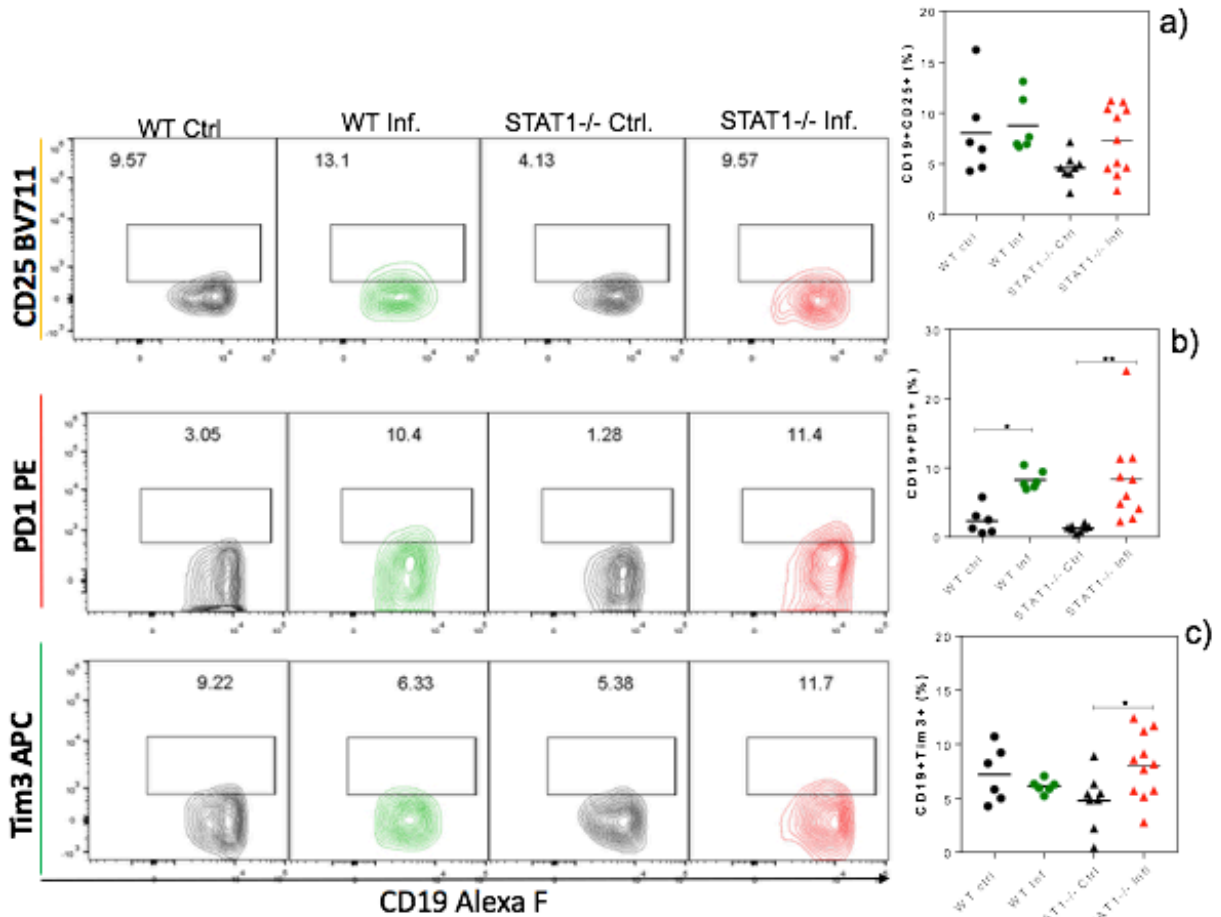


Figura 13. Marcadores de las células CD19+ A) Las células CD19⁺CD25⁺ no muestran diferencias significativas en los grupos experimentales. B) La población CD19⁺PD1⁺ muestra un aumento significativo en los grupos infectados WT y STAT1^{-/-}. C) las células CD19⁺Tim3⁺ solo muestran un aumento en los ratones infectados ausentes de STAT1.

6. 5.2.3 Linfocitos T CD3+

Finalmente de los linfocitos CD3⁺ se puede ver que no hay un aumento o disminución significativa en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 14).

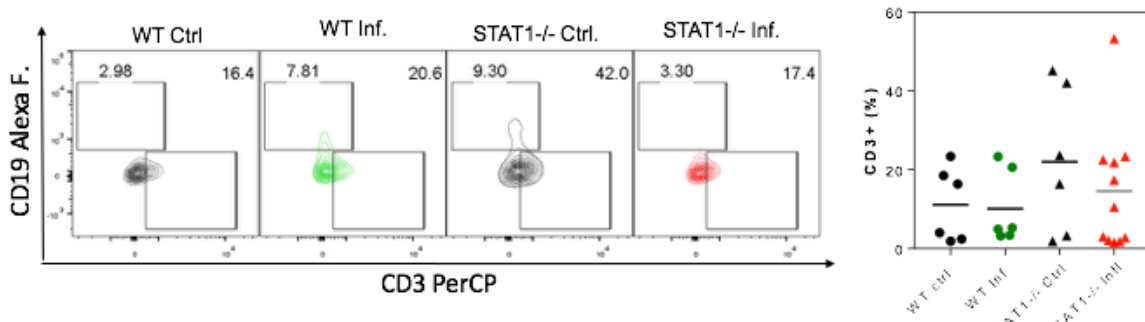


Figura 14. Porcentaje de linfocitos T CD3⁺ en peritoneo durante la fase aguda de la infección. En negro se reporta los grupos WT control y STAT1^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo STAT1^{-/-} infectado. Vemos que no hay diferencias significativas entre los grupos.

Al ver los marcadores de la población CD3+ encontramos que no hay un aumento significativo en las células CD3+CD25+ (Fig. 15A).

Por otro lado, se puede ver que hay un aumento de la expresión de PD1 en los ratones deficientes de STAT1 infectados (Fig. 15B). También vemos un aumento del receptor Tim3 solo en los ratones *STAT1*^{-/-} infectados (Fig. 15C).

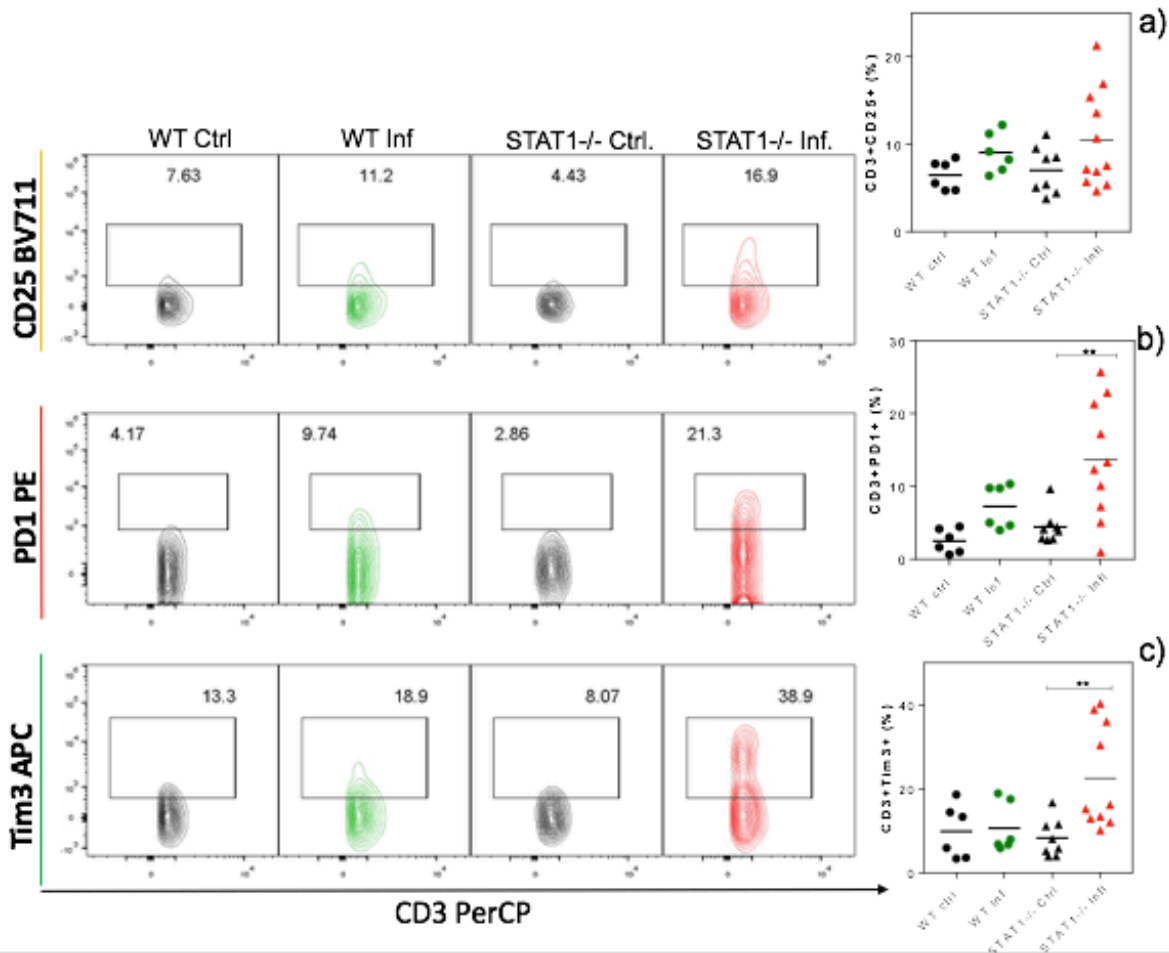


Figura 15. Marcadores de los linfocitos T CD3+ en peritoneo durante la fase aguda. A) Los linfocitos CD3+CD25+ no muestran diferencias entre los grupos. B) La población CD3+PD1+ muestra un aumento en los ratones ausentes de STAT1 infectados. C) Los linfocitos T CD3+Tim3+ tienen un aumento significativo en los ratones *STAT1*^{-/-} infectados.

El hallazgo anterior trajo como consecuencia analizar un tercer panel de citometría de flujo específico para linfocitos T en donde analizamos células T reguladoras, Linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+.

Para lo que utilizamos la siguiente estrategia de análisis: de un plot de singlets se regionalizó la población de linfocitos, después en el siguiente plot se regionalizó a los linfocitos T CD4+ y T CD8+. De la población CD4+ se analizaron a las células T reguladoras (CD4+ Foxp3+).

Posteriormente al plot de linfocitos CD4+, CD4+Foxp3+ y CD8+ se regionalizó los marcadores: CD25, PD1, Tim3 respectivamente (Fig. 16).

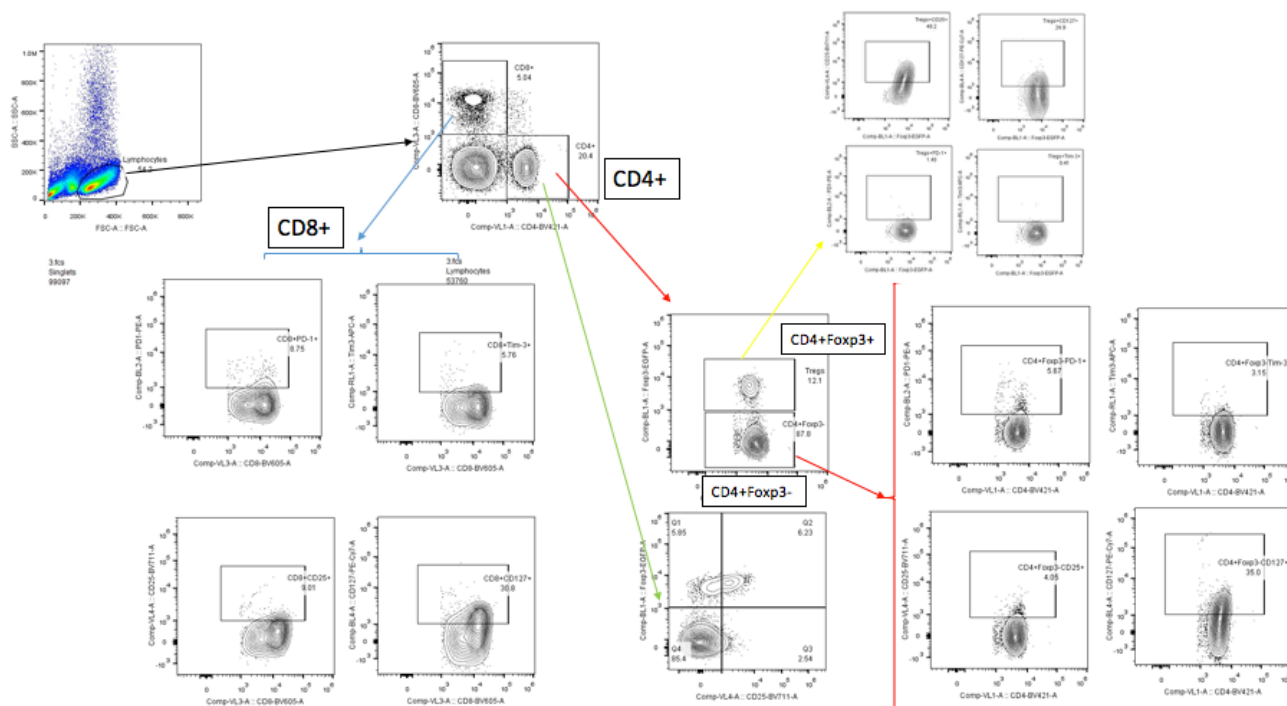


Figura 16. Estrategia de análisis de la población de linfocitos T. Se dividió en tres poblaciones: T reguladoras (CD4+Foxp3+), células T CD4+ y células T CD8+. A estas tres poblaciones se le analizó los marcadores: CD25, PD1 y Tim3.

6.5.2.4 Células T reguladoras

El papel de las células T reguladoras en la infección por *T. crassiceps* ha sido sujeto a diferentes factores tal como cepa del ratón, órgano inmunológico y fase de la infección; además por la propia naturaleza de las células T reg se decidió aprovechar la proteína verde fluorescente en el factor de transcripción Foxp3 de nuestro modelo murino para analizar a esta población en ausencia de STAT1.

Se llevó a cabo una cinética celular por citometría de flujo exclusivamente para la población T reguladora en sangre periférica.

En primera instancia podemos ver en la figura 17 como a lo largo de las semanas de infección no hay una exacerbación del porcentaje de las células T reguladoras periféricas, ya que el porcentaje no se sale de los parámetros normales en sangre de esta población que es del 5% al 10% de acuerdo al reporte de Sakaguchi en 1995; Sin embargo, los ratones *STAT1*^{-/-} tienen de manera basal un porcentaje alto desde la semana 0 hasta el fin de la infección.

