



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**El receptor NLRP3 promueve el
crecimiento del cestodo *Taenia crassiceps***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

IRÁN MARCELA FLORES SOTELO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ LUIS REYES HERNÁNDEZ



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2023



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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica DGAPA-UNAM PAPIIT Proyecto IN215323 y Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera (PAPCA) FESI-PAPCA 2021-2022-18.

Agradecemos a la MVZ Maria Leticia Flores y Biol. Tomas Ernesto Villamar por el apoyo en el mantenimiento de las colonias de los animales de experimentación para la realización de este proyecto.

Agradecemos a la Biol. Marisol Ibet González González Técnico Académico del Laboratorio 18 de UBIMED por la asesoría brindada durante la realización de este proyecto. Al Dr. José Luis Reyes Hernández por aceptarme en su equipo de trabajo.

La utilización de los animales de experimentación se realizó siguiendo los lineamientos de la NOM-062-Z-1999 y fue aprobada por el comité de Bioética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (CE/FESI/042022/1513).

DEDICATORIA.

Estoy completamente segura que esta será parte de las dedicatorias *más larga presentada en una tesis* pues, si tuviera que nombrar a todas las personas a las que dedico este trabajo, probablemente no acabaría. Creo que demasiadas cabezas han aportado un sinfín de cosas para formar a la persona que soy hoy en día.

Eso sí, la persona a la que principalmente dedico este pequeño logro es a mi mamá. No sólo por ser la mujer más fuerte que conozco; ni por ser la más valiente o por ser la más espontánea, si no, por el constante trabajo de sostener mi mano en este camino llamado “vida”. Gracias por siempre saber calmar el dolor en mi pecho y por seguir adelante sin flanquear un poco. Esto es sólo una pequeña parte de todo lo que mereces, porque tú te mereces el universo entero.

Este pequeño gran paso también va para mí papá: el hombre de los ojos cansados y el que tiene unas ocurrencias que a todos nos hacen reír. Esto se lo dedico al hombre que tantas veces se sentó a mí lado a platicar de la vida, que me proporcionó los mejores consejos y el que siempre confió en mis decisiones. Esto va para ti, papá, que con un nudo en el corazón siempre encontraste las respuestas para seguir ante las adversidades. Y cómo dato no curioso... tú me dedicaste tu tesis años atrás y mira, ahora va la mía.

A mi hermano Marco, mi gordito. Por los buenos y malos ratos; pero, sobre todo, por tus lapsos de sabiduría en mis momentos de debilidad. Gracias por darle alegría a mi ser. No sabes lo mucho que te adoro y lo suertuda que soy de tenerte como mi hermano.

A Cody, ¿cómo no? la bolita de pelos que durante muchos años y mientras escribía esta tesis me ha hecho compañía acostándose por un lado de mí. Él jamás podrá entender esto, pero espero que sepa lo eternamente agradecida que le estoy por calmar la ansiedad de mi alma con un abrazo lleno de pelos y con el sonido de sus patitas escabulléndose a mi cuarto.

A mi abuela Estela y mi abuelo Nacho. Por cuidarme, por no dejar de tener fe en mí; por su inalcanzable espíritu rebelde. Son todo un ejemplo para mí.

A mí querido Tlacoyito (Kuahuyolotzin), quién andará riendo por ahí porque su alma siempre ha sido salvajemente libre. Me hubiera encantado que leyeras la dedicatoria original que tenía para ti y que me abrazaras después de eso, sin embargo, ahora te escribo con la esperanza de que el mensaje llegue hasta donde estés: te amo con todo mi corazón y estaré eternamente agradecida con el universo por permitirme coincidir contigo. En mi memoria perdurarán todos los momentos que la vida nos permitió vivir, así que yo te recordaré con mucho cariño hasta el día de nuestro reencuentro. Una *Ohana señal* en donde quiera que estés.

A Palillo (Jorge), por el largo camino, por salvarme de mí misma, por las frustraciones y las carcajadas compartidas; por las charlas motivacionales y por ser felices a nuestro modo. *Lo sabía, hice una buena elección...*

A mis amigos Alexito (Alejandro, un cachito de galaxia), Javier, Thalia, Sebitas (Sebastián), por los buenos y malos momentos, por todos los días llenos de felicidad y por todas aquellas risas que nos hacían sentir que éramos infinitos; gracias por todas esas tardes llenas de chistes malos, historias que no podré decir en voz alta y todo eso que sólo nosotros sabremos. Ustedes son lo mejor que me pudo dejar la universidad.

A Daniel, por la bonita casualidad de coincidir contigo.

Al Dr. José Luis y a la Biol. Marisol, por siempre hacerme sentir parte del laboratorio 18, por las risas, los festejos, también por los enojos al no obtener los resultados esperados, por las tardes de “seminario” y por confiar en mí. Mi total respeto y admiración a ustedes.

A mis amigos del laboratorio 18; por las desmañanadas de sacrificio y las tardes de básquet. Por todas las historias que se juntaron en este tiempo de convivencia.

Finalmente, a todas aquellas personas que han estado en el momento y lugar correcto para hacer más memorable mi existencia. Nada en esta vida es una coincidencia :)

Gracias.

“Los hechos son el aire de los científicos. Sin él, nunca podrían volar”

Linus Pauling

“Everything you lose is a step you take”

Taylor Swift

ÍNDICE

1. RESUMEN	8
1.1 ABSTRACT	9
2. INTRODUCCIÓN	10
3. ANTECEDENTES	11
3.1 CISTICERCOSIS	11
3.2 CICLO BIOLÓGICO DE <i>Taenia crassiceps</i>	11
3.3 RESPUESTA INMUNE ANTE INFECCIÓN POR <i>Taenia crassiceps</i>	13
3.4 MECANISMO DE EVASIÓN INMUNOLÓGICA	14
3.5 MACRÓFAGOS ALTERNATIVAMENTE ACTIVADOS EN INFECCIONES CAUSADAS POR HELMINTOS PARÁSITOS	15
3.6 CÉLULAS T REGULADORAS (TREG) EN INFECCIONES CAUSADAS POR HELMINTOS PARÁSITOS	16
3.7 CÉLULAS B REGULADORAS EN INFECCIONES POR HELMINTOS PARÁSITOS	17
3.8 INFLAMACIÓN E INFLAMASOMAS	18
3.8.1 COMPONENTES Y ACTIVACIÓN INFLAMASOMA NLRP3	20
3.8.3 MECANISMO DE REGULACIÓN DEL INFLAMOSOMA NLRP3	24
3.9 EVIDENCIA DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS INFLAMASOMAS EN LA INMUNOREGULACIÓN O INMUNOSUPRESIÓN	26
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVO	30
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	30
6. JUSTIFICACIÓN	30
7. MATERIALES Y MÉTODOS	31
7.1. ANIMALES EXPERIMENTALES	31
7.2. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS ANIMALES EXPERIMENTALES POR MEDIO DE PCR	31
7.2.1 EXTRACCIÓN DEL DNA	31
7.2.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN	32
7.2.3. ELECTROFORÉISIS	33
7.3 INFECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA PARASITEMIA EN LOS ANIMALES EXPERIMENTALES	33
7.4 OBTENCIÓN DE SUERO SANGUÍNEO	33

7.5. DETERMINACIÓN DE CARGA PARASITARIA.....	34
7.6. CULTIVO DE CÉLULAS DE BAZO.....	34
7.7 CULTIVO DE CÉLULAS DE GANGLIO.....	35
7.8 CULTIVO DE MACRÓFAGOS EN MÉDULA OSEA.....	35
7.8.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....	37
7.8.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA PARA DNA COMPLEMENTARIO (cDNA).....	37
7.8.3. AMPLIFICACIÓN DE cDNA.....	38
7.8.4. ELECTROFORESIS.....	38
7.9 INYECCIÓN DE RATONES CON TcES e IL-4.....	39
7.10 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS EN SUERO POR ELISA.....	39
7.10.1. SENSIBILIZACIÓN DE LA PLACA.....	39
7.10.2. MUESTRAS Y CURVAS.....	39
7.10.3 REVELADO DE LA ELISA.....	40
7.11. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	40
7.12. ANÁLISIS DE DATOS.....	42
8. RESULTADOS.....	43
9. DISCUSIÓN.....	60
10. CONCLUSIONES.....	64
11. REFERENCIAS.....	65

1. RESUMEN

El receptor NLRP3 es capaz de ensamblar la plataforma conocida como inflamasoma para iniciar una respuesta inflamatoria, sin embargo, evidencias recientes sugieren que también puede desempeñar funciones antiinflamatorias. Aquí, abordamos el papel de NLRP3 en la infección inducida experimentalmente por el cestodo *Taenia crassiceps*, cuyas características incluyen la polarización inmune en un perfil de citocinas Th2 y una alta dependencia del reclutamiento de macrófagos supresores en la cavidad peritoneal. Cuando se realizó la infección in vivo, la deficiencia de NLRP3 (NLRP3^{-/-}) dio como resultado un fenotipo altamente resistente en relación con ratones silvestres (WT) infectados de manera similar. Paralelamente, se encontró una respuesta Th-2 disminuida (IL-4) y altos niveles de IL-15, un factor de crecimiento para linfocitos tanto innatos como adaptativos. Se observó una disminución drástica de los macrófagos supresores que infiltran el peritoneo en ratones NLRP3^{-/-} durante 8 semanas de seguimiento en esta infección por helmintos. Esto nos llevó a probar la hipótesis de un supuesto defecto en los macrófagos NLRP3^{-/-}. Llevamos a cabo un análisis transcripcional en macrófagos derivados de médula ósea expuestos a antígenos secretados por *Taenia* e IL-4, donde los macrófagos NLRP3^{-/-} presentaron una expresión significativamente reducida de Relm- α y los ligandos del receptor PD-1 (PDL1 y PDL2), marcadores de activación alternativa y capacidad supresora, respectivamente. Finalmente, probamos si la resistencia exhibida por los ratones NLRP3^{-/-} puede transferirse a través del intercambio de microbiota intestinal. Los ratones WT mantenidos durante 4 semanas con ratones NLRP3^{-/-} fueron significativamente más resistentes que los individuos WT con su microbiota nativa. Es de destacar que también se observó un aumento de IL-15 en animales WT co-alojados con ratones NLRP3^{-/-}. En conjunto, estos datos demostraron que NLRP3 es un componente de la inmunidad innata necesaria para que *Taenia crassiceps* se establezca, probablemente contribuyendo a la polarización de los macrófagos y al control de citocinas como IL-15.

1.1 ABSTRACT

The NLRP3 receptor is able to assemble inflammasome platforms to trigger inflammatory responses, however, accumulating evidence suggests that it can also display anti-inflammatory roles. Here, we addressed the role of NLRP3 on experimentally-induced infection by the cestode *Taenia crassiceps* whose features include immune polarization into a Th2 cytokine profile and high dependence on recruiting suppressive macrophages into peritoneal cavity. When *in vivo* infection was conducted, NLRP3 deficiency (NLRP3^{-/-}), resulted in a highly resistant phenotype as relative to similarly infected wild-type (WT) mice. In parallel, a diminished Th-2 response (IL-4) and high levels of IL-15, a growth factor for both innate and adaptive lymphocytes was found. A dramatic decrease in peritoneum-infiltrating suppressive macrophages in NLRP3^{-/-} mice was observed during 8 weeks of follow-up in this helminthic infection. This led us to test the hypothesis of a putative defect on NLRP3^{-/-} macrophages. We carried out a transcriptional analysis on bone marrow-derived macrophages *in vitro* exposed to *Taenia*-secreted antigens and IL-4, where NLRP3^{-/-} macrophages presented significantly reduced expression of Relm- α and PD-1 ligands (PDL1 and PDL2), markers of alternative activation and suppressive ability, respectively. Finally, we tested if the resistance exhibited by NLRP3^{-/-} mice may be transferred through intestinal microbiota exchange. WT mice co-housed for 4 weeks with NLRP3^{-/-} mice were significantly more resistant than WT individuals with their native microbiota. Of note, increased IL-15 was also observed in co-housed animals. Altogether, these data demonstrated that NLRP3 is a component of innate immunity required in order to *Taenia crassiceps* establish, most likely contributing in macrophage polarization and controlling cytokines such as IL-15.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades provocadas por parásitos siguen siendo frecuentes en la humanidad, sin embargo, se ha visto que hay zonas más susceptibles que otras. Las helmintiasis, por ejemplo, afectan principalmente a países en vía de desarrollo, pues son socioeconómicamente vulnerables, provocando un saneamiento ambiental deficiente, que da lugar a un manejo no adecuado de las heces y la crianza de los animales; favoreciendo así, enfermedades como la cisticercosis humana provocada por el helmineto *Taenia solium*. Cuando hablamos de cisticercosis, hacemos referencia a la existencia y establecimiento de un cestodo, como *Taenia Solium* o *Taenia Saginata* en el cuerpo, ya sea en el músculo esquelético o cardíaco. Y en los últimos años, se ha podido entender en qué consiste una cisticercosis con los múltiples aportes brindados por el área experimental de la biomedicina.

Algunos helmintos han coexistido con los mamíferos en una relación de parasitismo por millones de años, por lo que existen diferencias en la forma de reconocimiento del sistema inmune con el resto de patógenos. Es por esto que, en los hospederos se ha conservado, durante su evolución mecanismos de tolerancia a la infección, así como mecanismos de evasión inmune, disminuyendo la destrucción del parásito y a su vez reduciendo el daño tisular secundario a la inflamación, promoviendo una regulación del sistema inmunológico y que a su vez se relacione con el aumento en la prevalencia de varias enfermedades inflamatorias crónicas (Zakzuk, 2015).

3. ANTECEDENTES

3.1 CISTICERCOSIS

Las enfermedades parasitarias constituyen un importante problema de salud mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo, por lo que las parasitosis intestinales son una enfermedad frecuente con importante morbimortalidad. Se estima que las infecciones intestinales parasitarias afectan a más de un tercio de la población mundial (Cardozo, et. al., 2017).

En humanos, cuando hablamos de cisticercosis hacemos referencia al establecimiento del metacestodo *Taenia solium*, ya sea en el tejido subcutáneo o en el cerebro, dando lugar a una neurocisticercosis. Esto puede llegar a causar serios problemas en el sistema nervioso central, déficits focales, cefalea y/o crisis convulsivas que podrían derivar a epilepsia crónica (Fernández, et. al., 2016).

Por otro lado, para estudiar la cisticercosis humana, así como para identificar antígenos que se puedan utilizar en el diagnóstico de dicha enfermedad se han desarrollado diferentes modelos de infección experimental en una variedad de roedores como hamsters y ratones. En la cisticercosis murina, es posible realizar una infección experimental a través de la inoculación de los metacestodos (cisticercos) en la cavidad peritoneal, ya que sabemos que este cestodo se encuentra naturalmente en roedores. La infección experimental de *Taenia crassiceps* ha permitido conocer la relación hospedero-parásito gracias a la alta homología en su composición antigénica, anatómica y morfológica, su ciclo de vida y respuesta inmune con los cisticercos de *Taenia solium* (Castañeda, 2016).

3.2 CICLO BIOLÓGICO DE *Taenia crassiceps*

Taenia es el género de los cestodos con mayor prevalencia en áreas urbanas, incluye gusanos planos de la familia Teeniidae con subclase Cestoda. *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) tiene un ciclo de vida indirecto que incluye un hospedero definitivo y un intermediario, obligándolo al cestodo a pasar por cambios de pH, temperatura, cantidad de nutrientes, presión de oxígeno, etc. (Castañeda, 2016). Su principal hospedero

definitivo son los zorros, sin embargo, se ha registrado infección en perros y otros cánidos salvajes como los lobos y coyotes. Los hospederos intermediarios, en general, son los roedores silvestres (Veloz, 2020).

El ciclo de vida inicia con el hospedero definitivo expulsando los proglótidos grávidos en las heces del hospedero; estos serán ingeridos por el roedor. Después, los proglótidos perderán su cubierta liberando las oncósferas, las cuales atravesarán las paredes intestinales y entrarán al flujo sanguíneo, alcanzando así los músculos, el tejido subcutáneo y la cavidad peritoneal. Justo en esta última zona es donde se diferenciará el huevo en estadio larval para reproducirse por gemación asexual (Ostoa, et. al., 2010). Su fase larvaria cisticerco o metacéstodo también es llamada *Cysticercus longicollis* (Rudolphi, 1819) y se caracteriza por ser de forma oval y translucido, con longitud de 4-5mm (Maillard, et. al., 1998).

El ciclo termina cuando los cánidos se alimentan de los roedores infectados, dando lugar al desarrollo del parásito adulto, comenzando nuevamente todo el ciclo de vida.

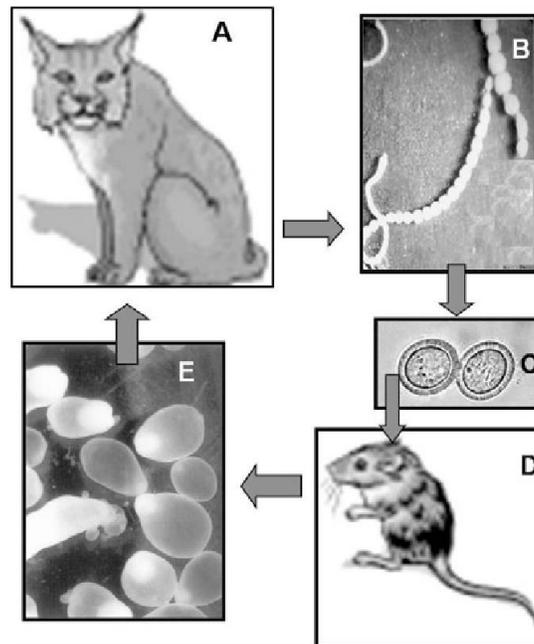


IMAGEN 1. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. **A)** Hospedero definitivo. **B)** Fase adulta que permanece dentro de los cánidos. **C)** Proglótidos que liberará las oncósferas dentro de **D)** Hospedero intermedio. **E)** Larva cisticerco o metacéstodo. (Imagen tomada de: Willms, & Zurabian, 2009)

3.3 RESPUESTA INMUNE ANTE INFECCIÓN POR *Taenia crassiceps*.

La principal función del sistema inmune es proteger al cuerpo de organismos potencialmente patógenos. Los helmintos presentan características que dificulta al hospedero controlarlos inmunológicamente, pues existe una persistencia a largo plazo para continuar su ciclo dentro del hospedero, tienen la capacidad de generar mecanismos de evasión inmune (Dzik, 2006).

Se ha reportado que los helmintos parásitos inducen respuestas inmunes de tipo Th2 (Reyes, 2011). Esta respuesta está caracterizada por la secreción de interleucina IL-4, IL-5 e IL-13 y anticuerpos del subtipo IgE, IgG2b e IgG1 (Castañeda, 2016);. Sin embargo, se ha registrado que las infecciones por nematodos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y algunos ancioltomídeos, suelen estar asociados a segregaciones de citocinas de tipo regulador como IL-10 y TGF- β (García, 2009).

Adicional a esto, se ha observado el incremento de eosinófilos, basófilos, mastocitos y células dendríticas inmaduras en la sangre y el sitio de infección. Así como células tanto innatas como adaptativas que despliegan funciones reguladoras como macrófagos alternativamente activados, células supresoras de origen mieloide y las células T reguladoras (Peón, et. al., 2013; Erb, et. al., 2007 y Adalid, et. al., 2013).

Por último, un mecanismo de los metacéstodos del género *Taenia* que igualmente les ayuda a sobrevivir largos periodos en su hospedero es que controlan la intensidad de la reacción inflamatoria que se inicia tras la detección de los parásitos. Se ha sugerido que es causada por la desregulación inmune (Garg, 2014). En la infección por el nematodo *Trichuris sp* se reportó una mayor secreción de IL-18 dependiente de NLRP3, mientras que los ratones deficientes del inflammasoma NLRP3 mostraron respuestas reducidas de citoquinas proinflamatorias tipo 1 y una inmunidad protectora aumentada tipo 2 (Alhallaf, et. al., 2018).

3.4 MECANISMO DE EVASIÓN INMUNOLÓGICA.

Anteriormente se mencionó que los parásitos buscan formas de regular el sistema inmune para poder sobrevivir por largos periodos dentro del hospedero. Para que el helminto pueda lograrlo, tiene que utilizar mecanismos de evasión inmunológica de manera eficaz. Hasta ahora, se han descrito 5:

1. Recambio de los componentes de la superficie de la cutícula: El estudio de antígenos de la superficie de nematodos, ha demostrado que la cutícula no es completamente inerte, pues son sustituidos frecuentemente y constituyen dianas para anticuerpos específicos, dejando lugar a que mecanismo celular citotóxicos pueden rodear y destruir al parásito. Si este mecanismo fuese afectado, los parásitos podrían ser susceptibles a los efectores del huésped.
2. Enzimas antioxidantes: Los radicales de oxígeno se producen dentro de las células como resultado del metabolismo oxidativo y algunas enzimas anuladoras de oxígeno protegen a los tejidos; los nematodos poseen cantidades relativamente altas de estas enzimas en comparación a las que se encuentran en los tejidos del huésped, sugiriendo que pueden ser empleadas como protección contra los radicales libres de oxígeno.
3. Resituación en los tejidos: Los nematodos tienen un sitio de fijación, la separación y resituación en un nuevo sitio puede ser una solución temporal para evitar la resistencia del huésped. Además, la relocalización se da por la busca de alimento, favoreciendo la respuesta inmune local.
4. Imitación molecular/ camuflaje con moléculas del hospedador o similares: Gracias a una evolución paralela del huésped y el parásito, es probable que exista una similitud antigénica entre estos dos, minimizando la disparidad antigénica y la inmunogenicidad: Se propone que el parásito adsorba sobre su tegumento moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, pero, por otro lado, se dice que sobre la superficie del tegumento el gusano segrega productos génicos de esquistosoma similares a la del huésped; siendo esto lo que da lugar a infecciones crónicas.

5. Inmunomodulación: Cuando un parásito reduce la efectividad de la inmunidad de su hospedero de alguna forma modula los intentos del hospedador para generar una respuesta protectora, hablamos de inmunomodulación.

(Caballero, 1998; Benhke, et. al., 1992 y Damian, 1987)

3.5 MACRÓFAGOS ALTERNATIVAMENTE ACTIVADOS EN INFECCIONES CAUSADAS POR HELMINTOS PARÁSITOS.

Los macrófagos son células distribuidas en órganos y tejido conjuntivo, especializadas en la detección y fagocitosis de patógenos intracelulares en el organismo. Sin embargo, también pueden presentar antígenos a las células e iniciar el proceso inflamatorio gracias a la liberación de citocinas (Echeverría, 2004).