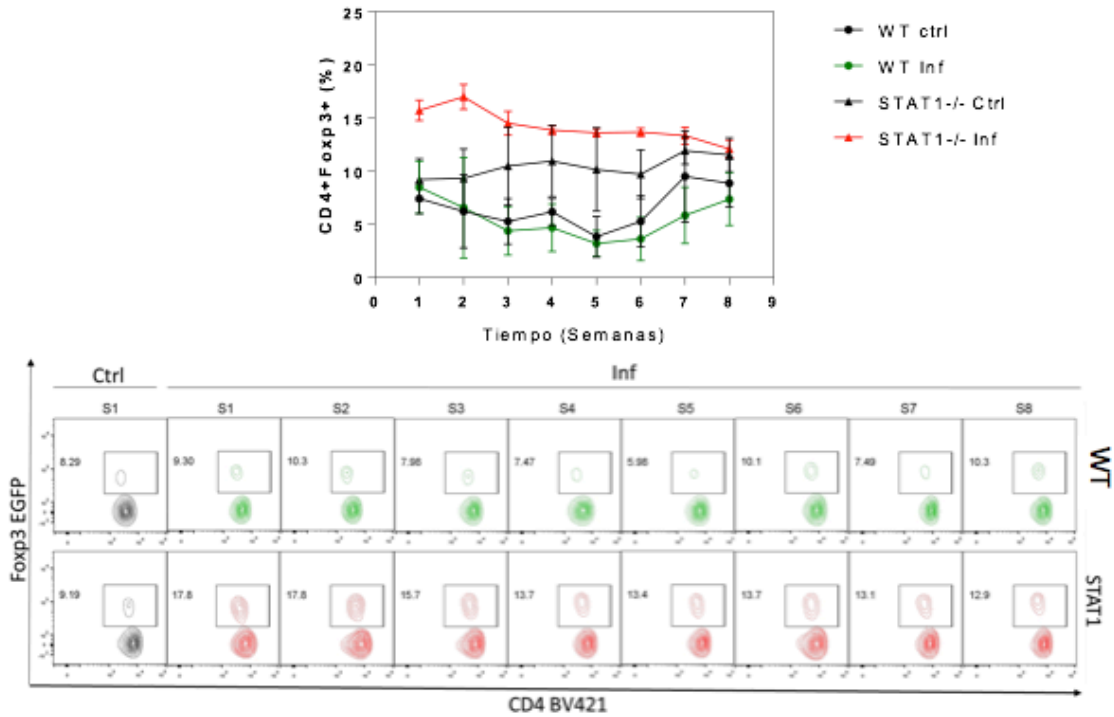


Figura 17. Cinética células de los linfocitos T reguladores periféricos a lo largo de las semanas de infección. Se puede ver que no hay una exacerbación del porcentaje normal en sangre de esta población celular en ninguno de los grupos experimentales.

Abordando los datos de la citometría de flujo en peritoneo de la fase aguda, vemos que las células T reguladoras en los grupos deficientes de STAT1 no tienen diferencias significativas; sin embargo, hay una reducción en el grupo WT infectado, por lo que decimos que esta reducción es dependiente de STAT1 (Fig. 18).

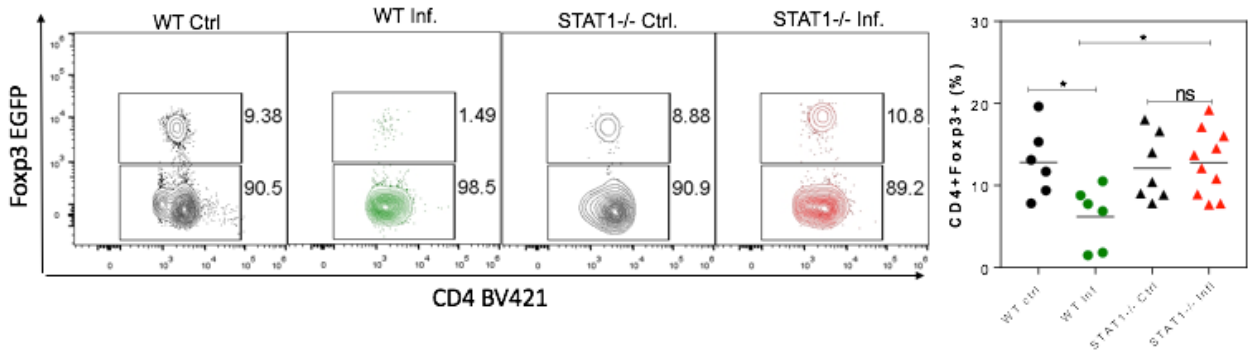


FIG 18. Porcentaje de linfocitos Treg (CD4+Foxp3+) en peritoneo durante la fase aguda de la infección. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. Se puede observar que no hay diferencias significativas entre el grupo control e infectado ausentes de STAT1. Sin embargo hay una disminución significativa en los ratones WT infectados.

En cuanto a los marcadores, vemos que en ambos grupos infectados hay un aumento de las células CD4+Foxp3+CD25+ (Fig. 19A). Las células infectadas del ratón WT aumentan la expresión de PD1 con diferencias significativas (Fig. 19B), mientras que Tim3 solo aumenta levemente en los ratones ausentes de STAT1 (Fig. 19C).

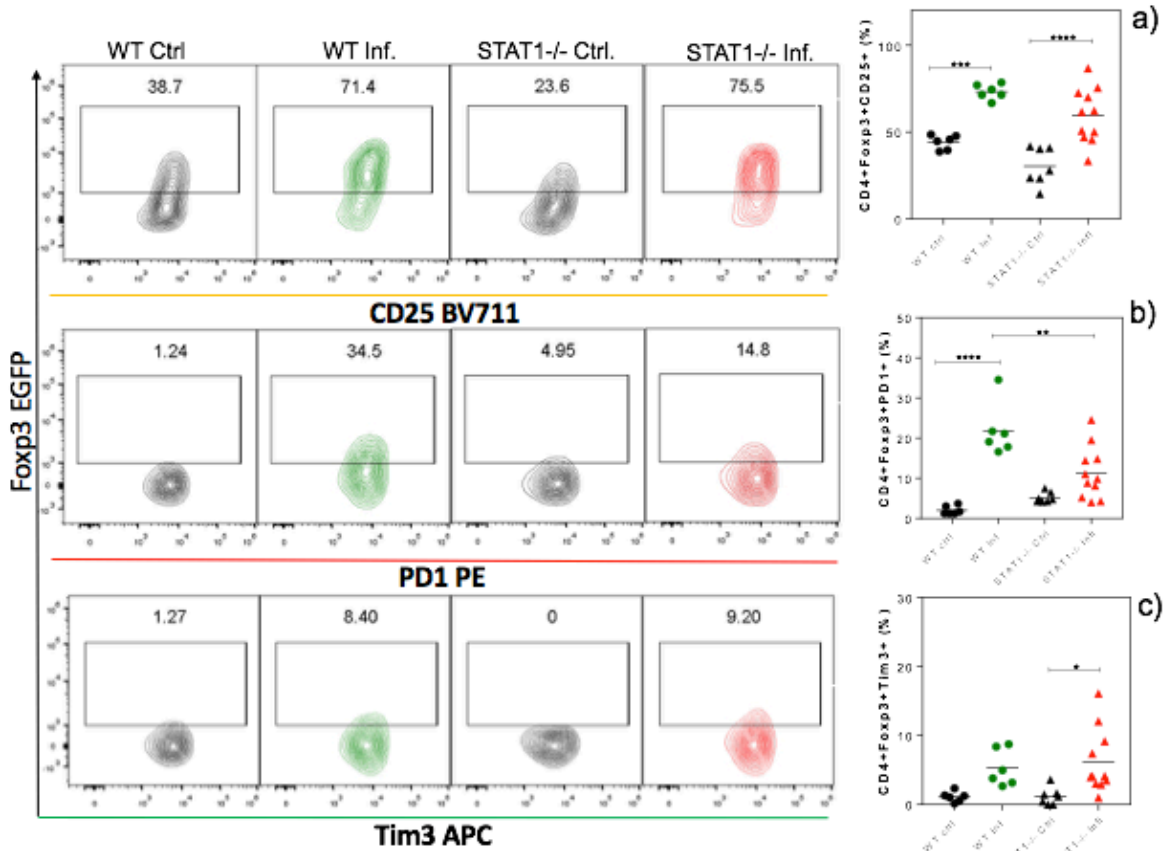


Figura 19. Marcadores de las células T reguladoras en peritoneo, fase aguda. A) las células CD4+Foxp3+CD25+ tienen un aumento significativo en ambos grupos infectados. B) La población CD4+Foxp3+PD1+ vemos un aumento significativo en el grupo WT infectado. C) Las células CD4+Foxp3+Tim3+ tienen un aumento en los ratones infectados ausentes de STAT1.

6. 5.2.5 Linfocitos T CD4+

En los resultados obtenidos de los linfocitos T CD3+ vemos un aumento interesante de los receptores PD1 y Tim3 por lo que analizamos de manera específica a las células T CD4+ y posteriormente a las células T CD8+.

Los linfocitos T CD4+ no presentan ninguna diferencia significativa en el marcador CD25+ (Fig. 20A).

En cuanto al receptor PD1 hay un aumento en los ratones WT infectados así como en los ratones ausentes de STAT1 infectados (Fig. 20B).

Tim3 (Fig. 20C) solo tiene un aumento en en grupo ausente de STAT1 infectado. El aumento en la expresión de estos receptores sugiere que esta población presenta un perfil supresor y es parcialmente dependiente de la infección y no de la ausencia de STAT1.

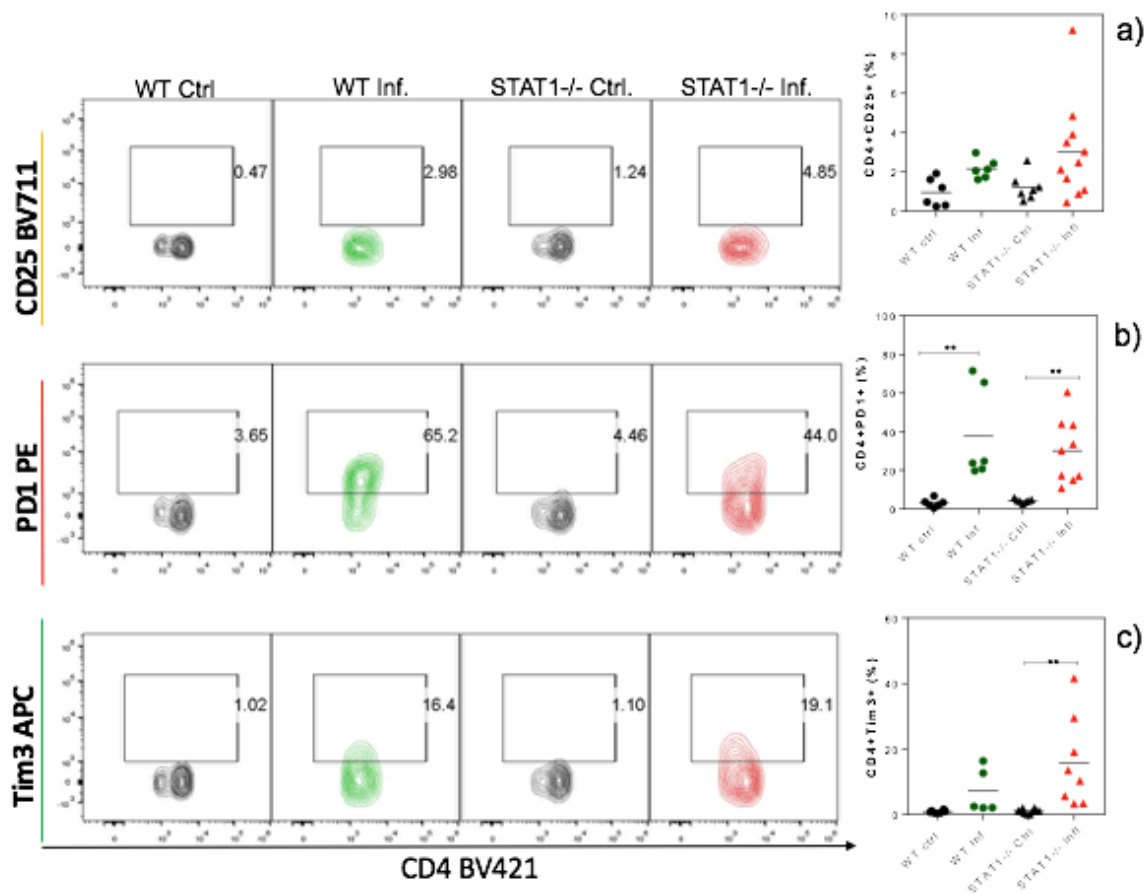


Figura 20. Vemos a la población de linfocitos T CD4⁺ con sus marcadores durante la infección aguda. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. A) Las células CD4⁺CD25⁺ no muestran diferencias significativas. B) La población CD4⁺PD1⁺ tiene un aumento significativo en ambos grupos infectados. C) Las células CD4⁺Tim3⁺ tiene un aumento en el grupo *STAT1*^{-/-} infectado.

6.5.2.6 Linfocitos T CD8⁺

En cuanto a la población CD8⁺ no vemos una diferencia significativa en CD25⁺ (Fig. 21A).

De manera interesante vemos un aumento en el receptor PD1 en los ratones *STAT1* K.O infectados (Fig. 21B) y por su parte TIM3 (Fig. 21C) también muestra un aumento en el grupo infectado y deficiente de *STAT1*.

En esta población celular, la expresión de dichos receptores sugiere un posible perfil de anergia que es parcialmente dependiente de *STAT1*.

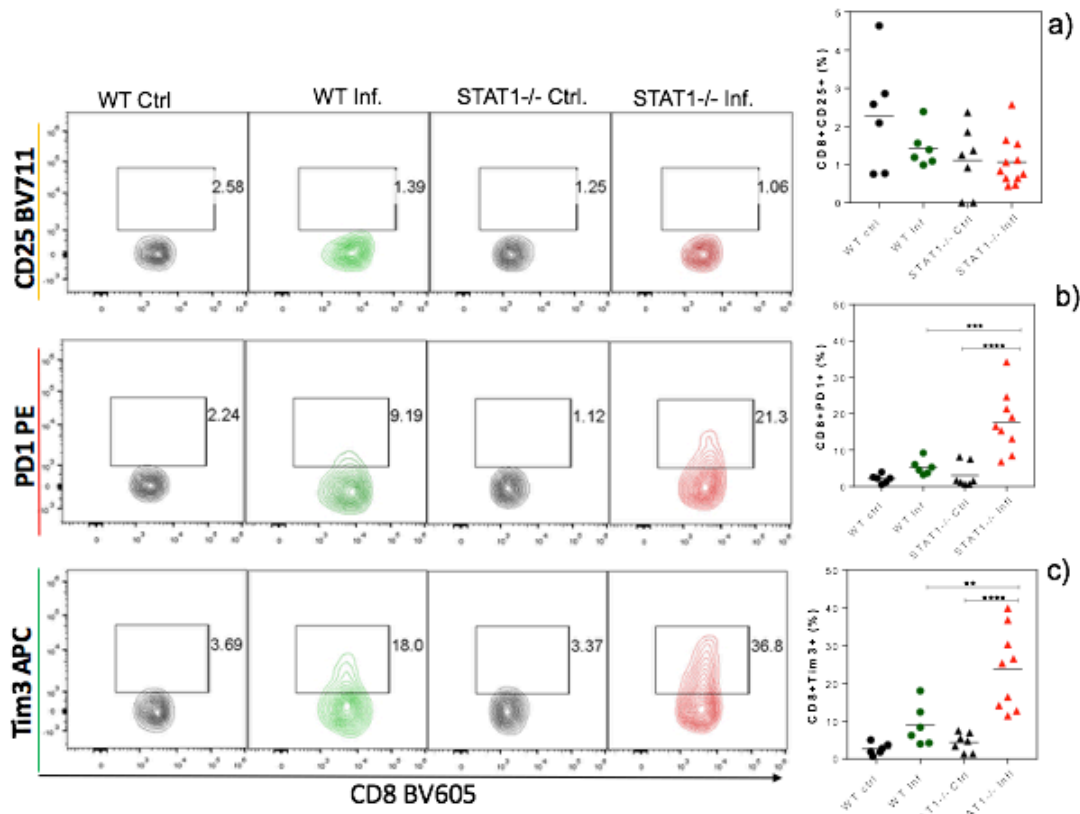


Figura 21. Población de linfocitos T CD8⁺ con sus marcadores durante la infección aguda. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. A) Los linfocitos CD8⁺CD25⁺ no tienen diferencias significativas. B) Hay un aumento significativo de células CD8⁺PD1⁺ solo en el grupo infectado y ausente de *STAT1*. C) La población CD8⁺Tim3⁺ tiene un aumento significativo en el grupo *STAT1*^{-/-} infectado.

6.6 Análisis de poblaciones celulares en peritoneo por citometría de flujo. Peritoneo. Fase crónica

6. 6.1 Linaje mieloide.

En primera instancia se analizó la población de origen mieloide de acuerdo a la siguiente estrategia de análisis de un dot plot de tamaño contra granularidad, se seleccionó a las células grandes y granulosas, después se tomó otro dot plot para dividir en células F480⁺ y Gr1⁺. De cada población se seleccionó tres dot plot: CCR2⁺, PDL2⁺ y Gal9⁺ (Fig. 22).

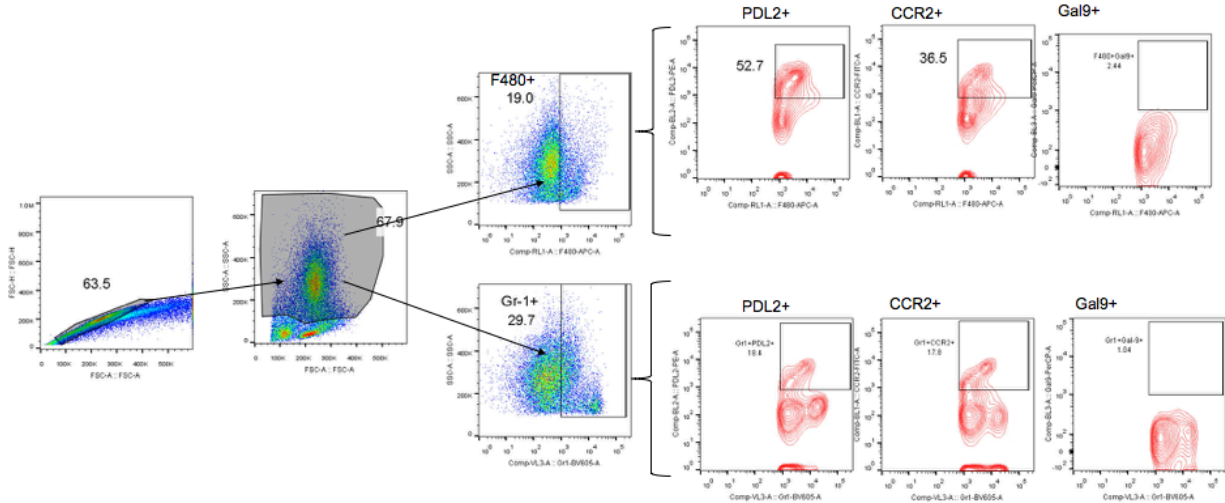


Figura 22. Estrategia de análisis de la población mioide en la fase crónica de la infección. En primera instancia tomé de un Plot de singlets, las células grandes y granulosa, posteriormente vamos a regionalizar con base en dos marcadores F480+ y Gr1+. y en ambas poblaciones medimos CCR2, PDL2 y Gal9.

6.6.1.1 Macrófagos F480+

El análisis por citometría de flujo reveló que los macrófagos F480+ del grupo *STAT1*^{-/-} disminuyen la expresión de CCR2, mientras que en los demás grupos no hay diferencias significativas (Fig. 23A). Este hallazgo sugiere que del paso de la fase aguda a la fase crónica, la disminución de la expresión de este receptor es parcialmente dependiente de STAT1.

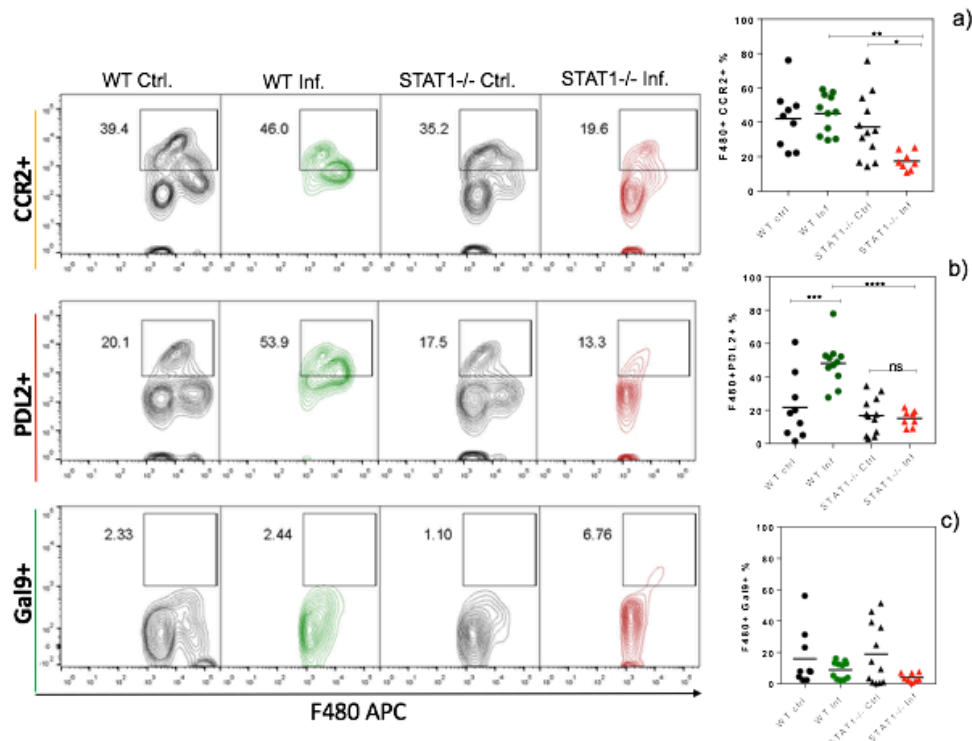


Figura 23. Dot plots de los macrófagos F480+ en peritoneo durante la fase crónica.

A) Los macrófagos F480+ CCR2+ muestran una disminución significativa en los ratones *STAT1*^{-/-}. B) Las células F480+ PDL2+ no muestran diferencia significativa entre los grupos control e infectados ausentes de

STAT1 y un aumento significativo de los ratones WT infectados. C) No hay diferencias significativas en los macrófagos F480+Gal9+ entre grupos.

También se encontró que hay un aumento de manera significativa de la población F480+PDL2+ en el grupo WT Inf (Fig. 23B), en los grupos ausentes de STAT1 no vemos un aumento de este ligando por lo que la ausencia de STAT1 afecta parcialmente a esta población celular.

Y en cuanto al marcador Gal9, no hubo diferencias en ningún grupo experimental (Fig. 23C).

6.6.1.2. Células mieloides Gr1+

En referencia al análisis de la población Gr1+ se encontró que hay una disminución de las células Gr1+CCR2+ en los grupos WT y *STAT1*^{-/-} infectados (Fig. 24A). No hay diferencias significativas entre grupos experimentales en la población Gr1+PDL2+ y Gr1+Gal9+ (Fig. 24B y C).

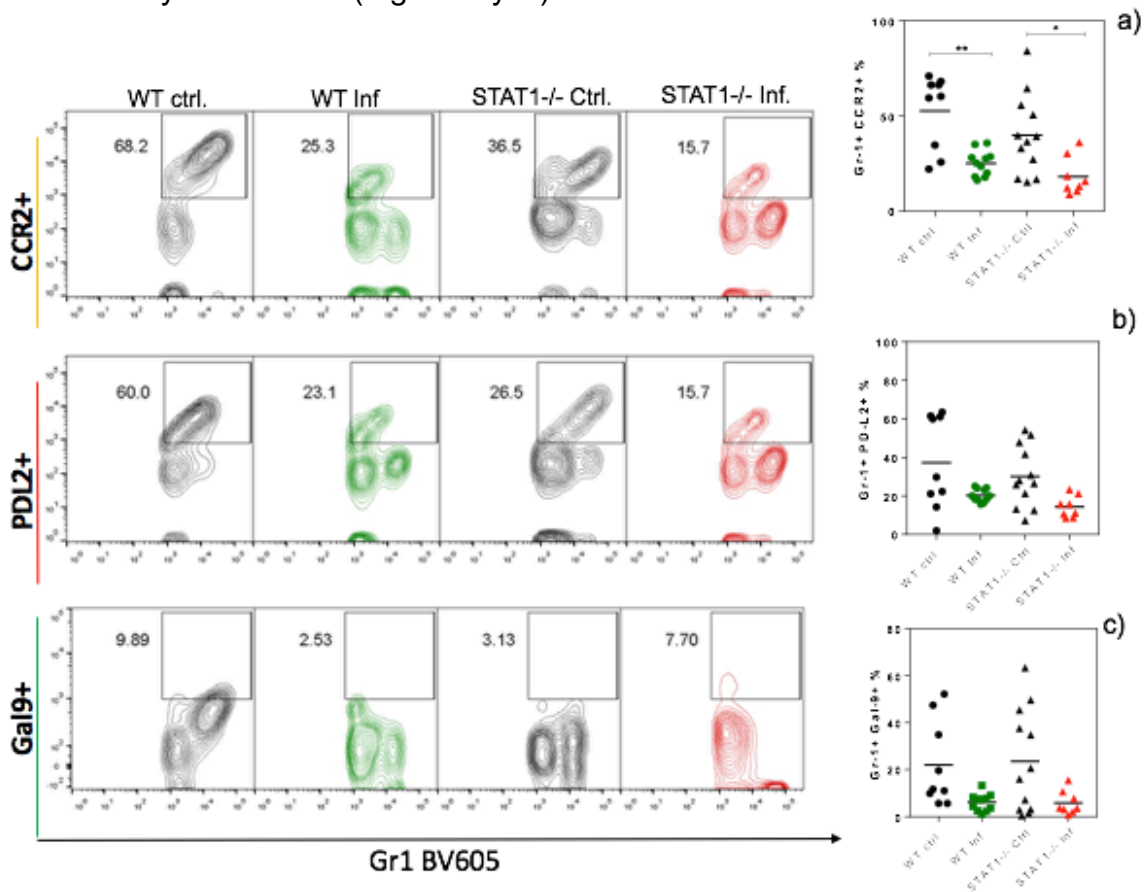


Figura 24. Dot plots de las células mieloides Gr1+ en peritoneo en la fase crónica

A) Las células Gr1+CCR2+ muestran una disminución significativa en los grupos infectados. B) La población GR1+ PDL2+ no muestra diferencias significativas entre grupos experimentales. C) No hay diferencias en el porcentaje de células Gr1+Gal9+ en ningún grupo.

6.6.2 Linaje linfoide.

Al igual que la fase aguda, se usó la estrategia de análisis (Fig. 9). Las poblaciones que se estudiaron fueron: CD49b+CD94+ (*Natural killers*), CD19+ (Células B) y linfocitos T CD3+. Con los marcadores: CD25, PD1 y TIM3

6.6.2.1 Linfocitos Natural killers

En una primera instancia, al igual que en la fase aguda, encontré que en esta fase hay una disminución de las células natural killers en el grupo deficiente de STAT1 y que es parcialmente dependiente de la ausencia de STAT1 (Fig. 25).

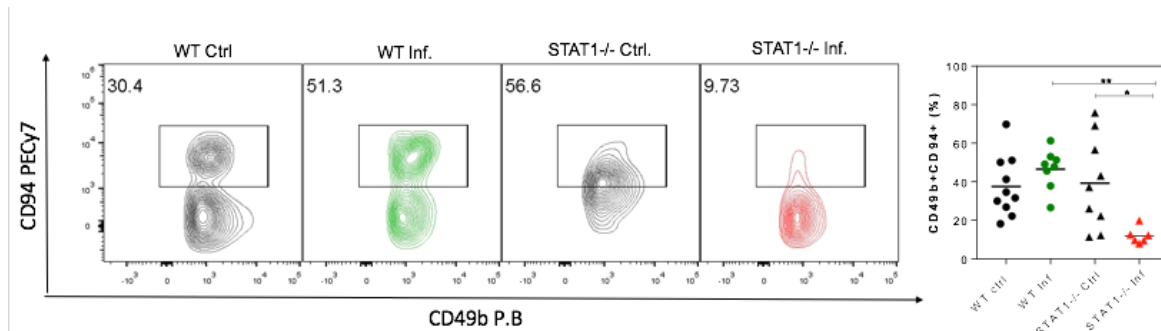


Figura 25. Plot del porcentaje de células CD49b+CD94+ totales en peritoneo durante la fase crónica. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. A la derecha la gráfica donde se observa una clara disminución de estas células principalmente en el grupo ausente de STAT1 en la infección.

De manera interesante, al igual que en la fase aguda, los ratones *STAT1*^{-/-} infectados tienen un aumento significativo de la población CD49b+CD94+CD25+ (Fig. 26A).

También hay un aumento de población CD49b+CD94+PD1+ en los ratones infectados ausentes de STAT1 sobre los demás grupos experimentales (Fig. 26B). Finalmente las células CD49b+CD94+Tim3+ también presentan un aumento en los ratones *STAT1*^{-/-} infectados (Fig. 26C) lo que sugiere que durante toda la infección las células NK presentan un posible perfil anérgico y es dependiente de STAT1.