Los macrófagos son capaces de adquirir capacidades funcionales dependiendo del microambiente en el que se encuentren. Por ejemplo, está la activación clásica (macrófagos del tipo M1), que estos son muy eficientes para eliminar organismos intracelulares. Por otro lado, tenemos la activación alternativa, en donde los macrófagos de tipo 2 (M2), son generados para e iniciar la reparación celular (Abbas, 2018). Estos últimos secretan citocinas antiinflamatorias como IL-10 e incluso tienen alta expresión de la enzima arginasa-1, participando activamente en la resistencia a infecciones por helmintos, ya que están involucradas en la respuesta inmune Th2 (Galindo, 2016).

Desde los estudios de Gordon en 1990 y la conclusión de que los macrófagos asumían una activación alternativa con IL-4, se clasificaron estas células con diversos roles biológicos, dando lugar a que más tarde se viera que IL-13 también lograba que los macrófagos se activaran alternativamente; ya que estas citocinas comparten una cadena del receptor y señalizan a través de STAT 6. Sin embargo, estos macrófagos no son eficientes presentadoras de antígeno, provocando muchas veces una inhibición de la proliferación de las células T. Las citocinas características producidas por los macrófagos alternativamente activados son IL-10, en conjunto con TGF- β y el receptor antagonista de IL-1 (Stempin & Cerbna, 2007).

En el modelo de infección con *Taenia crassiceps* se ha mostrado una respuesta Th1 en la fase temprana de la infección, sin embargo, al ser una etapa crónica de la infección se reemplaza por una respuesta Th2 con respuesta de macrófagos alternativamente activados y una actividad de arginasa (Terrazas, *et. al.*, 2005). Incluso se ha llegado a reportar que la respuesta Th1 puede cambiar a Th2 por la presencia de carbohidratos en *Taenia crassiceps*, induciendo a los macrófagos alternativos a producir IL-10 (Disanayake, 2002).

La generación de macrófagos alternativamente activados posteriores a la inflamación, permitiría el correcto funcionamiento inmunológico y el mantenimiento del homeostasis del organismo, sin embargo, se ha visto que esto es aprovechado por diferentes microorganismos para permanecer en el huésped (Stempin & Cerbna, 2007).

3.6 CÉLULAS T REGULADORAS (TREG) EN INFECCIONES CAUSADAS POR HELMINTOS PARÁSITOS.

La inmunidad celular está clásicamente mediada por linfocitos T, estos se activan en los órganos linfoides secundarios para posteriormente migrar hacia las zonas de infección. Existen dos grupos de linfocitos T convencionales, que son los CD4+ (cooperadores) y CD8+ (citotóxicos). Los primeros tienen la función de activar a leucocitos como neutrófilos y eosinófilos, y estimulan la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Los linfocitos T CD8+ son los responsables de matar células infectadas y tumorales, además de ser responsables de la erradicación de los microbios (Abbas, 2018). Los linfocitos T reguladores (Treg), son una subpoblación de los linfocitos CD4+. La caracterización de estas células reguladoras ha creado toda una discusión debido a la falta de marcadores exclusivos para su exacta identificación, sin embargo, se ha logrado un gran avance por sus mecanismos de supresión (Guzman, 2013). El fenotipo clásico de los Treg proveniente del timo expresan CD4+, CD25+ y el factor de transcripción FOXP3+ (regulador importante de la homeostasis de las células T reguladoras), pero se han descrito otras poblaciones circulantes secretoras de IL-10 y/o TGF- β (Zakzuk, 2015). La presencia de Tregs se ha reportado en parasitosis causadas por

protozoarios como *Trypanosoma*, *Plasmodium* y cestodos como *Taenia solium*. En la cisticercosis humana, el papel de las células Treg parece estar relacionada con el control de la inflamación, que como se ha mencionado, esto promueve el establecimiento del parásito y reduce los posibles daños al hospedero asociados con una inflamación exacerbada (Ruiz, 2013).

Los helmintos pueden expandir linfocitos T reguladores periféricos, permitiendo modificar características del sistema inmune, además de las que ya vienen determinadas desde el proceso de tolerancia central, del huésped. Se ha propuesto que el desarrollo de inmunosupresión mediada por Treg es un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica que utiliza el parásito a favor de su supervivencia, en cambio, también hay evidencia acerca de la protección que confieren sobre el daño tisular que produce la respuesta inflamatoria en contra de la infección (Sawant, *et. al.*, 2014; Tang, *et. al.*, 2011; D'Elia, *et. al.*, 2009).

Los helmintos inducen Treg que provocan un estado de respuesta disminuida específica a antígenos derivados de estas fuentes, aunque también pueden expandirlas de manera policlonal y modificar respuestas de otros antígenos de los que exista una exposición. Por esta razón, es de gran interés en inmunoterapia el efecto promotor de las células Treg que tienen los helmintos, pues en ciertas enfermedades inflamatorias crónicas estos se han encontrado disminuidos (Zakzuk, 2015).

3.7 CÉLULAS B REGULADORAS EN INFECCIONES POR HELMINTOS PARÁSITOS.

Los linfocitos B son un tipo celular que cumple múltiples funciones y que participan en la inmunidad humoral, que se caracteriza por la producción y liberación de anticuerpos. La respuesta de estos linfocitos frente antígenos proteínicos requiere de la cooperación de los linfocitos T CD4+ cooperadores específicos (Abbas, 2018). Se puede definir un linfocito B regulador (Breg) como aquel con capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria

En los últimos años, los linfocitos B productores de IL-10 han sido tema de estudio, donde indistintamente se les han llamado Linfocitos B reguladores (Breg) o células B10. Algunas evidencias en modelos murinos parecen indicar que, participan en el control de desórdenes autoinmunes como la encefalitis autoinmune experimental murina y en la regulación de respuestas inmunitarias a helmintos, ya que se han sido identificadas en pacientes infectados (Galindo, 2016). Estas evidencias en humanos confirman que las células B, como las células Treg, están involucradas en la supresión de respuestas inmunitarias antihelmínticas (Sorley, 2012). Inclusive estas células han sido identificadas como células CD19+CD5+CD1d (Reyes, 2010).

3.8 INFLAMACIÓN E INFLAMASOMAS.

La inflamación es una forma natural de defensa requerida para mantener integridad de los tejidos siempre y cuando se cumpla de manera correcta y de forma regulada (Galliussi, 2015). Es una respuesta del sistema inmune para el control de las infecciones y la posterior reparación de los tejidos. Los signos clínicos clásicos de la inflamación son calor, dolor y rubor, resultado de la acción de factores como péptidos antimicrobianos, activación de cascadas bioquímicas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Suárez y Buevas, 2015); así como quimiocinas y citocinas de la familia de IL-1; cuyo miembro más representativo es IL-1 β . A diferencia de otras citocinas, la producción de esta requiere la maduración proteolítica de los inflamasomas para su liberación (Hernández, *et. al.*, 2012).

Los inflamasomas son complejos proteicos localizados en el citoplasma de las células, actúan como sensores y mediadores en el desarrollo de la inflamación (Montaño, *et. al.*, 2017). El término inflamasoma se utilizó por primera vez en el año 2002, cuando Tschopp y colaboradores definieron la plataforma de activación de la caspasa-1 característica de la inmunidad innata, siendo la primera línea de defensa y que ayudará a el desarrollo de la respuesta adaptativa. Están relacionados con el reconocimiento de patrones conservados de secuencias proteicas a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) expresados principalmente en células presentadoras de

antígenos, como las células dendríticas y los macrófagos. Los PRRs incluyen cuatro familias: receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo RIG-I (RLR), los receptores de lectina tipo C (CLR) y los receptores tipo NOD (NLR) (Zaru, 2020).

Los inflamasomas se ensamblan en respuesta a la activación de receptores tipo NOD, los cuales están formados por tres dominios: NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain*), NLRC (*NOD-like receptor CARD domain containing*) y NLRP (*NOD-like receptor Pyrin domain containing*) (Montaño, et. al., 2017).

La familia de NLRP son receptores citosólicos que regulan la inflamación y la apoptosis (Hernández y Urcuqui, 2012), responden a señales exógenas que provienen de bacterias, hongos o virus conocidas como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) así como a señales endógenas conocidas como DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) o alarminas, las cuales son liberadas por las células que han sufrido daño (He, et. al., 2013). Constan de tres dominios responsables de mediar la transducción de la señal y/o activación de caspasas inflamatorias: la primera es su dominio central de enlazamiento de nucleótidos que media la oligomerización NATCH (NOD); lo segundo es un dominio N-terminal de pirina (PYD) que sirve para el reclutamiento de moléculas adaptadoras como ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) y el último es un dominio C-terminal, este es rico en repeticiones de leucina (LRR) importante en la detección de señales y mantener al receptor en estado inactivo. Esto en conjunto a la plataforma molecular asociada al adaptador comprendida por un dominio PYD en el N-terminal y un dominio CARD (Mendoza, 2011; Suárez y Buelvas, 2012).

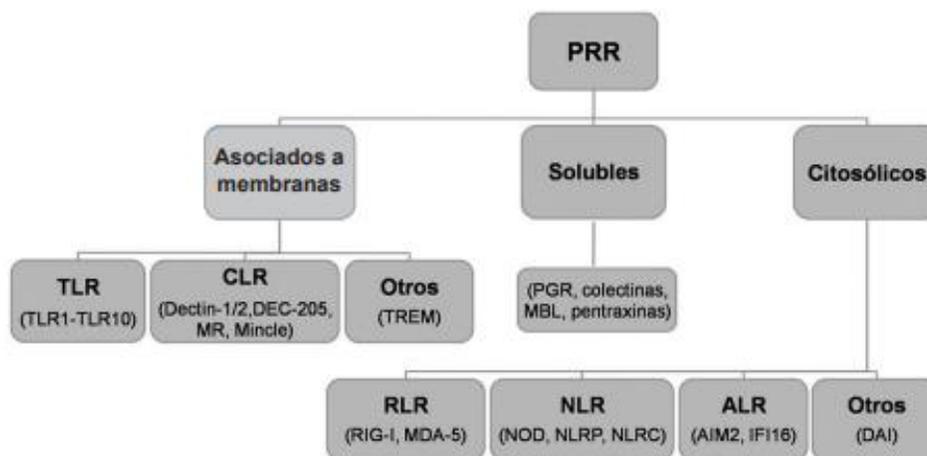


FIGURA 1. Principales familias de Receptores de Reconocimiento de Patrones (Imagen tomada de: Hernandez & Urcuquia, 2012)

3.8.1 COMPONENTES Y ACTIVACIÓN INFLAMASOMA NLRP3.

El inflamasoma más estudiado y caracterizado es NLRP3, también conocido como Criopirina. Se sabe que participa en el reconocimiento de una amplia gama de señales de peligro bacteriano (LPS), virales, fúngicas, toxinas formadoras de poros; responde a múltiples DAMPS como ATP extracelular, cardiolipina citosólica, la oxLDL (lipoproteína de baja densidad oxidada) y cristales de colesterol (Liu, *et. al.*, 2014; Duewell, *et. al.*, 2010; Galliusi, 2015).

La proteína NLRP3 consta de tres dominios (NALP3, Cryopyrin, FCAS, FCU, MWS, PYPAF1) que tiene el papel de “sensor”; el adaptador ASC (PYCARD, CARD5, TMS-1) y la procaspasa-1 (ICE, Interleucina-1 β convertasa) que funge el papel de efector (Swanson, *et. al.*, 2019 y Galliusi, 2015).