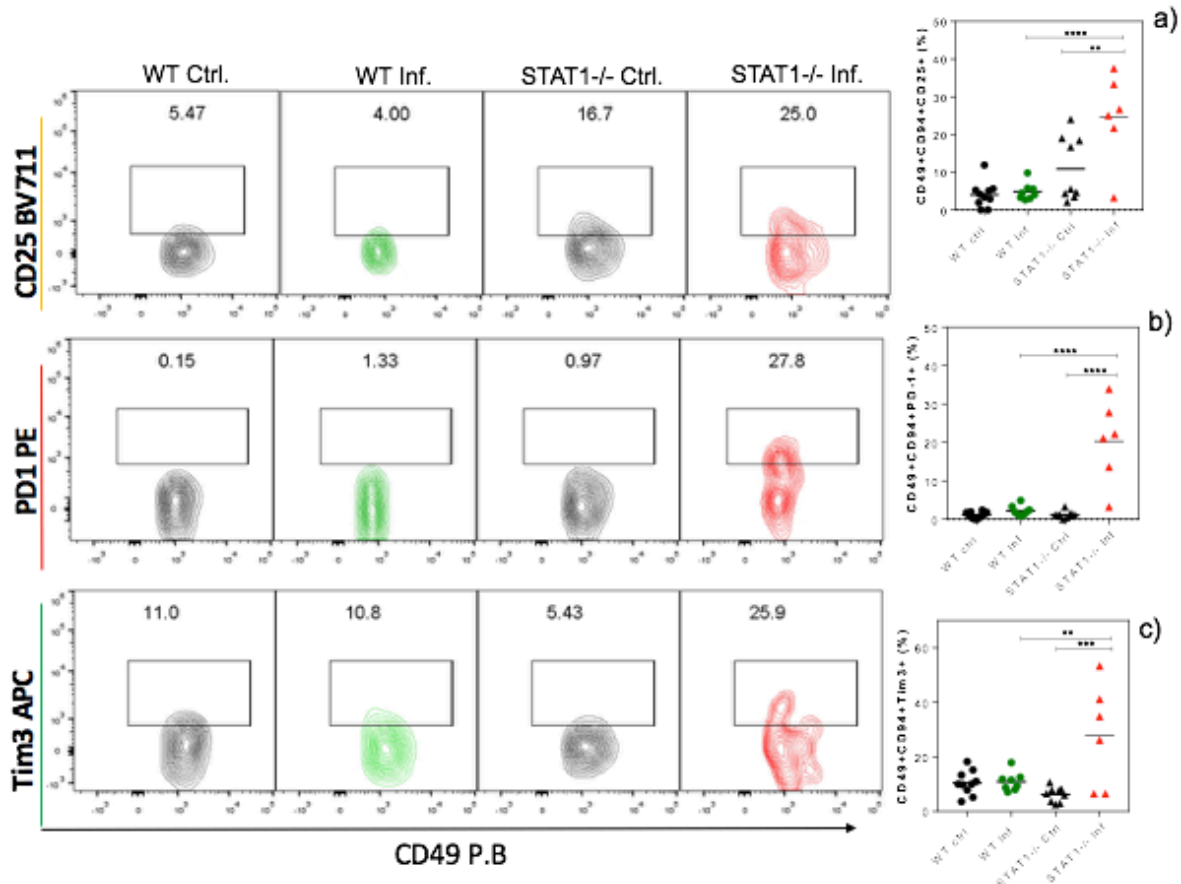


Figura 26. Marcadores de las células NK (CD49b+CD94+) en peritoneo, fase crónica. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. A) Las células CD49b+CD94+CD25+ tienen un aumento significativo en el grupo ausente de STAT1 infectado. B) La población CD49b+CD94+PD1+ tiene un aumento significativo en el grupo *STAT1*^{-/-} infectado. C) Las células CD49b+CD94+Tim3+ muestran un aumento en el grupo infectado ausente de STAT1.

6.6.2.2 Células B

El porcentaje de células CD19+ disminuye en ambos grupos infectados (Fig. 27), por lo que inferimos que esto es consecuencia de la infección y no a la ausencia de STAT1.

Por el lado de los marcadores, la población CD19+CD25+ no tienen diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 28B).

Hay un aumento de PD1 en ambos grupos infectados (Fig 27. C) y un leve aumento de Tim3 solo en el grupo infectado deficiente de STAT1 (Fig. 28D) , por lo que atribuimos este aumento a la infección per se.

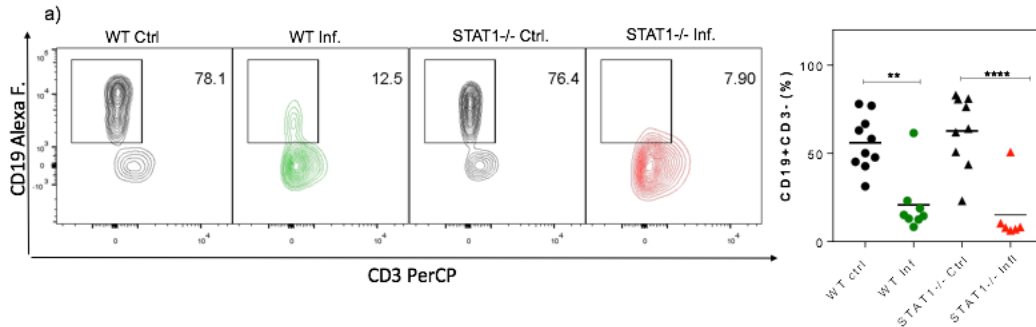


Figura 27. Porcentaje total de células CD19+ en peritoneo durante la fase crónica. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado.

A) Del lado derecho la gráfica donde nos muestra una disminución en los ratones control WT infectados así como los infectados ausentes de STAT1.

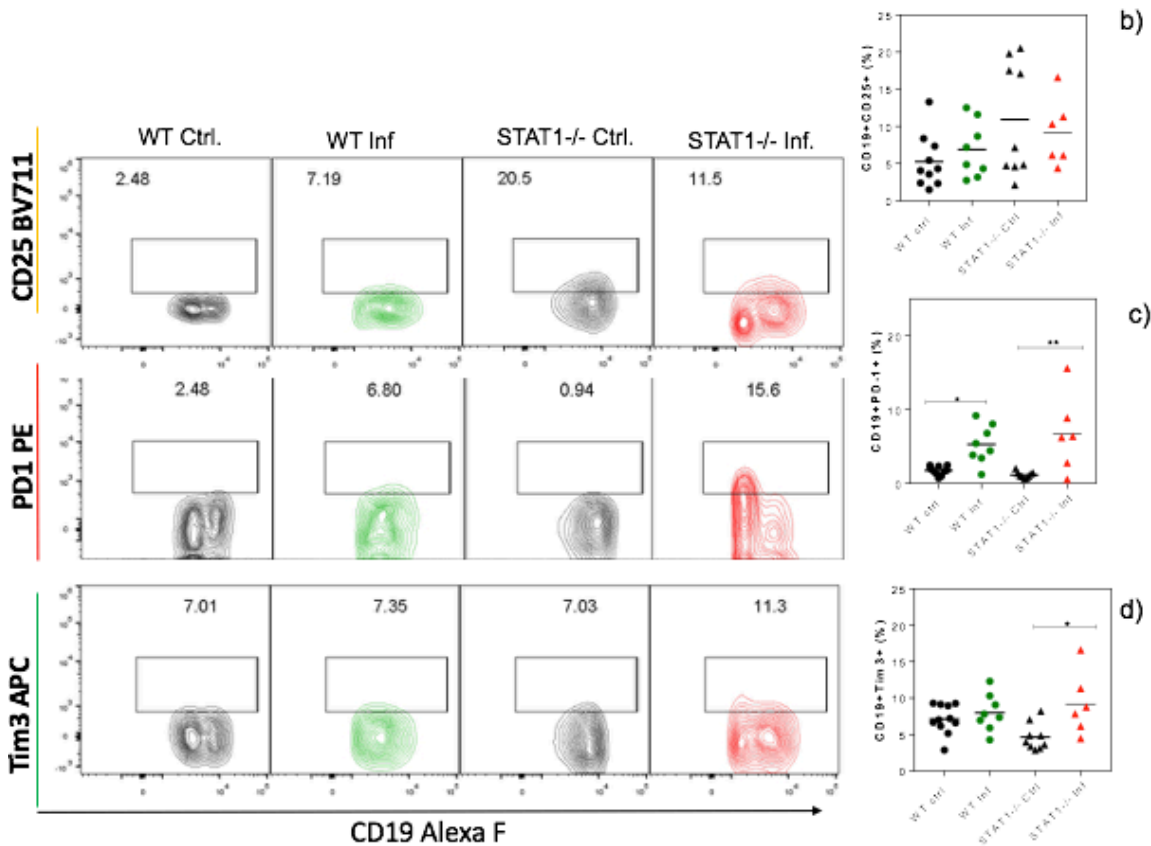


Figura 28. Marcadores de las células CD19+ b) Las células CD19+CD25+ no muestran diferencias significativas en los grupos experimentales. c) La población CD19+PD1+ muestra un aumento significativo en los grupos infectaos WT y *STAT1*^{-/-} d) las células CD19+Tim3+ solo muestran un aumento en los ratones infectados ausentes de STAT1.

6.6.2.3 Linfocitos CD3+

El análisis de los linfocitos CD3+ muestra que no hay una diferencias significativas en el porcentaje de células entre los grupos experimentales (Fig. 29A).

Siguiendo con el análisis de los receptores vemos que hay un aumento del porcentaje de células CD3+CD25+ en los ratones *STAT1*^{-/-} que es significativamente mayor que el ratón WT infectado (Fig. 29B).

En cuanto al receptor PD1 solo muestra un aumento en el ratón WT (Fig. 29C) y por parte de TIM3 solo hay un aumento en los ratones deficientes de STAT1 infectados (Fig. 29D), al igual que en la fase aguda, los datos sugieren que el posible perfil supresor de este grupo celular es dependiente de la infección.

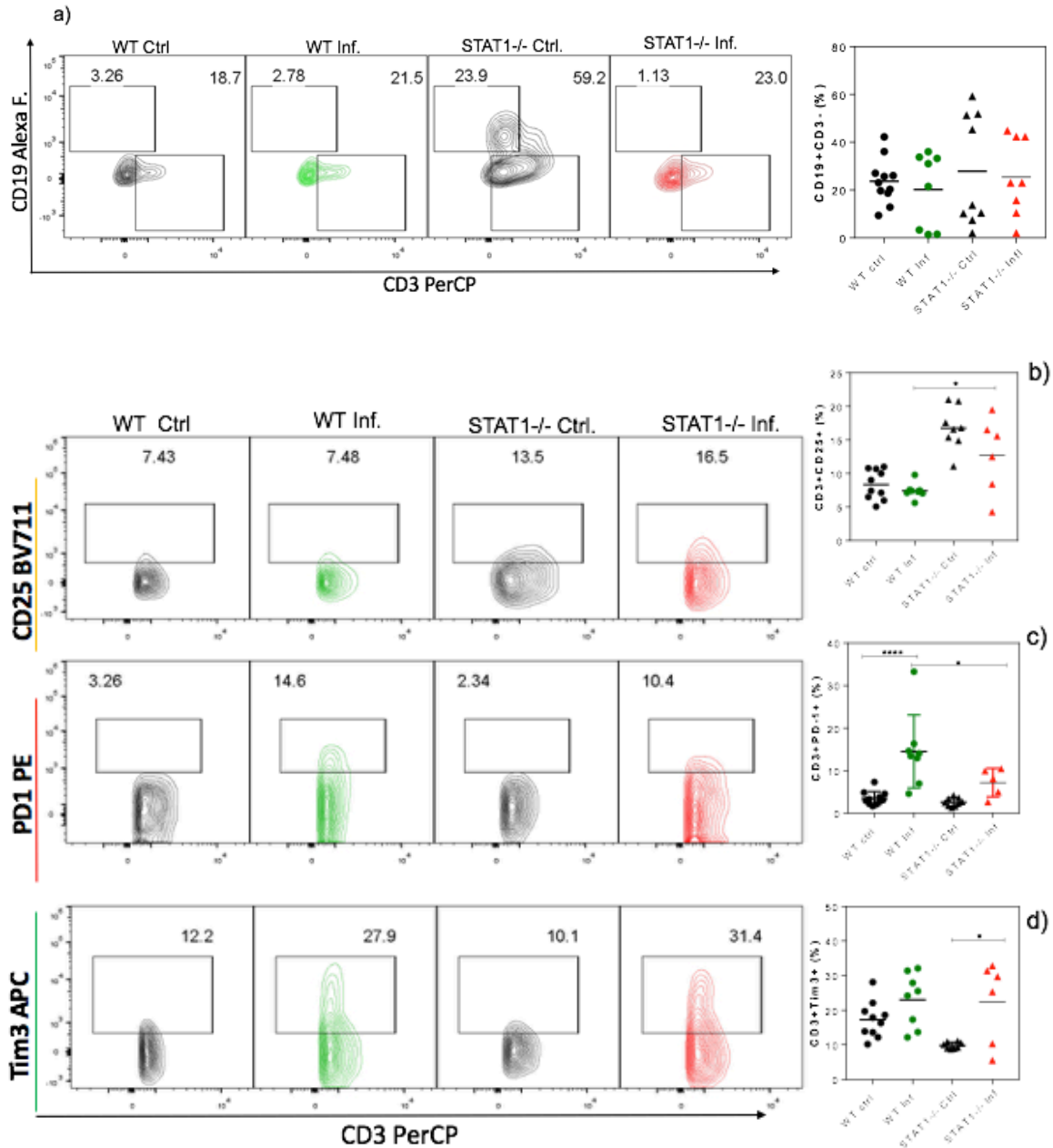


Figura 29. Porcentaje de linfocitos T CD3⁺ en peritoneo durante la fase aguda de la infección. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. A) Vemos que no hay diferencias significativas entre los grupos. B) Los linfocitos CD3⁺CD25⁺ muestran un aumento en el grupo control ausente de STAT1. C) La población CD3⁺PD1⁺ muestra un aumento en los ratones ausentes de STAT1 infectados y WT. D) Los linfocitos T CD3⁺Tim3⁺ tienen un aumento significativo en los ratones *STAT1*^{-/-} infectados.

Al igual que en la fase aguda, se usó el mismo el panel para analizar a la población de células Tregs, los linfocitos T CD4+ y los linfocitos CD8+ con los marcadores CD25, PD1 y Tim3 (Fig. 16).

6.6.2.4 Células T reguladoras.

Las células Tregs al igual que en la fase aguda, no hay diferencias entre los grupos ausentes de STAT1, mientras que el el grupo WT hay una disminución significativa respecto a los demás grupos, por lo que esto es parcialmente dependiente de STAT1 (Fig. 30).

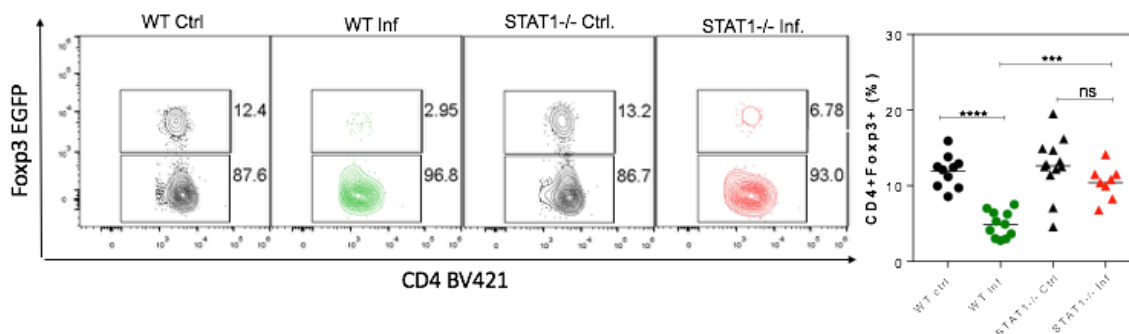


Figura 30. Porcentaje de linfocitos Treg (CD4+Foxp3+) en peritoneo durante la fase crónica de la infección. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. Vemos que no hay diferencias significativas entre el grupo control e infectado ausentes de STAT1; Sin embargo, hay una disminución significativa en los ratones WT infectados.

En cuanto a los resultados de los marcadores, vemos que hay un aumento de la expresión de CD25+ en ambos grupos infectados (Fig. 31A).

No hay diferencias significativas en la expresión de PD1 entre los grupos experimentales (Fig. 31B) y por parte del receptor Tim3 vemos que hay un leve aumento en su expresión en los ratones infectados ausentes de STAT1 (Fig. 31C).

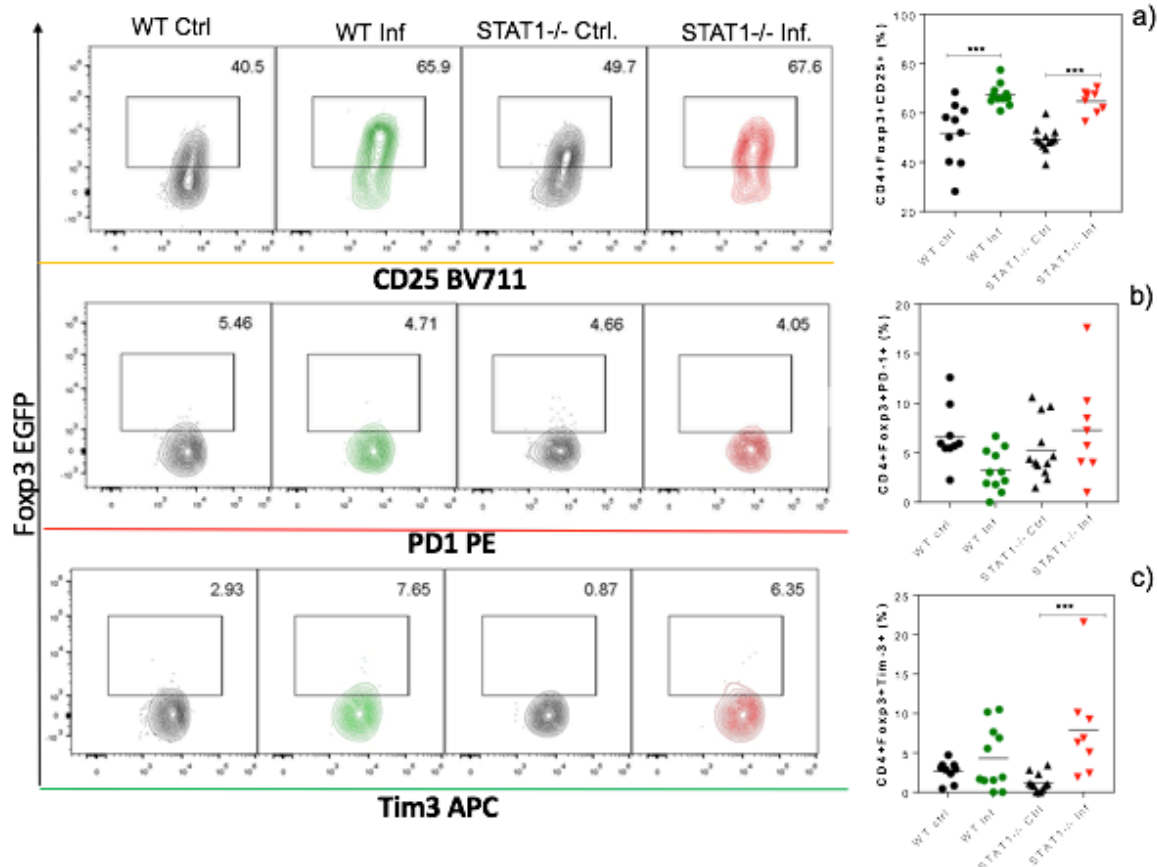


Figura 31. Marcadores de las células T reguladoras en peritoneo, fase crónica. A) Las células CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ tienen un aumento significativo en ambos grupos infectados. B) La población CD4⁺Foxp3⁺PD1⁺ no muestra diferencias significativas. C) Las células CD4⁺Foxp3⁺Tim3⁺ tienen un aumento en los ratones infectados ausentes de STAT1.

6.6.2.5 Linfocitos CD4⁺

Los linfocitos CD4⁺ en la fase crónica vemos que hay un aumento de CD25 en ambos grupos infectados (Fig. 32A), en cuanto al receptor PD1 no hay diferencias entre los grupos experimentales (Fig. 32B).

Finalmente Tim3 solo hay un aumento en los ratones *STAT1*^{-/-} infectados (Fig. 32C); por lo que concluyo que este posible perfil de anergia o supresión puede deberse a la infección y no a la ausencia de STAT1.

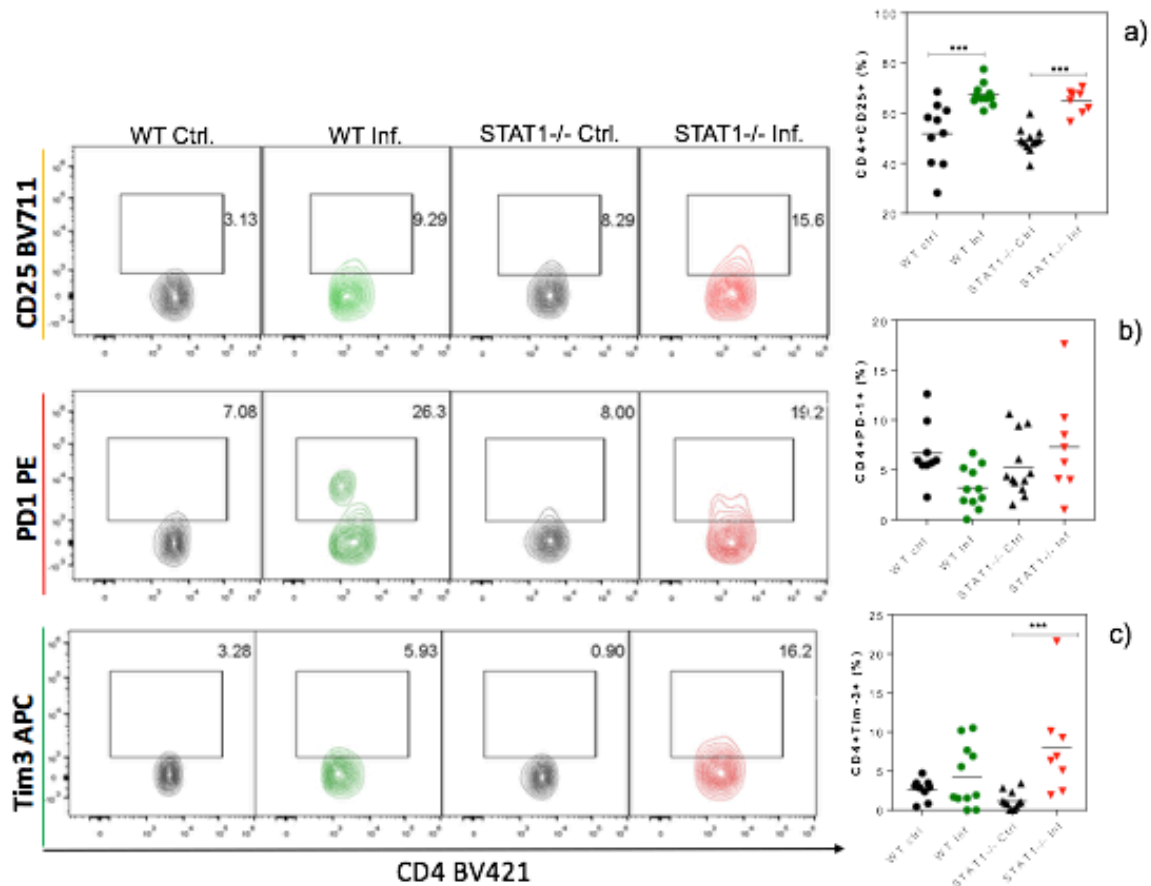


Figura 32. Marcadores de activación/supresión en linfocitos T CD4+. Análisis de la población de linfocitos T CD4+ con sus marcadores durante la infección crónica. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. A) Las células CD4+CD25+ muestran diferencias significativas en ambos grupos infectados. B) La población CD4+PD1+ no tiene un aumento significativo entre los grupos experimentales. C) Las células CD4+Tim3+ tiene un aumento en el grupo *STAT1*^{-/-} infectado.

6.6.2.6 Linfocitos T CD8+

En cuanto a la población CD8+, al igual que en la fase aguda, vemos que no hay un aumento en el marcador CD25 en ningún grupo experimental (Fig. 33A).

En cuanto al receptor PD1 vemos que no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 33B); sin embargo, hay aumento significativo de Tim3 en los ratones deficientes de STAT1 infectados (Fig. 33C), llegamos a la conclusión de que esta población celular mantiene un perfil anérgico en la infección y es parcialmente dependiente de STAT1.

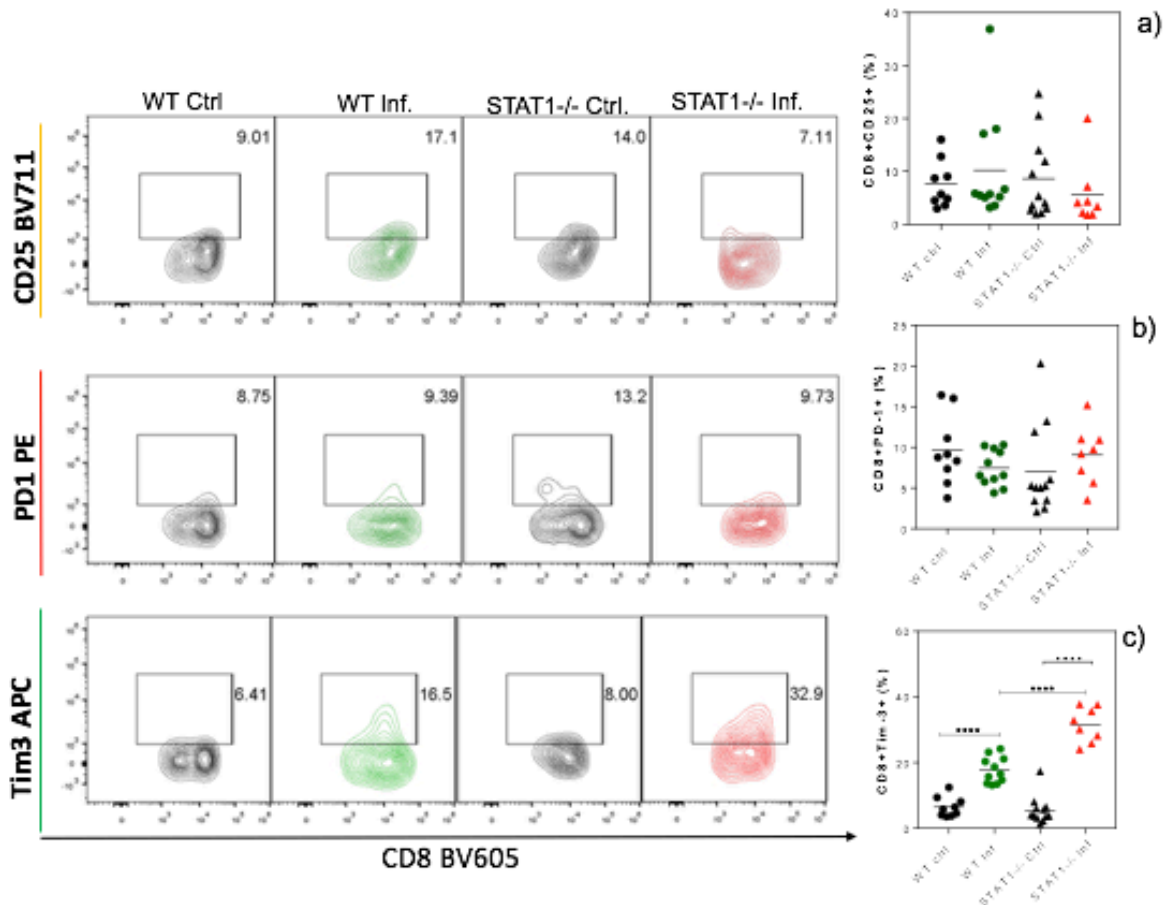


FIG 33. Población de linfocitos T CD8+ con sus marcadores durante la infección crónica. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. A) Los linfocitos CD8+CD25+ no tienen diferencias significativas. B) No hay cambios significativos de células CD8+PD1+ entre los grupos experimentales. C) La población CD8+Tim3+ tiene un aumento significativo en el grupo *STAT1*^{-/-} infectado, así como el grupos WT infectado.

6.7 Ensayo de proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ peritoneales.

Después de haber realizado el sorting de linfocitos peritoneales, la tinción con colorante CellTrace™ Violet Cell y la tinción por anticuerpos para citometría, se analizó con base en la siguiente estrategia de análisis (Fig. 34).

En primera instancia, en cuanto a los linfocitos T CD4+ en el grupo WT se observa una proliferación constante del grupo control, infección aguda e infección crónica (Fig. 35A). En cuanto al grupo ausente de STAT1 vemos una proliferación de estos linfocitos en el grupo control e infección aguda; sin embargo, hay un aumento notorio de la proliferación en fase crónica (Fig. 35B).

Por otra parte, los linfocitos CD8+ en el grupo WT hay una proliferación en los grupos control, infectado fase aguda e infectado fase crónica (Fig. 36A).

Referente al grupo *STAT1*^{-/-}, el grupo control muestra proliferación. En la fase aguda la proliferación de estos linfocitos parece decaer y en la fase crónica hay un aumento notable de este fenómeno (Fig. 36B).

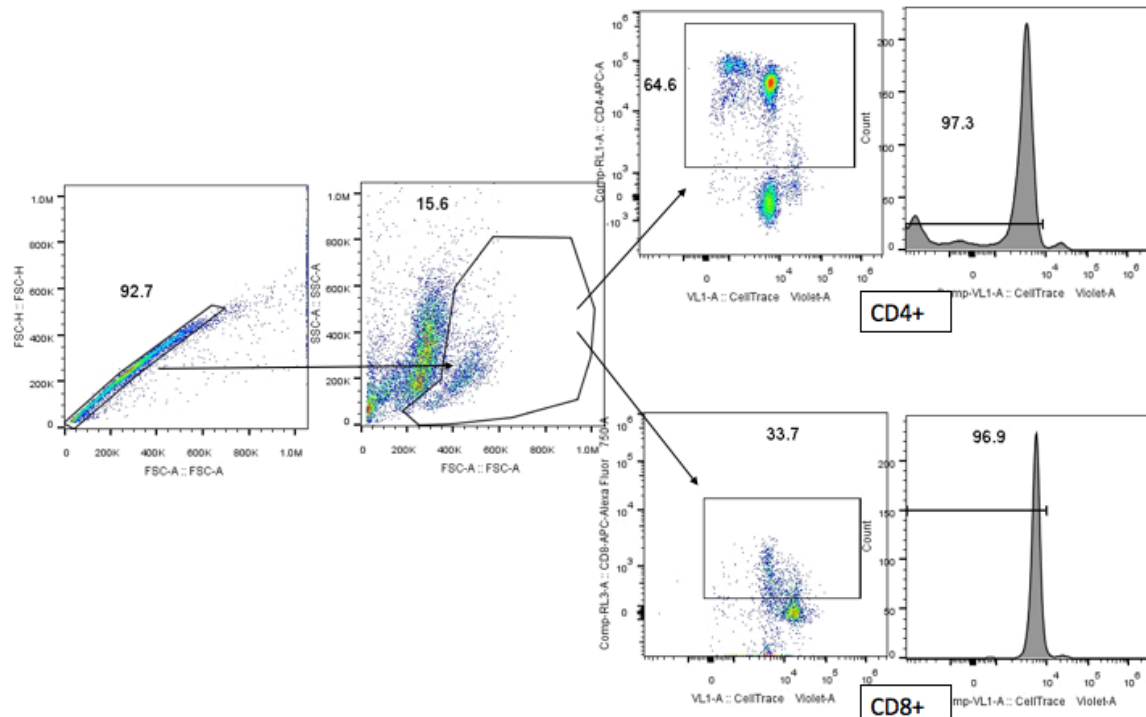


Figura 34. Estrategia de análisis para en ensayo de proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ de un primer dot plot seleccioné los singlets, posteriormente seleccioné los linfocitos y dividí en dos poblaciones: CD4+ y CD8+. Ambas analizamos (en el eje Y) histograma y (eje X) el colorante CellTrace Violet.