La proteína NLRP3 está conformada por el dominio central NATCH (*Nucleotide binding and oligomerization domain*) encargado de la oligomerización del inflamasoma, el dominio C-terminal rico en repeticiones de leucina (LRR) y el dominio PYD que mediante interacciones PYD-PYD recluta la molécula adaptadora ASC. Esta última se compone de dos dominios: el dominio n-terminal (PYD) y el dominio c-terminal (CARD) la cual permite el reclutamiento de procaspasa-1, además de activar el com-

plejo para que esta molécula pueda finalmente convertirse en Caspasa-1 y procesar así a IL-1 β e IL-18 en la respuesta inflamatoria (Gallusi, 2015; Swanson, *et. al.*, 2019; Montaña, 2017). La estructura de procaspasa-1 consiste en un dominio CARD que interacciona con el adaptador ASC y dos subunidades p10 y p20.

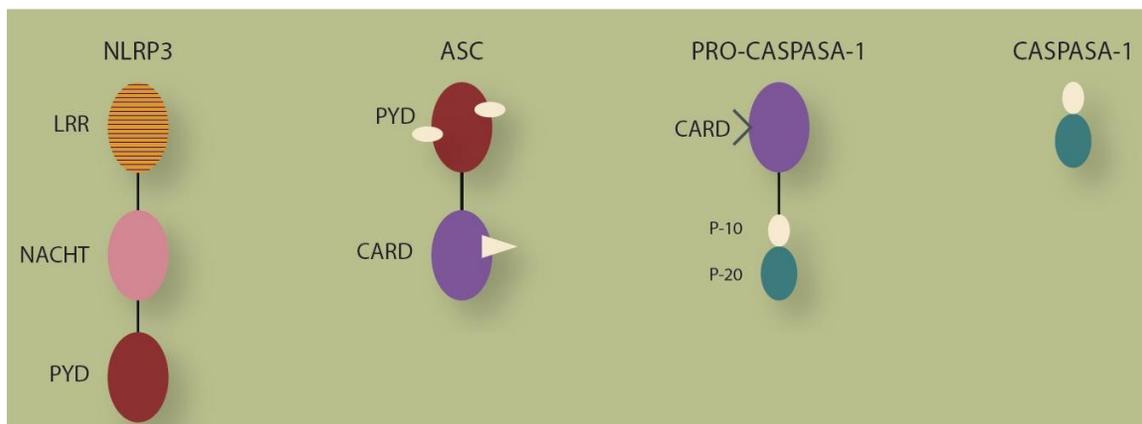


IMAGEN 2. Componentes del inflamasoma NLRP3. Se observa la proteína NLRP3, la proteína adaptadora ASC y procaspasa-1. La proteína NLRP3 es conformado por el dominio PYD, un dominio rico en repeticiones de Leucina (LRR) y un dominio NACHT encargado de la oligomerización del inflamasoma.

(Imagen tomada de: Montaña, *et. al.*, 2017)

La activación del inflamasoma NLRP3 aún no es completamente clara, sin embargo, varios estudios experimentales han descrito diversos mecanismos de activación:

1. Variación en las concentraciones intracelulares y extracelulares de K⁺: En los macrófagos primarios, se ha observado que el flujo de iones de potasio y el canal de membrana panexina-1 desempeñan un papel importante en la activación del inflamasoma, pues al abrir estos canales se activa caspasa-1 en neuronas primarias y astrocitos (Silverman, *et. al.*, 2009).
2. Variación en las concentraciones de Ca²⁺: El bloqueo de la movilización de Calcio inhibe el ensamble y la activación del complejo NLRP3. La proteína homóloga C/EPB es un factor de transcripción que puede modular la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico, amplificando la señal de activación del inflamasoma (Murakami, *et. al.*, 2012).

3. Mediante el reconocimiento de un incremento en la concentración de ATP extracelular mediante los receptores P2X7: En macrófagos intactos y con un breve tratamiento de ATP extracelular (como activador del receptor P2X7) o nigericina antes de la lisis celular, acelera notablemente el procesamiento *in vitro* de caspasa-1 e IL-1 β . Siendo esa aceleración dependiente de la pérdida de K⁺ intracelular (Kahlenberg y Dubyak, 2004).

4. Con la generación de especies ROS derivadas de la mitocondria: La hipótesis de que las Especies Reactivas de Oxígeno desencadenaban la activación de NLRP3 surgió cuando se inhibió ROS derivado del NADPH-oxidasa e impidió la activación de la caspasa-1 inducida por ATP además de la producción de IL-1 β en macrófagos. Para corroborar esto, se eliminó la subunidad P22phox de NADPH-oxidasa, observando que la liberación de IL-1 β en las células THP1 se suprimió considerablemente.

5. Mediante la desestabilización fago-lisosomal activado por moléculas como cristales de urato monosódico, asbestos y sílica: La activación de NLRP3 requiere de la internalización de los cristales, esta captación posteriormente condujo al daño y ruptura de los lisosomas. El daño lisosomal “estéril” (sin cristales) también indujo la activación del inflamasoma y la inhibición de la acidificación fagósomica o la actividad de la cathepsina B perjudicó la activación de NLRP3. Con esto se indica que el inflamasoma detecta el daño lisosomal como una señal endógena de peligro (Hornung, 2008).

Una vez reconocida alguna de las señales anteriores, se activa el factor de transcripción NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) siendo esta la primera señal (*priming*) para la activación del inflamasoma, promoviendo así la síntesis de la proteína NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-18 y citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-18, IL-6, entre otras. En seguida sucede la activación de la segunda señal, la cual permite el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 (el complejo NLRP3/ASC/pro-caspasa-1) para la activación de la

caspasa-1 y la maduración proteolítica de pro-IL-1 β y pro-IL-18, dando origen a las formas biológicamente activas: IL-1 β e IL-18. Paralelo a este proceso, producto de la activación de las caspasas, se puede inducir piroptosis con liberación de IL-1 β . La piroptosis (*piros* “fuego” o “fiebre” y *ptosis* “caída”) es una muerte celular programada de tipo infamatoria, dependiente de caspasa-1 (Hernandez y Urcuqui, 2012; Buelvas y Suárez, 2015; Melgarejo, *et. al.*, 2020).

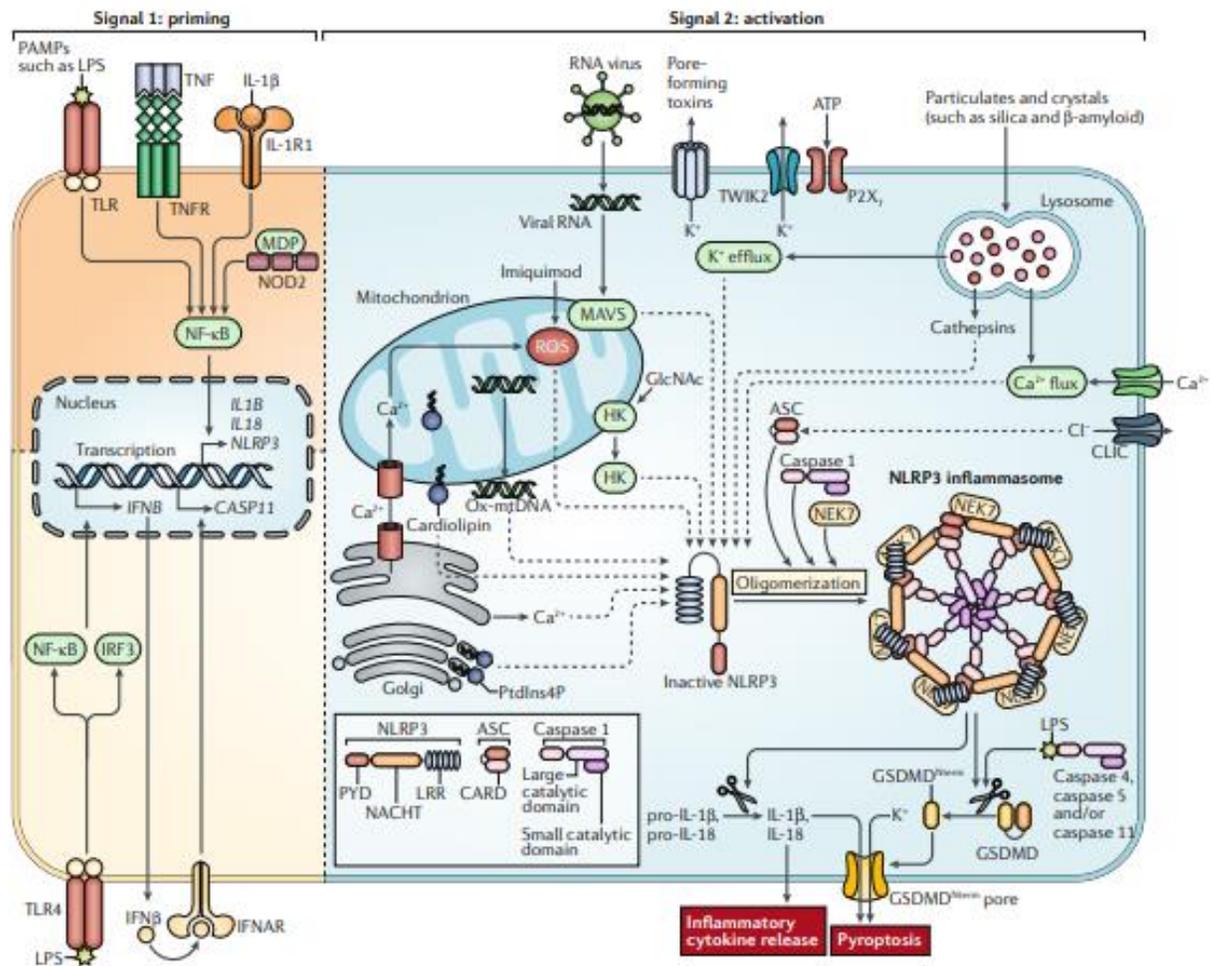


IMAGEN 3. Activación canónica del inflammasoma NLRP3 que consta de dos señales: *priming* y la activación. (Imagen tomada de: Swanson, *et. al.*, 2019)

No obstante, se ha reportado que el inflammasoma también puede activarse de manera no canónica, ya que no están implicados los componentes del complejo NLRP3. En

modelos murinos es mediada por caspasa-11, la cual requiere la señalización de TLR4 inducida por LPS (liposacaridos) a través de la proteína adaptadora contenida en un dominio TIR (región homologa del receptor TOLL) inducida por IFN- β (TRIF: TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β) para la producción de interferón dependiente de la proteína TRIF. Después de la activación del inflamasoma por la vía no canónica, las funciones celulares que se pueden llevar a cabo son: activación de la caspasa-1 dependiente de NLRP3 y la posterior secreción de IL-1 β e IL-18, piroptosis y se ha descrito un mecanismo dependiente de caspasa-11 que es capaz de generar choque séptico inducido por LPS (Suárez y Buelvas, 2015; Kayagaki, *et. al.*, 2011; Casson, *et. al.*, 2013).

Inflamasomas	Sensores	Condición/Entidades	Respuesta Inflamatoria
Canónico	TLR2, NLRP3.	ATP, LPS, MDP, MSU, Sílica, ARN.	Secreción de IL-1 β e IL-18, piroptosis.
No Canónico	TLR4, IFN γ , TGF β , Dectina-1.	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter rodentia</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , Toxina B del cólera, <i>Francisella</i> sp, hongos, β -glucanos.	Muerte celular, exocitosis de lisosomas, liberación de lactato deshidrogenasa, IL-1 β , IL-18, HMGB1, secreción de IL-1 α , caspasa-1, transición epitelio-mesenquimal, fibrosis intersticial y piroptosis.