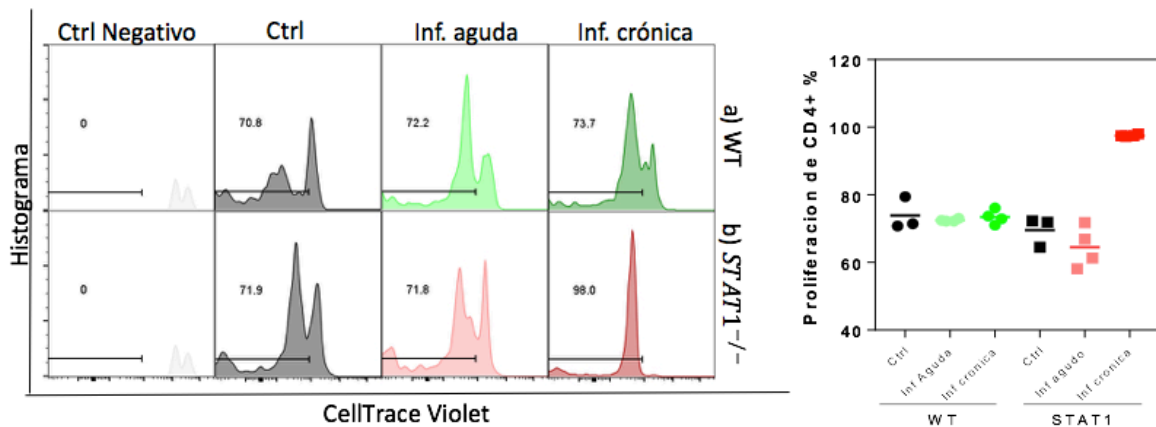


Figura 35. Ensayo proliferación de linfocitos T CD4+, en blanco los controles negativos (células sin estímulo), en negro los grupos control WT y STAT1^{-/-}, en verde los grupos WT infección aguda e infección crónica, en rojo STAT1^{-/-} infección aguda e infección crónica. A) El plot del grupo WT muestra proliferación parecida en los tres grupos experimentales. B) En el grupo ausente de STAT1 hay una proliferación celular parecido en los grupos control e infección aguda y un aumento en la infección crónica.

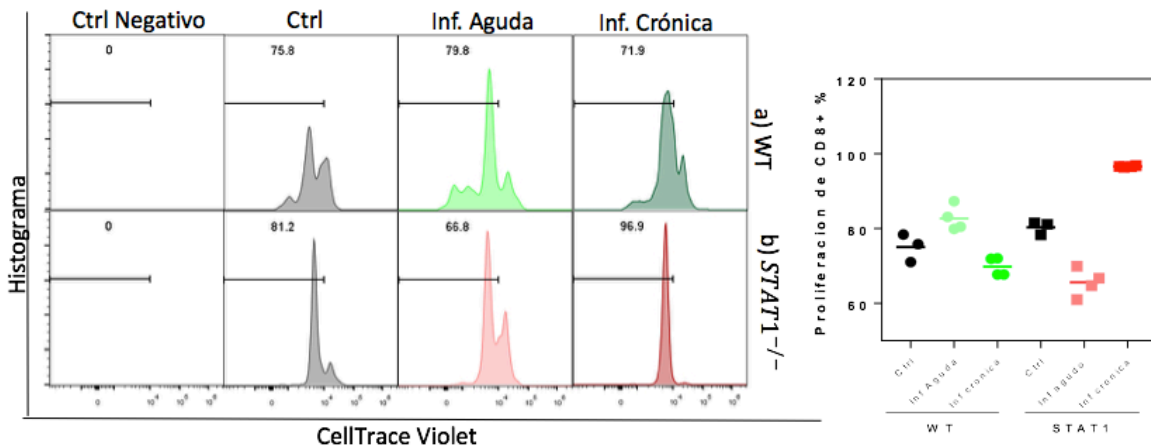


Figura 36. Ensayo proliferación de linfocitos T CD8⁺, en blanco los controles negativos (células sin estímulo), en negro los grupos control WT y *STAT1*^{-/-}, en verde los grupos WT infección aguda e infección crónica. En rojo *STAT1*^{-/-} infección aguda e infección crónica. A) El plot del grupo WT muestra proliferación parecida en los tres grupos experimentales. B) En el grupo ausente de STAT1 hay una proliferación celular parecido en los grupos control e infección aguda, y un aumento en la infección crónica.

6.8 Bazo. Fase aguda y crónica.

En bazo, se llevó a cabo Inmunofluorescencia por citometría de flujo para linfocitos de acuerdo a la estrategia de análisis (Fig. 16); sin embargo, solo nos enfocamos en las células Tregs. En primera instancia vemos que no hay diferencias significativas entre grupos experimentales, vemos un porcentaje basal alto en los ratones ausentes de STAT1 (Fig. 37).

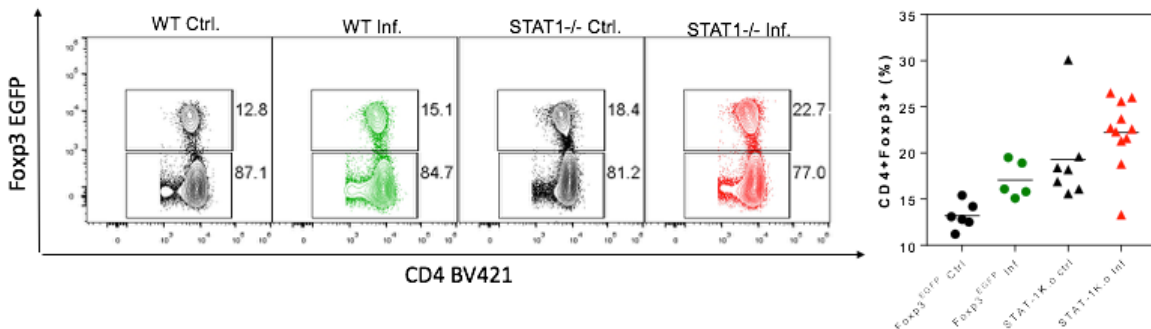


Figura 37. Porcentaje de linfocitos Treg (CD4⁺Foxp3⁺) en bazo durante la fase aguda de la infección. En negro se reporta los grupos WT control y *STAT1*^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo *STAT1*^{-/-} infectado. Vemos que no hay diferencias significativas entre el grupo control e infectado ausentes de STAT1

Referente a los marcadores CD25, PD1 y Tim3, observé que no hay diferencias significativas entre los grupos experimentales, en cuanto a CD25 (Fig. 38A) tampoco hay diferencias en cuanto a la expresión de PD1 (Fig. 38B); sin embargo, en Tim3 hay un aumento en el grupo WT infectado y ausente de STAT1 infectado (Fig. 38C).

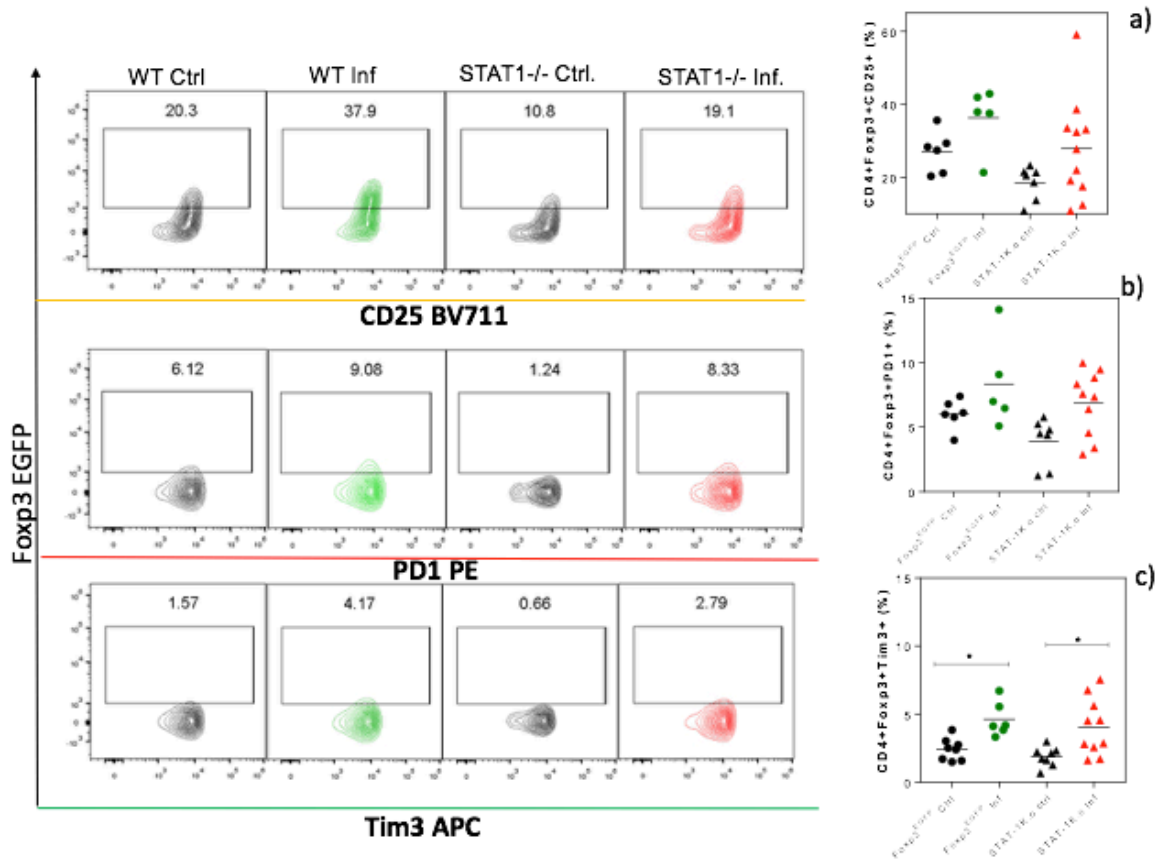


Figura 38. Marcadores de las células T reguladoras en bazo, fase aguda.

A) las células CD4+Foxp3+CD25+ no tienen diferencias significativa entre grupos. B) La población CD4+Foxp3+PD1+ no muestra diferencias significativas. C) Las células CD4+Foxp3+Tim3+ tienen un aumento en los ratones infectados WT y ausentes de STAT1.

En cuanto a la fase crónica, el porcentaje de células T reguladoras en bazo aumenta de manera significativa en los ratones ausentes de STAT1 y esto depende de la ausencia del factor de transcripción (Fig. 39).

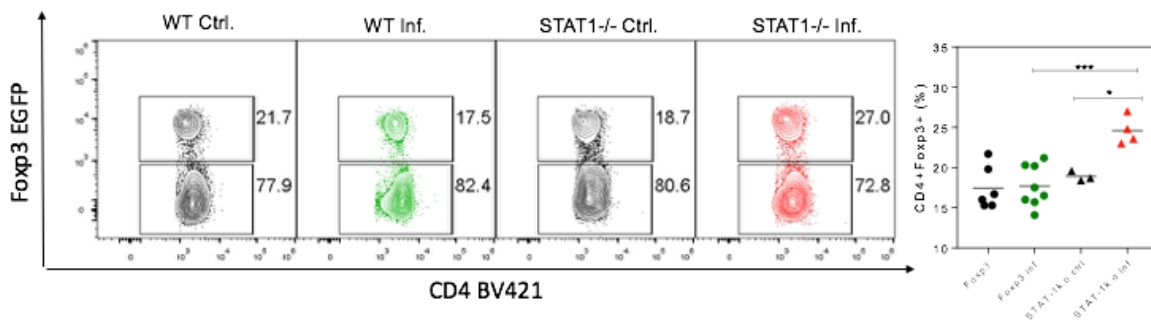


Figura 39. Porcentaje de linfocitos Treg (CD4+Foxp3+) en bazo durante la fase crónica de la infección.

En negro se reporta los grupos WT control y STAT1^{-/-} control, en verde WT infectado y en rojo STAT1^{-/-} infectado. Vemos que hay un aumento en los ratones ausentes de STAT1.

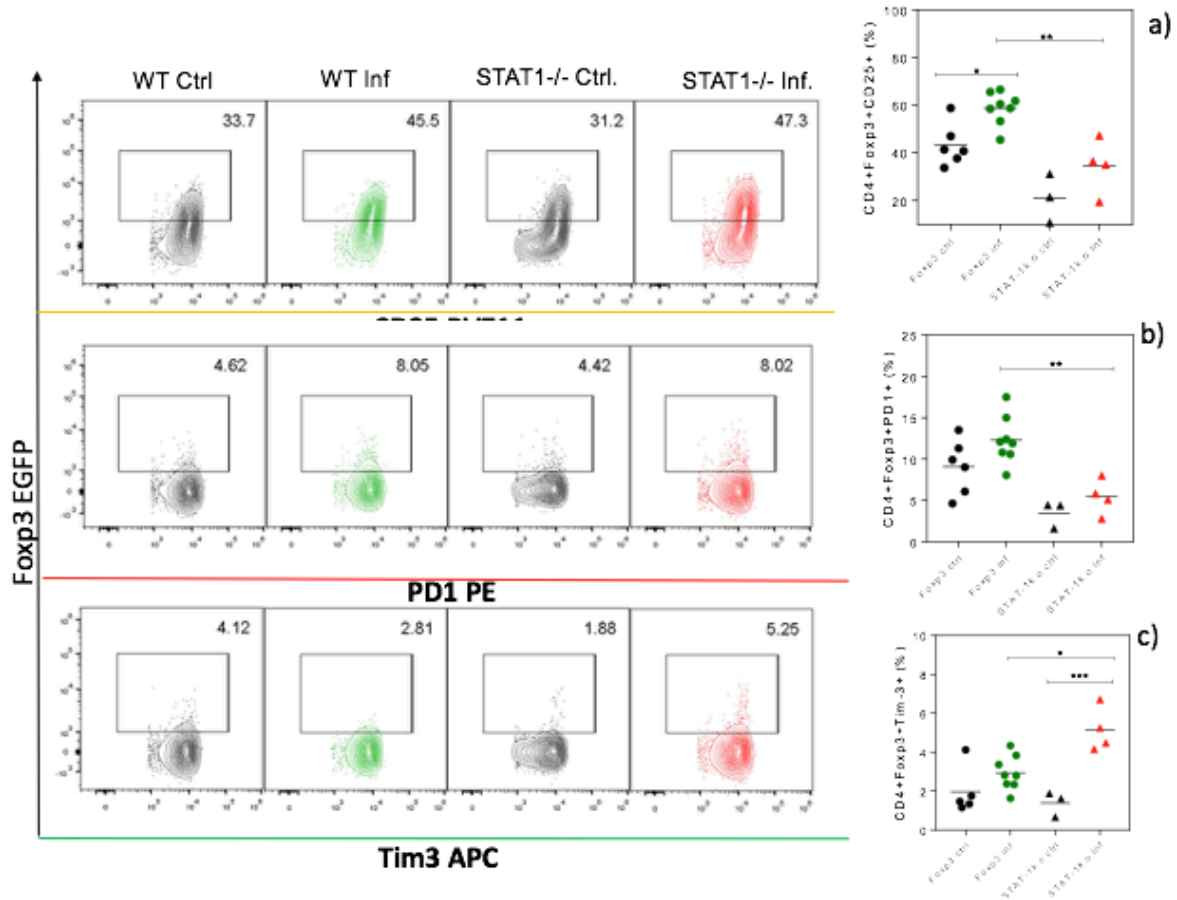


Figura 40. Marcadores de las células T reguladoras en bazo, fase crónica.