TABLA 1. Diferencias entre la activación canónica y no canónica del inflamasoma NLRP3. (Imagen tomada de: Suarez & Buelvas, 2015)

3.8.3 MECANISMO DE REGULACIÓN DEL INFLAMOSOMA NLRP3.

Teniendo en cuenta el papel crítico del inflamasoma NLRP3 en el control de infecciones y detección de daño tisular estéril, hay múltiples mecanismos para la regulación de este complejo con el fin de evitar enfermedades derivadas de su hiperactivación, sin embargo, dichos mecanismos son poco explorados (Hernández y Urcuqui, 2012). Se ha reportado que la regulación en la maduración de IL-1 β y la activación de los inflamasomas, es mediada a través de señales extracelulares e intracelulares, ya sea de manera positiva o negativa, con la finalidad de asegurar una respuesta inflamatoria rápida y eficiente (Suárez y Buelvas, 2015).

La regulación de manera positiva del inflamasoma NLRP3 se puede dar por una baja concentración intracelular del ión K^+ , por el aumento de las ROS y por la alteración de la membrana del lisosoma. Es importante conocer los mecanismos de regulación de esta plataforma, pues no sólo regulan células del sistema inmunológico, sino que también funciones en otros tipos de células tales como queratinocitos, células β pancreáticas, neuronas para generar respuestas efectoras integradas (Suárez y Buelvas, 2015).

Otra forma de regulación, es la ubiquitinación, siendo importante en la activación de NF- κ B ya que actúa a nivel del complejo de cinasas I κ B (IKK) que consta de tres subunidades: IKK α , IKK β y la unidad reguladora y estructural denominada NEMO ("NK-kappa-B Essential Modulator"). Cuando los receptores TLR promueven una señal de peligro, promueven la ubiquitinación del dominio regulador NEMO debido a que tiene dos dominios de unión e ubiquitina (Chen, *et. al.*, 2013).

Por otro lado, tenemos la fosforilación como mecanismo de regulación. El cebado de los TLR's induce la fosforilación de NLRP3 (Ser194 en modelos murinos y Ser198 en humanos) por JNK1 también conocido como MAPK8, y promueve la autosociación y activación de NLRP3 (Swanson, *et. al.*, 2019), sin embargo, la fosforilación también puede suprimir la activación del complejo proteico. En modelos murinos se observó que Ser3 dentro del PYD previene la activación del inflamasoma debido a la electrostática repulsión de PYD125 en el dominio ASC, mientras que la proteína fosfatasa 2A desfosforila Ser3 para mejorar la nucleación de NLRP3 con ASC12 (Zhang, *et. al.*, 2017 y Stutz, *et. al.*, 2017).

Otro de los mecanismos de regulación del inflamasoma NLRP3 es a través del interferón γ (INF- γ) derivado de los linfocitos T, mismo que disminuye la activación por medio del óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) debido a que el óxido nítrico (NO) induce la nitrosilación de la proteína NLRP3 e inhibe su actividad (Lantz, *et. al.*, 2013). También se ha reconocido que la regulación post-transcripcional mediada por micro-ARNs pueden regular de manera importante la expresión de los genes inflamatorios; en este sentido, variaciones en los niveles de transcrito de NLRP3, funcionan como un mecanismo regulador del umbral que pueden tener los inflamasomas en los diferentes tipos celulares (Haneklaus, *et. al.*, 2013)

3.9 EVIDENCIA DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS INFLAMASOMAS EN LA INMUNOREGULACIÓN O INMUNOSUPRESIÓN.

La inmunomodulación o inmunosupresión es el cambio en el sistema inmunitario del cuerpo causado por sustancias que activan o debilitan su función (Instituto Nacional del Cáncer, S.A.). Como se describió anteriormente, el inflamasoma NLRP3 puede activarse en respuesta de diferentes estímulos, obteniendo así la maduración y liberación de IL-1 β y/o IL-18. Sin embargo, se ha reportado que las respuestas inflamatorias no siempre son benéficas y pueden promover el desarrollo de una patología. Walsh y colaboradores (2013) observaron que, en el caso del paludismo, la producción de IL-1 β se asocia a complicaciones clínicas y con el desarrollo de estas, malaria cerebral. Esto indica que el proceso de inflamación debe ser finamente controlado. En infecciones causadas por helmintos, la función del inflamasoma NLRP3 no ha sido del todo claro, sin embargo, han surgido modelos experimentales que han logrado honrar en el tema. Por ejemplo, se ha reportado que *Trichuris muris* es capaz de bloquear la respuesta Th2, pues induce la expresión de IL-18 de manera dependiente a NLRP3, tanto en macrófagos cultivados con antígenos del parásito como en un modelo de infección murino (Alhallaf, *et. al.*, 2018). Por el contrario, Zaiss y colaboradores (2013), en una infección con *Heligmosomoides polygyrus* se observaron un aumento de la secreción de IL-1 β , la cual controla el establecimiento de una exacerbada respuesta de tipo Th2, inhibiendo la producción de IL-25 e IL-33.

También se ha demostrado que antígenos solubles en los huevos de *Schistosoma sp.* promueven la formación y activación del inflamasoma NLRP3 en células hepáticas de ratón (Meng, *et. al.*, 2016). Incluso se ha descrito que la molécula de defensa de helmintos (HDM-1) secretada por *Fasciola hepática* inhibe la acidificación endolisosomal en macrófagos, evitando así que NLRP3 sea activado por catepsina B. Este bloqueo de activación ayuda contribuyendo al desarrollo de una respuesta Th2, siendo beneficiosa para el parásito (Alvarado, *et. al.*, 2017).

Estos reportes sugieren que independientemente del mecanismo empleado por las diferentes moléculas provenientes de estos parásitos, el resultado final será un balance entre la respuesta inmune protectora del hospedador y el daño producido por el parásito, favoreciendo la supervivencia de ambos y por ende la cronicidad de la patología. Esto nos permite asignar un nuevo rol tanto a IL-1 β como a IL-18 en el control de una exagerada respuesta Th2 la cual sería perjudicial para el parásito (Celas, 2018).

4. HIPÓTESIS

Debido a que se ha observado que una respuesta inflamatoria se requiere para controlar la infección experimental con *Taenia crassiceps*, hipotetizamos que la ausencia de NLRP3 como promotor de una respuesta inflamatoria ocasionará que este parásito se establezca con mayor facilidad.

5. OBJETIVO.

Determinar la participación del receptor NLRP3 en la respuesta inmune ante la infección experimental con *Taenia crassiceps*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar la carga parasitaria en ratones silvestres (WT) y ratones deficientes del receptor NLRP3 (NLRP3^{-/-}).
- Determinar los porcentajes de macrófagos con PDL1 y PDL2 en la cavidad peritoneal de ratones infectados.
- Cuantificar los niveles de citocinas en muestras sanguíneas y en sobrenadantes de cultivos de órganos linfoides secundarios.
- Identificar la participación de NLRP3 en la diferenciación *in vitro* de macrófagos supresores

6. JUSTIFICACIÓN

El receptor NLRP3 participa de manera importante en infecciones causadas por patógenos intracelulares. Sin embargo, existen pocos reportes en el contexto de infecciones causadas por parásitos multicelulares y la mayoría de estos estudios realizados en modelos de nematodos intestinales. No existen estudios que abordan la participación del receptor NLRP3 como modulador de la respuesta inmune en modelos de infección con cestodos como es el caso de *Taenia crassiceps*. Por lo tanto, estudiar la participación de NLRP3 en un modelo de infección en el cual se genera un ambiente de supresión global puede ayudar a entender la participación de este receptor en procesos de inmunomodulación.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. ANIMALES EXPERIMENTALES

Para este trabajo se utilizaron ratones hembras de 8 semanas de edad. Para el grupo control se utilizaron ratones silvestres (WT) en fondo genético C57BL/6 y para el grupo experimental ratones C57BL/6 deficientes del receptor NLRPP3 (NLRP3^{-/-}) donados por el Dr, Bertus Eksteen (Calgary, Alberta, Canadá). Los ratones no tuvieron restricción de agua o comida y se mantuvieron en cajas de policarbonato para ratones en el bioterio de nuestra facultad. La utilización de los animales de experimentación se realizó siguiendo los lineamientos de la NOM-062-Z-1999 y fue aprobada por el comité de Bioética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (CE/FESI/042022/1513)

7.2. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS ANIMALES EXPERIMENTALES POR MEDIO DE PCR.

7.2.1 EXTRACCIÓN DEL DNA.

Con material nuevo y estéril, a cada uno de los ratones se les realizó un corte de aproximadamente 0.5 cm en la parte final de la cola. Se llevó el tejido a tubos de 1.5 ml (Eppendorf) con 500 µl de buffer de lisis (Apéndice 1) y 5 µl Proteínasa K (Invitrogen) durante 24 horas a una temperatura de 56°C.

Posteriormente, las muestras se llevaron a centrifugar a 13,000 RPM durante 12 minutos. Dentro de la campana se tomó el sobrenadante y se colocó en otros tubos Eppendorf con 500 µl de isopropanol frío, se homogenizó la muestra de manera suave logrando la precipitación del DNA. Se llevó nuevamente a centrifugar a 13,000 RPM durante 12 minutos para concentrar las muestras y se decantó la fase líquida. Se re suspendió y se colocó etanol frío al 75 % para lavar el DNA centrifugándolo cinco minutos a 13,000 RPM. Se decantó el alcohol de las muestras y se dejan las muestras en la campana durante al menos quince minutos para que se evapore el alcohol restante

que en los tubos se evapore. Por último, se re suspendieron las muestras en 50 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas y se congelaron.

7.2.2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN

Para el reconocimiento del gen NLRP3 se utilizaron primers específicos (Ampliqon). En tubos nuevo y estériles con capacidad de 0.2 ml, se colocaron los siguientes reactivos para obtener un volumen final de 25 µl (en orden):

	1rxn
Master mix	12.5 µl
Agua	4.5 µl
NLRP3 Primer F	2 µl
NLRP3 Primer R1	2 µl
NLRP3 Primer R2	2 µl
Agua	2 µl

Una vez que las muestras estuvieron listas y rotuladas correctamente, se llevaron al termociclador (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones:

STAGE 1	STAGE 2			STAGE 3	
95°C (1:04:00)	95°C (0:00:30)	60°C (0:00:40)	72°C (0:00:30)	72°C (0:05:00)	4°C
1x	40x			1x	∞x

7.2.3. ELECTROFORÉISIS.

Para este procedimiento se utilizó un gel de agarosa (Cleaver) al 1.5% en Buffer TBE 1x (Apéndice 1) y 3 µl de bromuro de etidio sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos. Se mantuvo a temperatura ambiente hasta que el gel se solidificó.

En el primer pozo del gel, se cargaron 2 µl de peso molecular (Cleaver, 100pb), por lo que a partir del segundo pozo se cargaron 10 µl de las muestras previamente preparadas. Se corrió el gel a 100 Volts, 45 Amperes, durante 27 minutos.

Se observó el gel en un transiluminador con luz UV (FujiFilm FLA-5000) y se capturó la foto utilizando el programa ImageReader FLA-5000 V2.1.