A) las células CD4+Foxp3+CD25+ tienen un aumento significativo en los ratones WT infectados. B) La población CD4+Foxp3+PD1+ muestra un aumento en los ratones WT infectados. C) Las células CD4+Foxp3+Tim3+ tienen un aumento en los ratones infectados ausentes de STAT1.

Haciendo referencia a los marcadores CD25, PD1 y Tim3, observamos que hay diferencias significativas entre los grupos experimentales en cuanto a CD25, hay un aumento significativo en los ratones infectados WT (Fig. 40A), además hay diferencias en cuanto a la expresión de PD1, ya que hay un aumento en los ratones WT infectados (Fig. 40B); sin embargo, en Tim3 solo hay un aumento en el grupo infectado y ausente de STAT1 infectado (Fig. 40C).

7. Discusión.

El estudio de la inmunomodulación causado por los helmintos ha sido de ayuda para entender los procesos infecciosos, inflamatorios, de supresión, de señalización en las diferentes poblaciones celulares, además las infecciones por helmintos hoy en día siguen siendo un problema de salud pública, reportando que el 25% de la población mundial actualmente están infectados con alguna clase de estos macroparásitos (Gentile *et al*, 2020).

Las infecciones inducidas por los parásitos helmintos promueven mecanismos que aseguran su establecimiento y sobrevivencia en el hospedero como el reclutamiento de células B reguladoras, células de la respuesta Th2, células T reguladoras y macrófagos alternativamente activados. (Terrazas, C *et al*. 2017).

Taenia crassiceps es un parásito helminto que genera una infección en donde se ha reportado ampliamente la capacidad de modular la respuesta Th1 del hospedero a Th2, en beneficio para su establecimiento. Los mecanismos que se llevaban a cabo en la polarización Th1-Th2 aún no son reportados por completo ya que depende directamente de la cepa, microambiente e incluso factores ambientales (Becerra-Díaz, 2015).

Modelos deficientes de STAT1 han sugerido que estos ratones son menos susceptibles hacia la infección por *T. crassiceps* mostrando una carga parasitaria menor que los ratones WT (Becerra-Díaz, 2021).

En esta investigación en cuanto a la resistencia y susceptibilidad a la infección en los ratones *STAT1*^{-/-} se abordó ambos conceptos en dos perspectivas diferentes: en primera instancia podemos referirnos a la resistencia desde el valor de la carga parasitaria, y tal como vemos en la figura número 3, en la fase aguda y en la fase crónica los ratones ausentes de STAT1 no parecen tener más parásitos que un ratón WT, por lo que concluimos que es una cepa resistente.

Por otro lado, como se observa en la figura 4 el ratón ausente de STAT1 al inicio de la infección aguda empieza a decaer su sobrevivencia, en otras palabras hay una alta tasa de mortalidad por lo que esta cepa muestra cierta susceptibilidad.

Por lo anterior, nos planteamos la idea de que debería de haber ciertas poblaciones celulares participando en la infección en el peritoneo en el proceso de resistencia se los ratones ausentes de STAT1.

Al analizar el panel de citometría de flujo correspondiente al linaje mieloide, encontramos que los macrófagos F480+CCR2+ tienen un leve aumento en los ratones deficientes de STAT1 infectados en la fase aguda (Fig. 6A) y una disminución significativa en la fase crónica (Fig. 23A) por lo que el reclutamiento mediado por CCR2 es parcialmente dependiente de STAT1. CCR2 es un receptor de quimiocinas de células monocíticas que media la migración celular de la médula ósea hacia el lugar de infección o hacia donde haya un microambiente inflamatorio (Kurihara *et al*, 1997). La importancia de la vía de señalización del interferón gama-STAT1 con respecto a este receptor ha sido reportada por Hu *et al*, 2005., en donde sus resultados sugieren que en cantidades pequeñas del IFN γ los monocitos aumentan la expresión de CCR2.

El resultado se sustenta en lo reportado en Becerra-Diaz *et al*, 2021., donde demuestran que STAT1 es necesario para la migración celular mediada por CCR2 en los monocitos Ly6C+ durante la infección por *T. crassiceps*, incluso relaciona esta vía de reclutamiento en esta población con la prevalencia del parásito en el hospedero.

Por otro lado, la expresión de PDL2+ en la fase aguda de la infección, no muestra diferencias significativas en los grupos experimentales (Fig. 7B); sin embargo, en la fase crónica hay un aumento de esta expresión en los ratones WT infectados y una disminución significativa en los ratones infectados deficientes de STAT1 (Fig. 24B). Los macrófagos alternativamente activados (AAM Φ S) son una población importante para la susceptibilidad a la infección por helmintos (Reyes L. *et al*, 2010)(Rodríguez-Sosa 2002). Como se mencionó *T. crassiceps* tiene el mecanismo de cambiar el perfil de su hospedero de Th1 a Th2 lo cual promueve la inducción fenotípica de los macrófagos hacia un perfil M2 o alternativa, dicha población es importante para el establecimiento del parásito (Reyes *et al*, 2010). Este resultado concuerda con Becerra-Diaz 2015., donde reporta una baja expresión de PDL2 mediante citometría de flujo en los ratones deficientes de STAT1, por lo que se puede hipotetizar que la

expresión de PDL2 es parcialmente dependiente de STAT1; en consecuencia los ratones *STAT1*^{-/-} no desarrollan macrófagos alternativamente activados, esto explicaría porque disminuye la carga parasitaria de los ratones deficientes de STAT1.

Posteriormente quisimos estudiar al linaje mieloide, por lo que se analizó un panel de citometría de flujo que diera un panorama general de las tres poblaciones linfoides: Células NK, Células B y Linfocitos T.

En primera instancia la población CD49b+CD94+ (*Natural killers*), muestra una disminución en los ratones deficientes de STAT1 infectados significativamente respecto a los demás grupos en la fase aguda y en la fase crónica (Fig. 10 y Fig. 25). Principalmente las células NK han sido reportadas en infecciones virales sin embargo, tal como reporta Gentile *et al*, en 2020, hay una estrecha participación de las células NK en infecciones por helmintos ya que ellos observaron un reclutamiento de células NK (CD49a-CD49b+) en el intestino durante la infección por *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (Hpb), además estas células producían Granzima B, por lo que concluyen que hay un efecto citotóxico en contra del parásito. La relación entre la señalización dependiente de STAT1 en NKs humanas fue estudiada en 2003 por Liang y colaboradores donde observaron que el interferón tipo I activaba de manera directa a STAT1 lo que aumentaba la citotoxicidad de las células además; de la activación de varios genes y moléculas citolíticas como Fas-L y perforinas.

Así mismo los resultados también muestran un aumento en la expresión de CD25, PD1 y Tim3 en las células NK, exclusivamente en los ratones *STAT1*^{-/-} infectados (Fig. 11 A,B y C)(Fig. 26 A,B y C).

Como se mencionó anteriormente, el agotamiento en células del sistema inmune es un fenómeno reportado en cáncer y en algunas infecciones crónicas y este es definido por un perfil molecular específico, modificaciones epigenéticas y alteraciones transcripcionales, como lo menciona Bi J y Tian Z (2017).

PD1 y Tim3 en células NK son puntos de inhibición importantes que inducen agotamiento celular, por ejemplo en la infección por VIH y hepatitis B crónica respectivamente (Jin HT *et al*,2010). Los ratones *STAT1*^{-/-} infectados tienen una

mayor expresión de estos receptores durante la infección por lo que argumento que la ausencia de STAT1, disminuye el porcentaje de células NK y éstas presentan un perfil de agotamiento.

En cuanto a la población de células CD19⁺CD3⁻ (células B), en la fase aguda hay una leve disminución en ambos grupos infectados (Fig. 12) mientras que en la fase crónica ya se observa una clara disminución en los grupos WT infectados y *STAT1*^{-/-} infectados (Fig. 27). El papel de las células B en las infecciones con helmintos ha sido clasificado como protector, ya que a través de la inmunidad humoral hay autores que reportan una mitigación de la infección, por ejemplo Prodjinotho UF *et al* (2020) demostró la participación de las células B en pacientes infectados con *Taenia solium*, a través de los niveles de anticuerpos IgG e IgE. Sin embargo, hay investigaciones con parásitos como *N. brasiliensis* y *H. polygyrus* en donde sugieren que la ausencia o presencia de las células B no interfiere con la respuesta Th2 y por ende a la prevalencia del parásito en el hospedero (Liu *et al*, 2010). Acorde a los resultados la disminución del porcentaje de células B en los grupos infectados es consecuencia de la infección y no de la ausencia de STAT1 además, se observa un aumento de los marcadores PD1 en ambos grupos infectados (Fig. 13B)(Fig. 28B) y Tim3 solo en el grupo *STAT1*^{-/-} Inf en ambas fases (Fig. 13C)(Fig. 28B). El resultado es parecido con el que reporta Zepeda *et al* (2010), donde a lo largo de la infección con *T. crassiceps*, notan una disminución del porcentaje de células CD4⁺, CD8⁺ y CD19⁺ en la cavidad peritoneal del ratón.

Los resultados de la población de linfocitos T CD3⁺ muestran que en la fase aguda y en la fase crónica no hay alguna diferencia en cuanto al porcentaje total de la población celular (Fig. 14 y Fig. 29A). Podemos ver un aumento en ambas fases de PD1 en ambos grupos infectados (Fig. 15B)(Fig. 29C) y un aumento de Tim3 solo en el grupo ausente de STAT1 infectado (Fig. 15C)(Fig. 29D). Con el resultado anterior se planteo que el efecto en los linfocitos puede ser en consecuencia de la infección y no de la ausencia de STAT1 por lo que decidí hacer un tercer panel en el cual se estudiará de manera específica las células T reguladoras, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺.

El análisis correspondiente a los linfocitos T parte en primera instancia con las células T reguladoras. Como vemos en la figura 17, durante 8 semanas el porcentaje de Treg en circulación de los grupos experimentales estuvo dentro del rango normal reportado como 5%-10% por Sakaguchi (1995) sin embargo, es interesante ver como en ambas fases de la infección el porcentaje de los ratones *STAT1*^{-/-} tanto WT e infectados tienen un porcentaje basal alto, hipotetizando que este porcentaje puede ser un mecanismo compensatorio en ausencia de STAT1.

En referencia a las citometrías de peritoneo, en cuanto a las células T reguladoras en la fase aguda y en la fase crónica no hay diferencias del porcentaje celular en los ratones *STAT1*^{-/-} mientras que en los ratones WT infectados hay una disminución significativa (Fig. 18 y Fig. 30).

Ruiz-Monroy *et al* (2013), describió en su modelo que las células T reguladoras en un ratón C57BL/ 6J infectado con *T. crassiceps* presentaban un aumento en los órganos inmunológicos (ganglios mesentéricos, placas de Peyer y el bazo) mientras que en el peritoneo no hubo aumento alguno. Los ratones WT (BALB/C) en la infección muestran una disminución significativa, este resultado es contrastante ya que en varias investigaciones como Sawant *et al* (2014) reportan que la presencia de las células T reguladoras favorece a la polarización de la respuesta Th1 en Th2 en la infección por *T. muris*.

Al analizar los marcadores de activación y supresión en esta población celular, vemos que hay un aumento de PD1 en ambos grupos infectados (Fig. 19B)(Fig. 31B) y de Tim3 solo en los ratones *STAT1*^{-/-} esto en fase aguda (Fig. 19C), en la fase crónica solo hay un aumento de Tim3 en los ratones infectados ausentes de STAT1 (Fig. 31C) lo que sugiere que independiente de la cepa, hay un perfil más supresor en estas células T reguladoras y esto es debido a la infección.

El estudio de las células CD4+Foxp3+PD1+ y CD4+Foxp3+Tim3+ en infecciones con helmintos es escasa; sin embargo, otras investigaciones sugieren que la expresión de la vía PDL1/PDL2 - PD1 en células T reguladoras refleja un perfil más supresor como lo reporta Francisco *et al* (2009) otro estudio de estos receptores fue el de Sakuishi *et al* (2013), donde analizó en tejido tumoral la presencia de las células CD4+Foxp3+Tim3+ en donde encontró una co-expresión con PD1 y

además, realizó un ensayo de supresión donde concluyó que esta población celular tiene una actividad más supresora y es mediada por la IL-10

En cuanto a los linfocitos T CD4+, vemos en la fase aguda un aumento del receptor PD1 en ambos grupos infectados (Fig. 20B) y de un aumento solo de Tim3 en los ratones *STAT1*^{-/-} (Fig. 20C). Por otro lado, en la fase crónica solo vemos un aumento significativo en Tim3 en los ratones carentes de STAT1 (Fig. 32C). En las últimas décadas PD1 y TIM3 han sido catalogadas como moléculas inmunoreguladoras y clasificadas dentro del grupo de los *inhibitor checkpoint*, los estudios han puesto a estas moléculas en controversia constante ya que depende completamente del modelo, tipo celular, patología y microambiente los efectos que puede llegar a tener su expresión, uno de estos estudios es el de Kaiser *et al* (2021) donde establece un perfil de agotamiento celular de acuerdo a la expresión de Tim3, PD1, LAG-3 y CTLA-4. Otro estudio es el de Esch *et al* (2013), donde reportan que en la infección en un modelo canino provocado por el parásito *Leishmania infantum* induce un estado de agotamiento celular en linfocitos CD4+ y CD8+ mediado por la sobre-expresión de PD1. Con lo anterior se puede inferir que la infección con *T. cracciceps* está induciendo un perfil de agotamiento o anergia a la población T CD4+.

Finalmente, los linfocitos CD8+ muestran una activación molecular muy interesante, como podemos ver en la Fig. 21, en la fase aguda vemos un aumento significativo de PD1 (B) y Tim3 (C) solo en ratones *STAT1*^{-/-} infectados, mientras que en la fase crónica podemos ver solo hay un aumento de Tim3 en el grupo ausente de STAT1 infectado (Fig. 33C). Con base en lo anterior, llegué a la conclusión que los linfocitos CD8+ están presentando un perfil de agotamiento celular dependiente de STAT1 durante la infección con *T. cracciceps*. Esta población ha sido estudiada y al igual que la población CD4+ ha generado controversia en torno a la activación de estos marcadores de inmunoregulación. Los linfocitos T CD8+ al igual que las células natural killers tienen un efecto citotóxico y han sido principalmente caracterizadas en infecciones virales. Jin *et al* (2010), demostró la cooperación entre el marcador Tim3 y PD1 induciendo un estado de agotamiento celular en los linfocitos T CD8+ durante la infección crónica por el virus de la coriomeningitis linfocítica. Aunque los

estudios de esta población con la expresión de estos marcadores son pocos Bhadra (2011) y colaboradores reportaron que el parásito *Toxoplasma gondii* provoca un estado de agotamiento celular mediado por la vía PD1-PDL1 desde estadios tempranos de la infección, además demostraron que la infección podría controlarse suministrando un anticuerpo anti-PDL1 logrando así baja la mortalidad de los ratones infectados. Otro estudio interesante es el de Singh *et al* (2019), donde reportan la participación de las células T CD8+ en la leishmaniasis visceral, causada por el parásito *Leishmania donovani*. Primeramente en los pacientes infectados en los estadios tempranos hay una regulación de genes los cuales agrupan como promotores de desarrollo, activación, diferenciación, regulación de los linfocitos, donde incluyeron a STAT1. Posteriormente estudiaron la expresión de LAG3 y Tim3 en los linfocitos CD8+ y observan que en los pacientes con la infección estos marcadores están significativamente altos.