7.3 INFECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA PARASITEMIA EN LOS ANIMALES EXPERIMENTALES.

Una vez determinado el genotipo del grupo control y de los ratones NLRP3^{-/-}, se procedió a infectar a los ratones de manera intraperitoneal (i.p.) con 20 metacéstodos de *Taenia crassiceps* de 2mm sin gemaciones de la cepa ORF. Se re suspendieron en 300 µl de solución salina. Los metacéstodos se recuperaron de ratones BALB/c con 8 semanas de infección, la cual se realizó previamente.

Para mantener la cepa se realizaron pases sucesivos en ratones BALB/C, de igual manera fueron infectados i. p. durante todo el proyecto.

La infección se monitoreo visualmente durante 8 semanas.

7.4 OBTENCIÓN DE SUERO SANGUÍNEO.

Al día cero de infección y en la semana 4 y 8 posteriores a la infección se sangraron los ratones.

Se utilizó una caja de madera con un foco de 60 watts (Phillips) para generar calor e inducir la dilatación en la vena caudal y facilitar el sangrado. Cada ratón se sometió a 2 minutos de calor y con un bisturí se hizo un corte en la vena caudal localizada en la

cola. La sangre se recolectó en un tubo Eppendorf con 15 μ l de EDTA al 17% (Apéndice 1). Los tubos con sangre se centrifugaron durante 10 minutos a 5,000 RPM y el suero, la parte libre de plaquetas, se pasó a otro tubo debidamente etiquetado.

Las muestras se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su uso para determinación de citosinas.

7.5. DETERMINACIÓN DE CARGA PARASITARIA.

A la semana 4 y 8 que se sacrificaron los ratones, se les realizó un lavado intraperitoneal con 10ml de solución salina estéril para recuperar los parásitos; posteriormente se contaron para poder determinar la carga parasitaria en cada ratón.

7.6. CULTIVO DE CÉLULAS DE BAZO.

En la semana 4 y 8 se extrajo el bazo de los ratones. Dentro de la campana previamente esterilizada, se separaron las células del tejido con ayuda de un separador celular (100 μm) y 2 ml de medio RPMI 1640 (BioWest). Las células se depositaron en tubos estériles de 10 ml (Falcon) y centrifugaron a 3,000 RPM durante 6 minutos para concentrar las muestras. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron con 3 ml de Buffer ACK (Apéndice 1) durante 3 minutos para eliminar eritrocitos restantes. La reacción se detuvo con 3 ml de medio RPMI 1640 y las muestras se centrifugaron nuevamente a 3,000 RPM por seis minutos, posteriormente se decantaron y se agregó 10 ml de medio para homogenizar las células.

Se contaron las células con ayuda de una cámara de Neubauer, se colocaron 9 μ l de azul tripano (Meyer) y 1 μ l de la muestra correspondiente. Se obtuvo el número de células por mililitro y se ajustó el conteo para tener 5×10^6 células/ml. Se colocó 1ml de muestra por pozo en una placa de cultivo celular de 24 pozos (Corning Incorporated Costar) y se suplementó cada muestra con 2 μ l de ConA (Sigma). Se dejaron durante 48 horas a 47°C .

Pasado el tiempo, se revisa si las placas no están contaminadas y las células se pasan a tubos Eppendorf para centrifugarse 6 minutos durante 3,000 RPM. En condiciones estériles dentro de la campana, se recolecta en sobrenadante y se coloca en tubos Eppendorf correctamente etiquetados. Las muestras se mantienen congeladas hasta su posterior análisis en ELISA.

7.7 CULTIVO DE CÉLULAS DE GANGLIO.

En la semana 4 y 8 se extrajo el ganglio mesentérico de los ratones. Dentro de la campana previamente esterilizada, se separaron las células del tejido con ayuda de un separador celular (100µm) y 1ml de medio RPMI 1640 (BioWest). Las células se depositaron en tubos estériles de 10 ml (Falcon) y se centrifugaron a 3,000 RPM durante 6 minutos para concentrar las muestras. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 1ml de medio.

Se contaron las células con ayuda de una cámara de Neubauer, se colocaron 9 se colocaron 9 µl de azul tripano (Meyer) y 1 µl de la muestra correspondiente. Se obtuvo el número de células por mililitro y se ajustó el conteo para tener 3×10^6 células/ml. Se colocó 1ml de muestra por pozo en una placa de cultivo celular de 24 pozos (Corning Incorporated Costar) y se suplementó cada muestra con 2 µl de ConA (Sigma). Se dejaron durante 48 horas a 37°C.

Pasado el tiempo, se revisa si las placas no están contaminadas y las células se pasan a tubos Eppendorf para centrifugarse 6 minutos durante 3,000 RPM. En condiciones estériles dentro de la campana, se recolecta en sobrenadante y se coloca en tubos Eppendorf correctamente etiquetados. Las muestras se mantienen congeladas hasta su posterior análisis en ELISA.

7.8 CULTIVO DE MACRÓFAGOS EN MÉDULA OSEA

Se sacrificaron ratones sanos WT y NLRP3^{-/-} con una edad de 5 a 8 semanas. En la campana de flujo laminar en condiciones totalmente estériles se extrajo la medula

ósea localizada en los huesos largos de las patas traseras y se recolectó en tubos de 50 ml con Medio RPMI al 20% (Apéndice 1). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 3,000 RMP, se decantaron y se resuspendieron con 50 ml de medio y 400 µl de MCSF (Tonbo Biosciences). En una placa de 24 pozos se colocaron 10 ml de las células y se dejan 48 horas a 37°C.

Pasado el tiempo, se observó que las placas no se encontraran contaminadas y en la campana de flujo laminar se retiró el medio de cada pozo para realizar tres lavados con solución salina. Posteriormente se agregó 10 ml de medio RPMI y 200 µl de MHSF a cada pozo para llevarse nuevamente a 37°C durante 48 horas.

Lo siguiente que se realizó fue preparar solución de despegado (Apéndice 1) para poder retirar los macrófagos adheridos a la placa. En la campana de flujo laminar se retiró el medio y se colocó 10 ml de solución de despago a cada pozo y se dejó a 37°C durante 30 minutos, para detener la reacción se colocó 4 ml de medio RPMI al 20% mismo con el que se enjuagó el pozo 5 veces y se recuperó en un tubo de 15ml para centrifugarse a 3,500 RPM durante 5 minutos. Se contaron las células con ayuda de la cámara de Neubauer y azul tripano para ajustar el número de células totales a 0.5×10^6 por pozo en dos placas nuevas de 24 pozos con el siguiente etiquetado:

WT	Unst	LPS	IL-4	TcES	LPS/TcEs	IL-4/TcES
NLRP3 ^{-/-}	Unst	LPS	IL-4	TcES	LPS/TcEs	IL-4/TcES

Cuando se cumplió el tiempo de las respectivas placas (24 y 48 hr), se recolectó el medio en tubos de 1.5ml. Las muestras se hicieron por duplicadas; el primer juego de muestras se centrifugó 5 minutos a 3,500 RPM y se recuperó el sobrenadante para posteriormente cuantificar citocinas por prueba ELISA. Al segundo juego de muestras se les adicionó 500 µl de Trizol (Sigma) y se mantuvieron congeladas hasta que se realizó la extracción de RNA.

7.8.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Una vez descongeladas las muestras y condiciones estériles en la campana de flujo laminar se le colocó 250 μ l de Cloroformo frío (Sigma) y los tubos se agitaron de manera suave para homogenizar y dejar reposar durante 10 minutos. Pasado el tiempo, se centrifugaron las muestras por 12 minutos a 12,000 RPM, el sobrenadante (fase blanca) se recuperó en tubos de 1.5 ml con 500 μ l de Isopropanol frío, se agitaron de manera suave para limpiar la muestra y nuevamente se centrifugaron 12 minutos a 12,000 RPM para obtener el concentrado de RNA. Se decantó el alcohol y el RNA se resuspendió con 500 μ l de etanol frío al 75% para posteriormente centrifugar 5 minutos a 12,000 RPM. Se decantaron las muestras y se dejaron secar durante diez minutos dentro de la campana de flujo laminar. Por último, el RNA se concentró en 30 μ l de agua estéril y se congeló hasta su uso.

7.8.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA PARA DNA COMPLEMENTARIO (cDNA)

Se utilizó el Kit Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis. Se cuantificó el RNA en el nanofotómetro (ByoSystems) para ajustar las muestras a 1,000 ng de RNA y se siguió el protocolo propuesto por el proveedor, por lo que dentro de la campana de flujo laminar se realizó la mezcla de los componentes del kit en tubos nuevos y estériles de 0.2 ml con lo siguiente:

Oligo dT 0.5 μ l

RNA n μ l (1,000 ng)

Agua n μ l

Volumen = 6 μ l

Una vez ajustado el volumen de los tubos, se incubaron 5 minutos a 65°C en el termociclador (BioSystems) y se dejaron reposar 5 minutos en una gradilla fría para PCR (Cryobloque, Eppendorf). Después de este paso, se adicionaron las muestras con lo siguiente:

Ribo	2 μ l
dNTPS	1 μ l
Enzima RT	0.5 μ l

Se agitaron suavemente los tubos para homogenizar las muestras y se llevó a incubar al termociclador 1 hora a 45°C y 5 minutos a 75°C. Las muestras se pasaron nuevamente a la gradilla fría y se cuantificaron en el nanofotómetro antes de congelarse para su posterior uso.

7.8.3. AMPLIFICACIÓN DE cDNA

Cuando se determinó la cantidad de cDNA por muestra, con el objetivo de realizar un análisis semi cuantitativo de diferencias en la transcripción del gen IL-1b, PDL1, PDL2, ATG16, RELM, se ajustó la concentración de 2000ng/ μ l.

Se agregó lo siguiente:

Master Mix	12 μ l
Primer R	1 μ l
Primer F	1 μ l
Agua	8.5 μ l
Muestra	2 μ l

7.8.4. ELECTROFORESIS

Se realizó un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1x (Apéndice 1) con 3 μ l de bromuro de etidio dejándolo solidificarse a temperatura ambiente durante 30 minutos.

En el primer carril del gel se cargó 3 μ l de marcador de peso molecular (100pb) y en los carriles siguientes 10 μ l de las muestras, se dejó correr durante 25 minutos a 100 volts y 45 amperes.

Para observar y capturar la imagen de las bandas obtenidas se utilizó un transiluminador de luz UV (FujiFilm FLA-5000) y se capturó la foto utilizando el programa ImageReader FLA-5000 V2.1

7.9 INYECCIÓN DE RATONES CON TcES e IL-4

Se utilizaron ratones hembras de ocho semanas de edad, se utilizó un grupo control (WT) y un grupo NLRP3^{-/-}, a los cuales se les inyectó i.p. una combinación de 50µg de antígeno excretado secretado de *Taenia crassiceps* (TcES) y 20 ng de la citocina IL-4. Se sacrificaron 72 horas posteriores a la inyección y se recuperaron las células reclutadas a la cavidad peritoneal con 8ml de solución salina estéril para posteriormente poder analizarlas a través de la citometría de flujo.

7.10 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS EN SUERO POR ELISA

La mediación de citosina se realizó a la semana 4 y 8 posteriores a la infección. Se utilizaron los pares de anticuerpo para detectar IL-4, IL-15, IL-10, IL-22, IL-1β. En todos los casos el procedimiento fue el mismo y se siguieron las indicaciones del proveedor como a continuación se describe:

7.10.1. SENSIBILIZACIÓN DE LA PLACA

Se diluyó 1 µl del anticuerpo de captura en 10.5 ml de PBS (Apéndice 1), se homogeneizó y se colocaron 100 µl a cada pozo utilizando una micro pipeta multicanal (Gilson) en una placa para ELISA de 96 pozos (NUNC, maxisorp). Para la correcta reacción del anticuerpo, la placa se cubrió con papel aluminio y se incubó a 4°C por 24 horas.

7.10.2. MUESTRAS Y CURVAS.

Pasado el tiempo, la muestra se sacó del congelador y se lavó 3 veces con PBS+TWIN (Apéndice 1), se quitó el exceso de solución de lavado con suaves golpes y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para su completo secado. Posteriormente se colocó 200 µl de PBS+BSA (Apéndice 1) en los pozos y se dejó actuar durante una hora, después se lavaron las placas tres veces más y se volvieron a secar.

Se utilizaron 25 μ l del suero sanguíneo y 100 μ l de sobrenadante para colocar en los pozos estipulados para las muestras. Para poder extrapolar los valores de densidad óptica, se realizó una curva patrón con la citosina recombinante murina con diluciones al doble para cada una de las placas, se utilizaron las dos primeras líneas de cada placa (Línea A y B) diluidas en PBS+BSA. Las curvas se iniciaron partiendo de 10 ng hasta 0.01 ng.

La placa se cubrió nuevamente con papel aluminio y se dejó 24 horas a 4°C.

7.10.3 REVELADO DE LA ELISA.

La placa se lavó cuatro veces una vez pasado el tiempo y se quitó el exceso de solución de lavado con suaves golpes para después dejarla a temperatura ambiente durante 10 minutos para el secado total y así adicionar el anticuerpo correspondiente marcado con biotina en un volumen de 10.5 ml de PBS+BSA y 10 μ l del anticuerpo biotinizado agregando así 100 μ l a cada pozo. Se cubrió con papel aluminio y se dejó incubar durante dos horas a temperatura ambiente.

Pasador el tiempo, la placa se lavó 4 veces y se secó correctamente. Se preparó una alícuota de PBS+BSA y de peroxidasa de rábano (Prepotech) en una dilución 1:5500 para poder colocar 100 μ l en cada pozo y dejar incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Por último, se lavan 7 veces las placas y se preparó la solución de revelado que consiste en 10 μ l H₂O₂ al 30% (Sigma) en 10.5 ml de ABTS (Apéndice 1), se colocó 100 μ l por pozo y se dejó actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se llevó al lector de placa (Thermo Labsystems, Multiskan Ascent) utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

7.11. CITOMETRÍA DE FLUJO

Se analizaron las células reclutadas en la cavidad peritoneal, en bazo y ganglio mesentérico. Estas dos últimas se tratan de manera similar a lo descrito en el cultivo del respectivo órgano, sin embargo, una vez ajustado el número de células a 1×10^6 , se colocó

300 µl de Buffer de FACS (Apéndice 1) y se centrifugaron durante 5 minutos a 3,000 RPM. Se decantó el sobrenadante y se lavan las células nuevamente con 200 µl de Buffer de FACS y se agregó 10 µl de solución de bloqueo FBS (Apéndice 1) durante 10 minutos y poder agregar los anticuerpos conjugados.

Para las células de la cavidad peritoneal se recolectaron cuando en la semana 4 y 8 post-infección. A los ratones sacrificados se les inyectó intraperitonealmente (i.p.) 10 ml de solución salina estéril para realizar un lavado peritoneal y poder recuperar con la jeringa el total de las células del peritoneo. Las muestras se colocaron en tubos de 15 ml y se centrifugaron durante 5 minutos a 3,000 RPM, después se colocó 10 ml de medio y se contaron las células con ayuda de la cámara de Neubauer para ajustar el número de células a 1×10^6 /ml. Posteriormente se pasan las células a tubos Eppendor con 300 µl de Buffer de FACS y se centrifugan durante 5 minutos a 3,000 RPM. Se decantó el sobrenadante y se le colocó a cada muestra 200 µl de Buffer de FACS, se re-suspendió la pastilla y se adicionó 10 µl de solución de bloqueo FBS (Apéndice 1) durante diez minutos y colocar los anticuerpos conjugados.

Todas las muestras se trataron con los siguientes cocteles de anticuerpos:

	1rx
CD19-PE	0.5 µl
F480 APC	0.5 µl
CCD3 APCY7	1 µl
PDL1 BV711	1 µl
PDL2 BV421	1 µl
7AAD BERCP	3 µl

Para un análisis más específico en células de ganglio mesentérico y bazo:

1rx

CD3 APCCY7	0.6 μ l
CD4 FITC	1 μ l
CD8 APC	0.5 μ l
7AAD BERCP	3 μ l
PDL1 BU711	0.5 μ l
PDL2 BU421	0.5 μ l
CD19	0.4 μ l

Para un análisis más específico de PECS:

	1rx
F480 PECy7	1 μ l
PDL1 BU711	0.5 μ l
PDL2 BU421	0.5 μ l
SingleCF APC	1 μ l
CCR3 PE	1 μ l
7AAD PECP	3 μ l

Una vez agregados los anticuerpos, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Se utilizó citómetro ATTUNE life technologies para la captura y análisis de datos.

7.12. ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó el programa GraphPad Prism 9.0 para obtener el promedio y error estándar de los datos, así como para comparar las diferencias por medio de la prueba de t no pareada.

8. RESULTADOS

8.1 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS RATONES DEL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO EXPERIMENTAL.

Para mantener el control de la colonia de ratones genéticamente modificados se realizó la técnica de PCR utilizando el DNA extraído del fragmento que se obtuvo previamente de la cola de los animales experimentales. En el carril 2 y 3 observamos el producto de amplificación para los ratones WT con un tamaño de 346 pb y en los carriles 4 y 5 observamos las bandas correspondientes a 650 pb que nos indican que los ratones son NLRP3^{-/-} y por tanto no son capaces de activar el inflammasoma NLRP3.

Con este ensayo se comprobó que los ratones experimentales utilizados en el presente trabajo cumplieron con las condiciones necesarias.

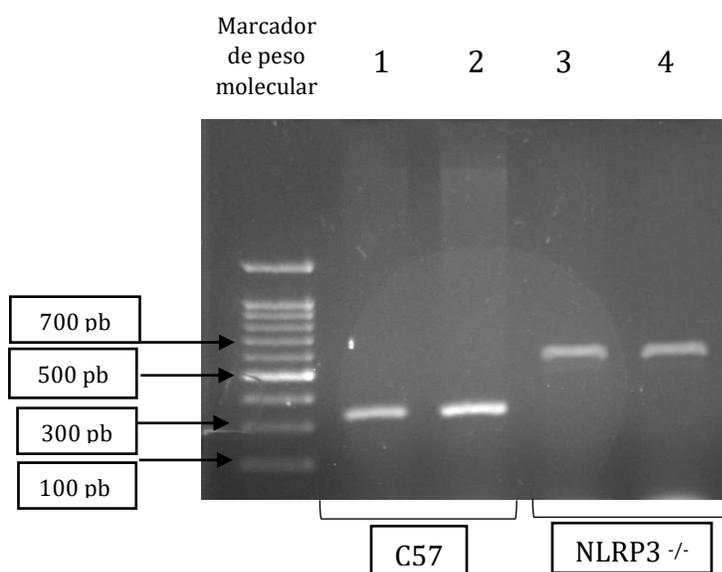


FIGURA 2. Determinación del genotipo del grupo control (WT) y el grupo experimental (NLRP3^{-/-}) utilizando la técnica de PCR en gel de agarosa al 1.5%.

8.2 PARASITEMIA

Con el objetivo de comparar la cantidad de parásitos alojados en la cavidad peritoneal entre el grupo WT y el grupo NLRP3^{-/-}, los animales se sacrificaron a la semana 4 y 8 posteriores a la infección para poder recolectar y contar los cisticercos del cestodo *Taenia crassiceps*. En la Figura 3 se observan los resultados promedio obtenidos en 4 experimentos. Los ratones WT presentaron un crecimiento progresivo, siendo la semana 8 el pico máximo de parasitemia con un promedio de 480 cisticercos. Contrario a los ratones NLRP3^{-/-} que el pico máximo de parasitemia se encuentra en la semana 4 con un promedio de 20 cisticercos y es importante observar que para la semana 8 estos ratones presentaron un máximo de 3 cisticercos o en su caso, sólo fragmentos de estos organismos.

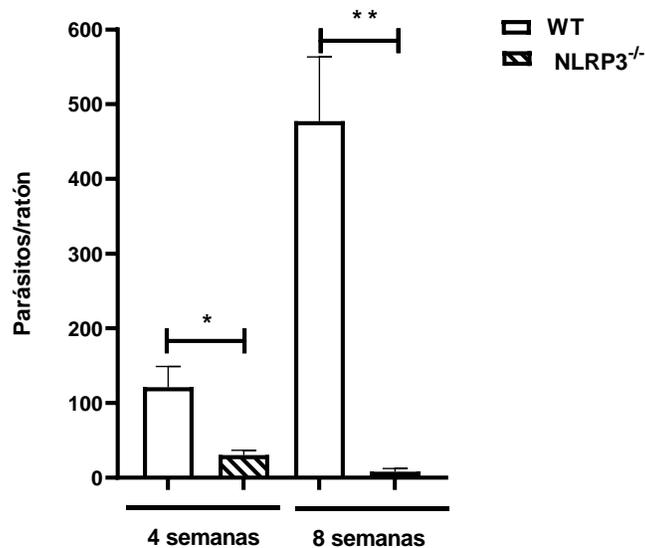


FIGURA 3. Número de parásitos recuperados de la cavidad peritoneal después de la infección i.p. con 20 metacestodos de *T. crassiceps*. Los ratones NLRP3^{-/-} son altamente resistentes a este helminto. Los datos muestran la media de 4 ratones por grupo en cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. Los promedios se compararon con prueba de T (Graphpad Prism)

8.3 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PERITONEALES

Con el propósito de determinar la participación y activación del Ligando de Muerte Programada 1 y 2 (PDL1 y PDL2), así como la proliferación de las células T y B por medio de citometría de flujo, se recolectó el líquido peritoneal en las semanas 4 y 8 post infección. Adicional, se realizó un conteo celular del líquido obteniendo los resultados que se muestran en la figura 4. En los ratones WT a la semana 4 se cuantificaron 10 millones de células, cantidad que se duplicó para la semana 8. En los ratones NLRP3^{-/-} sucedió el efecto contrario: en la semana 4 se encuentran alojadas aproximadamente 20 millones de células y para la semana 8 el total de células baja considerablemente hasta 8 millones de células. Comparando con la figura 3 se observa que la actividad celular es equivalente al número de parásitos alojados en la cavidad peritoneal.