Por lo anterior llegué a la conclusión de que la ausencia de STAT1 durante la infección con *Taenia crassiceps* genera un perfil de agotamiento en los linfocitos CD8+.

Para poder establecer de manera clara si los linfocitos T CD4+ y T CD8+ tenían un estado de anergia o un perfil supresor, se llevó a cabo un ensayo de proliferación. En primer lugar, como se observa en la figura 34, las células T CD4+ mantienen una proliferación en el grupo control, infección aguda e infección crónica, sin diferencias, esto en el grupo WT y ausente de STAT1, cabe mencionar que en este último hay un aumento considerable en la fase crónica.

En cuanto a los linfocitos T CD8+, en la figura 35 podemos ver que hay una proliferación similar entre los grupos de los ratones WT. En los ratones *STAT1*^{-/-} vemos que hay una leve disminución en la proliferación en fase aguda y un aumento considerable en la fase crónica.

Un estudio similar es el de Becerra-Diaz (2015) en donde establecen una relación entre las PECs peritoneales de ratones BALB/c y *STAT1*^{-/-} sobre la proliferación de linfocitos. La conclusión que llegaron fue que los linfocitos que entraron en contacto con las PECs WT infectados por 2 días, mostraron una inhibición importante. Las PECs de los ratones ausentes de STAT1 no inhibieron la

proliferación de linfocitos. Este argumento nos sugiere que en las células T CD4+ podemos ver que hay proliferación de esta población aunado a la activación de PD1 y Tim3, lo que genera un perfil supresor a beneficio del parásito, mientras que las células T CD8+ no inhiben su proliferación; sin embargo, de acuerdo a la bibliografía, presentan un perfil de agotamiento. Lo anterior sugiere que ambas poblaciones de linfocitos al estar fuera del microambiente generado por *Taenia crassiceps* y sus excretados-secretados, hayan recuperado su estado homeostático normal y proliferativo.

8. Conclusiones:

- La cepa *STAT1*^{-/-} es más resistente a la infección visto desde la perspectiva de carga parasitaria.
- La cepa *STAT1*^{-/-} es más susceptible desde la perspectiva de la mortalidad.
- STAT1 es importante en la vía de CCR2 para el reclutamiento de macrófagos F480+
- Los ratones ausentes de STAT1 no desarrollan macrófagos alternativamente activados.
- La ausencia de STAT1 altera el porcentaje de células NK durante la infección aguda y crónica.
- Las células NK presentan un perfil de agotamiento celular en ausencia de STAT1 durante la cisticercosis experimental.
- La infección en estado crónico por *T. crassiceps*, afecta el porcentaje de células B peritoneales.
- La infección por *T. crassiceps*, está induciendo un perfil de agotamiento en las células B.
- No hay un aumento de células T reguladoras periféricas, durante la cisticercosis experimental.
- En un microambiente sin STAT1, la infección *T. crassiceps* parece no afectar al porcentaje de células T reguladoras en peritoneo.
- Los linfocitos T CD4+ muestran un perfil supresor dependiente de la infección y no de la ausencia de STAT1.
- Los linfocitos T CD8+ muestran un perfil anérgico en ausencia de STAT1, en la infección por *T. crassiceps*.

9. Anexo

Soluciones:

- **Solución hemolizante/ Solución de lisis.**

39 mM de NH₄CL, 2.5 mM de KHCO₃ y 0.02 mM de EDTA.2Na

- **EDTA**

Para 1L se uso 186. 12 gr de Na₂EDTA 0.5 M en 800 ml de agua destilada y una vez disuelto se aforo a 1L.

- **Buffer de lisis para Proteinasa K**

100 mM de NaCl, 25 mM de EDTA y 0.5% SDS

- **Solución TBE 1X**

Para preparar 1L se utilizo 10.8 gr de TRIZMA base, 5.5 gr de acido bórico y 4ml de EDTA 0.5M

- **Medio RPMI**

Para preparar 50 ml se necesita 500 µl de aminoácidos No esenciales, 500 µl de Piruvato, 45 µl de β-Mercaptoetanol, 500 µl de antibiótico (penicilina), 5ml de suero fetal bovino al 10% y al final se afora a 50 ml con medio para RPMI.

10. Bibliografía.

Lescano A., Zunt J. 2013. Other cestodes: sparganosis, coenurosis and *Taenia crassiceps* cysticercosis En: H.H. Garcia, H.B. Tanowitz, and O.H. Del Brutto (Edit). Handbook of Clinical Neurology (Vol. 114, Serie 3°).

Willms K., Zurabian R. 2009. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*. Vol.135. pp. 334-346.

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

Dorais F.J., Esch G.W. 1969. Growth Rate of Two *Taenia crassiceps* Strains. *Experimental parasitology*. Vol 25. pp. 395-398.

Ruiz-Monroy M.N., López-Roblero A., Nájera-Ocampo M., Camacho-Vázquez C., Arce-Sillas A., Casanova-Hernández D., Palafox-Fonseca H., Melo-Salas M., Fragoso G., Sciutto-Conde E., Adalid-Peralta L. 2013. Participación de las células T reguladoras en la cisticercosis experimental murina por *taenia crassiceps*. *Arch Neurocién (Mex)*. Vol. 18. pp. 33-37.

Peón A.N., Espinoza-Jiménez A., Terrazas L.I. 2012. Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *BioMed research International*. Vol. 2013. pp. 1-13.

Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C., 1998. Shift from an early protective th1-type immune response to a late permissive th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* Vol. 84, 74–81.

Chávez-Sánchez F.R., Rojas-lemus. M., fortoul van der goes T.I., Tenorio Z.E. 2017. Células t reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad. *rev. fac. med. (mex.)* vol.60, n.5 pp.36-44.

Parias J.L., Giraldo V.E., Velásquez-Lopera M.M. 2010. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*. Vol. 29. pp.74-84.

Castañeda Torrico, M.G. 2016. Identificación de los productos de excreción y secreción del cisticercos de *Taenia crassiceps* que inducen células T reguladoras. Tesis de licenciatura. Escuela profesional de biología, Perú.

Gimeno R., Barquinero J. 2011. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Another player in the orchestra. *Inmunología*. Vol.30. pp. 45-53.

Hayle L.A., Greten T.F., Korangy F. 2012. Immune Suppression: The Hallmark of

Myeloid Derived Suppressor Cells. *Immunological Investigations*. Vol. 41. pp. 581-594.

Noël W., Raes G., Gholamreza H.G., De Baetselier P., Beschin A. 2004. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *TRENDS in Parasitology*. Vol. 20. pp. 126-133.

Becerra-Díaz M., Valderrama-Carvajal H., Terrazas L.I., 2011. Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Family Members in Helminth Infections. *International Journal of Biological Sciences*. Vol. 7. pp. 1371-1381.

Becerra-Díaz M. 2015. Papel de la molécula STAT-1 en la respuesta inmune y resistencia a la infección con *Taenia crassiceps*. Tesis de doctorado. UNAM. México.

Saevey M.M., Dobrzanski P. 2012. The many faces of Janus kinase. *Biochemical Pharmacology* Vol. 83. p.p1136–1145

Mogensen T.H. 2019. IRF and STAT Transcription Factors - From Basic Biology to Roles in Infection, Protective Immunity, and Primary Immunodeficiencies. *Frontiers in Immunology*. Vol. 9. No. 3047.

Au-Yeung N., Mandhana R., Horvath C.M. 2013. Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. *Journal information*. Vol. 2.

Ramana C.V., Gil M.P., Schreiber R.D., Stark G.R. 2002. Stat1 dependent and independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *TRENDS in Immunology*. Vol. 23. pp. 96-101.

Becerra-Díaz M., Terrazas L.I. 2014. *Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ . *International Journal for Parasitology*. Vol.44. pp. 613- 623.

Splitt S.D., Souza S.P., Valentine K.M., Castellanos B.E., Curd A.B., Hoyer K.K., Jensen K.D.C. 2018. PD-L1, TIM-3, and CTLA-4 blockade fails to promote resistance to secondary infection with virulent strains of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*. Vol. 86.

Sharpe A.H., Pauken K.E. 2018. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature reviews | immunology*. Vol. 18. 153-167.

Han Y., Liu D., Li L. 2020. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cáncer. *Am J Cancer Res*. Vol. 10. pp. 727- 742.

M-Zak K., Grudnik P., Magiera K., Dömling A., Dubin G., Holak T.D. 2017. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure Review*. Vol. 25. pp. 1163- 1174.

Vargas-rojas M.I., Jiménez-álvarez L., Ramírez G., Torres-garcía D., Barquera R., Gastelum-martínez A.A, Zuñiga J. 2008. PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune. *Revista del instituto nacional de enfermedades respiratorias*. Vol. 21. 272- 279.

Patsoukis N., Wang Q., Strauss L., Boussiotis V.A. 2020. Revisiting the PD-1 pathway. *Science advances | review*. Vol. 6. pp. 2-13.

Joller N., Kuchroo V.K. 2017. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol. 82.

Banerjee H., Kane L.P. Immune regulation by Tim-3. *F1000Research*. Vol. 7. No. 316.

Zhang Y, Jiang N, Zhang T, Wang D, Feng Y, Sang X, Yang N and Chen Q. 2018. Toxoplasma gondii Genotype Determines Tim-3 Expression Levels in Splenic and Circulatory T Cells in Mice. *Front. Microbiol*. Vol 9. Artículo No. 2967.

Sabatos C.A., Chakravarti S., Cha E., Schubart A., Sánchez-Fueyo A., Zheng X.X., Coyle A.J., Strom B.T., Freeman G.J., Kuchroo V.K. 2003. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nature immunology*. Vol. 4. pp. 1102- 1110.

Dario A.A., Vignali L., Collison W., Creg W. 2008. How regulatory T cells work. *Nature reviews: immunology*. Vol. 8. pp. 523- 532.

Guzmán-Flores J.M., Portales- Pérez D.P. 2013. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). *Gaceta Médica de México*. 2013;149:630-8

Dalid-Peralta L, Lopez-Roblero A, Camacho-Vazquez C, Najera-Ocampo M, Guevara-Salinas A, Ruiz-Monroy N, Melo-Salas M, Morales-Ruiz V, Lopez-Recinos D, Ortiz-Hernandez E, Demengeot J, Vazquez-Perez JA, Arce-Sillas A, Gomez-Fuentes S, Parkhouse RME, Fragoso G. 2021. Regulatory T Cells as an Escape Mechanism to the Immune Response in Taenia crassiceps Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 11. 2021.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. Feb 14;299(5609):1057-61.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.

Olguín, J. E. , & Terrazas, L. I. 2021. Regulation of the Immune Response in Cysticercosis: Lessons from an Old Acquainted Infection. In J. Morales-Montor, A. Landa, & L. I. Terrazas (Eds.), *Current State of the Art in Cysticercosis and Neurocysticercosis*.

C. Ángel Sánchez-Barrera, J. Efraín Olguín and Luis I. Terrazas. 2022. A Dual Role for Neutrophils and Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Development of Colorectal Cancer. En: Morales-Montor (Ed), *The Innate Immune System in Health and Disease: From the Lab Bench Work to Its Clinical Implications*. Volume 1. NOVA.

Becerra-Díaz, M.; Ledesma-Soto, Y.; Olguín, J.E.; Sánchez-Barrera, A.; Mendoza-Rodríguez, M.G.; Reyes, S.; Satoskar, A.R.; Terrazas, L.I. 2021. STAT1-Dependent Recruitment of Ly6C^{hi}CCR2⁺ Inflammatory Monocytes and M2 Macrophages in a Helminth Infection. *Pathogens* 2021, 10, 1287.

Maria E. Gentile, Yue Li, Amicha Robertson, Kathleen Shah, Ghislaine Fontest, Eva Kaufmann, Barbara Polese, Nargis Khan, Marc Parisien, Hans M. Munter, Judith N. Mandl, Luda Diatchenko, Maziar Divangahi, Irah L. King. 2020. NK cell recruitment limits tissue damage during an enteric helminth infection. *Mucosal Immunology* (2020)13:357–370.

José L. Reyes, César A. Terrazas, Javier Alonso-Trujillo, Nico van Rooijen, Abhay R. Satoskar, Luis I. Terrazas. 2010. *Early removal of alternatively activated macrophages leads to Taenia crassiceps cysticercosis clearance in vivo*. *International Journal for Parasitology* 40 (2010) 731–742.

Rodriguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderon R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R. 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun*. 2002;70(7):3656–64.

Liang S., Haiming Wei, Rui Sun, Zhigang Tian. 2003. IFN α regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway. *Cytokine* 23 (2003) pp 190–199.

Bi J, Tian Z. 2017. NK Cell Exhaustion. *Frontear Immunoly*. Vol 8: A: 760.

Prodjinotho UF., Lema J, Lacorcía M, Schmidt V, Vejzagic N, Sikasunge C. 2020. Host immune responses during *Taenia solium* Neurocysticercosis infection and treatment. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14: 4.

Sakuishi K, Ngiow SF, Sullivan JM, Teng MW, Kuchroo VK, Smyth MJ, Anderson AC. 2013. Tim3-⁺FOXP3⁺ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Apr 1;2(4).

Mosayebian A, Koohini Z, Hossein-Nataj H, Abediankenari S, Abedi S, Asgarian-Omran H. Elevated Expression of Tim-3 and PD-1 Immune Checkpoint Receptors on T-CD4⁺ Lymphocytes of Patients with Asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunology*. 2018;17(6). pp. 517-525.

Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol*. 2013 Dec 1;191(11). pp: 5542-50.

Jin HT, Anderson AC, Tan WG, West EE, Ha SJ, Araki K, Freeman GJ, Kuchroo VK, Ahmed R. 2010. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14733-8.

Bhadra R, Gigley JP, Weiss LM, Khan IA. 2011. Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8⁺ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 31;108(22):9196-201.

Singh, B, Bhushan Chauhan, S, Kumar, R. 2019. A molecular signature for CD8⁺ T cells from visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunol*. 2019; 41. (11).

Hu, X.; Park-Min, K.H.; Ho, H.H.; Ivashkiv, L.B. IFN-gamma-primed macrophages exhibit increased CCR2-dependent migration and altered IFN-gamma responses mediated by Stat1. *J. Immunol*. 2005, 175, 3637–3647.

Kurihara, T.; Warr, G.; Loy, J.; Bravo, R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med*. 1997, 186, 1757–1762

Kaiser M, Semeraro MD, Herrmann M, Absenger G, Gerger A, Renner W. 2021. Immune Aging and Immunotherapy in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(13):7016.

Liu, Q., Kreider, T., Bowdridge, S., Liu, Z., Song, Y., Gaydo, A. G., Urban, J. F. Jr., and Gause, W. C. 2010. B cells have distinct roles in host protection against different nematode parasites. *J. Immunol*. 184, 5213–5223.

Sawant, Deepalit., David M. Gravano, Peter Vogel, Paul Giacomini, David Artis, Dario A. A. Vignali. 2014. *The Journal of Immunology* March 15, 2014, 192 (6) 2904-2912.

Zepeda, N., Solano, S., Copitin. 2012. Decrease of peritoneal inflammatory CD4+, CD8+, CD19+ lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. *Parasitol Res* 107, 1129–1135.