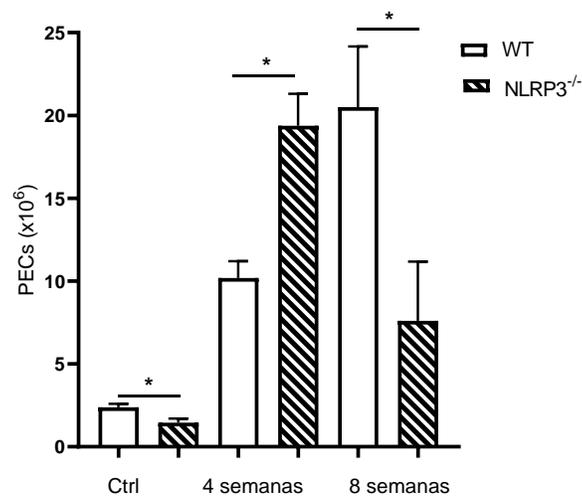


FIGURA 4. Células totales obtenidas del lavado peritoneal recolectado a las semanas 4 y 8. El grupo control muestra la cantidad de células que hay sin infección por el cestodo *T. crassiceps*. Los datos son el promedio de 4 ratones por grupo que representan 4 experimentos independientes. *p 0000

8.4 CITOMETRÍA DE FLUJO

Se extrajeron y cuantificaron las células peritoneales de ratones experimentales en la semana 4 y 8 de la parasitemia. En la figura 5 se observa que el porcentaje de linfocitos (R1) presentes en la cavidad peritoneal de los ratones NLRP3^{-/-} es mayor, tanto en la semana 4 y 8, comparada con los ratones WT. Por otro lado, entre los grupos experimentales no se observan diferencias en los porcentajes de monocitos (R2) en la semana 4 de parasitemia, sin embargo, en la semana 8 ya es posible observar que los ratones NLRP3^{-/-} disminuyen de manera significativa y el grupo WT duplican la cantidad inicial. Los granulocitos (R3) de los ratones WT aumentan de manera significativa para la semana 8, cosa que no sucede con los ratones NLRP3^{-/-} ya que sólo aumentan en un 2% a la semana 8.

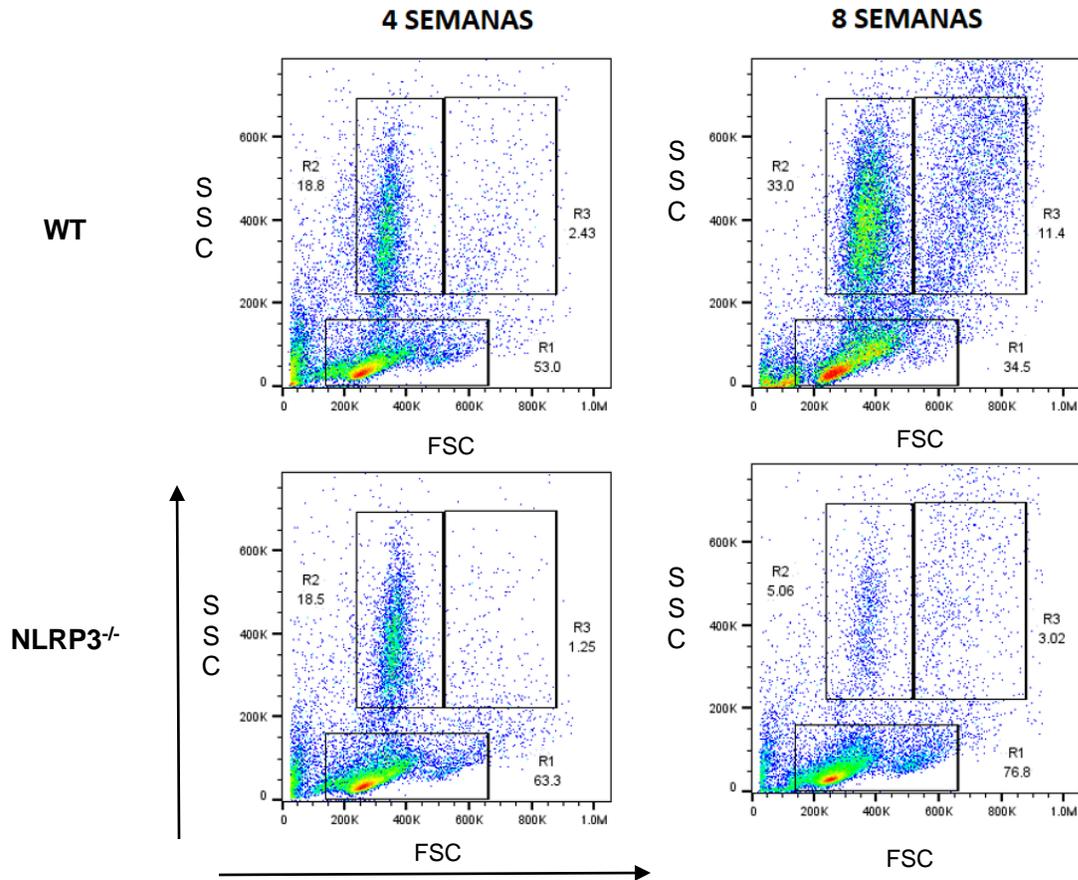
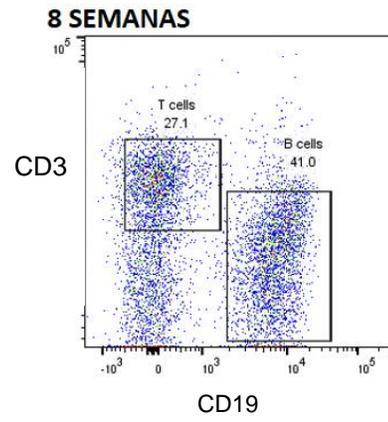
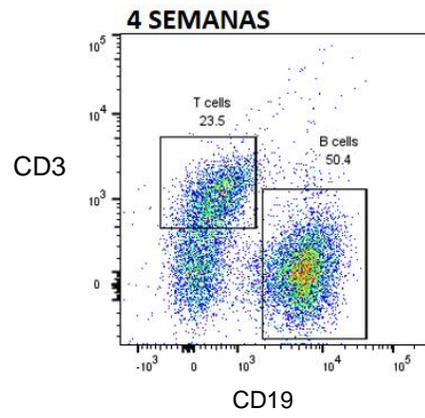


FIGURA 5. Citometría de flujo de células peritoneales de ratones WT contra NLRP3^{-/-}. Los ratones WT presentan un gran número de granulocitos y linfocitos en la semana 8 de infección comparados con los ratones resistentes. Los monocitos de los ratones WT incrementan conforme lo esperado mientras que los ratones NLRP3^{-/-} presentan un decremento

En la figura 6 A) se presenta un aumento en la región de linfocitos (R1). En la semana 4 se observa que los ratones WT y NLRP3^{-/-} presentan un porcentaje similar de linfocitos T y linfocitos B, es en semanas posteriores donde vemos las diferencias significativas. En la figura 6 B se muestra la sección de linfocitos T de la Citometría de flujo con marcadores de diferenciación para células CD8 y CD4.

R1

WT



NLRP3^{-/-}

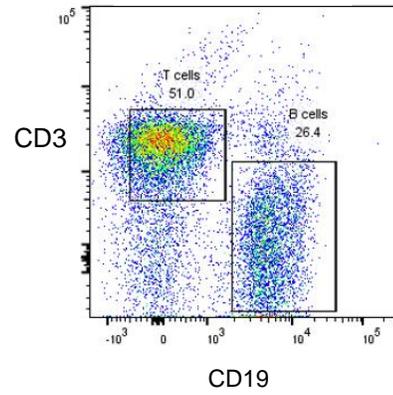
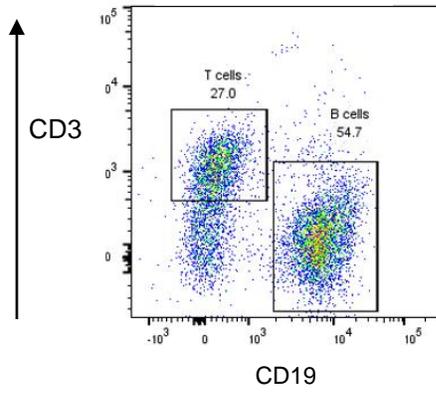


Figura 6 a)

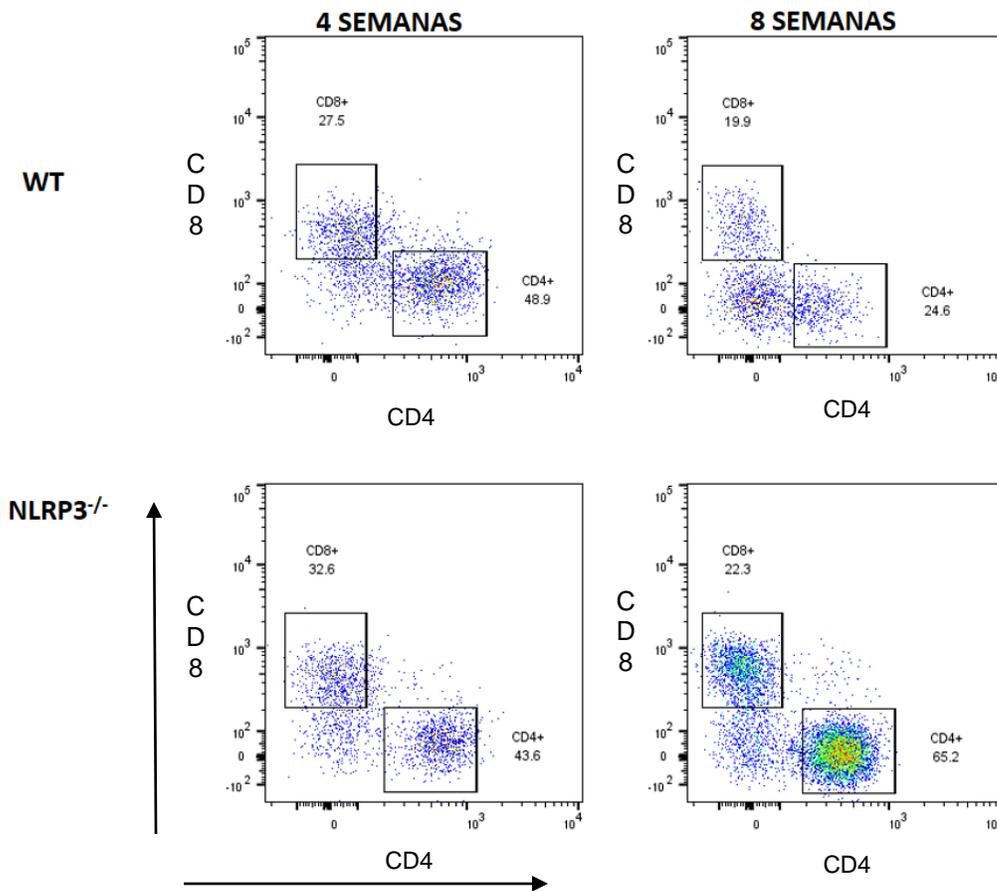


FIGURA 6 b)

FIGURA 6. A) Ampliación de la figura 5 en la R1 perteneciente a la zona de linfocitos. En la semana 4 no se observan diferencias de linfocitos T y B entre los grupos experimentales. En cambio, a la octava semana de infección los ratones WT no aumentan su porcentaje de Linfocitos T y disminuyen en un 9% los linfocitos B, contrario a los ratones experimentales que duplican su porcentaje inicial de linfocitos T mientras que, los linfocitos B bajan de un 54.7% hasta un 26.4%. **B)** En la semana 8 de infección, los ratones WT disminuyen sus linfocitos T cooperadores y citotóxicos comparados con la semana 4. Los ratones disminuyen sólo en un 10% sus linfocitos CD8+ pero aumentan de manera significativa sus linfocitos CD4+, presentando 65.2%, lo anterior a la octava semana de infección.

En la figura 7 se presenta la ampliación de la zona 2 (R2) perteneciente a los granulocitos. Observamos el porcentaje de eosinófilos presentes en la cavidad peritoneal, importantes en la defensa contra infecciones parasitarias.

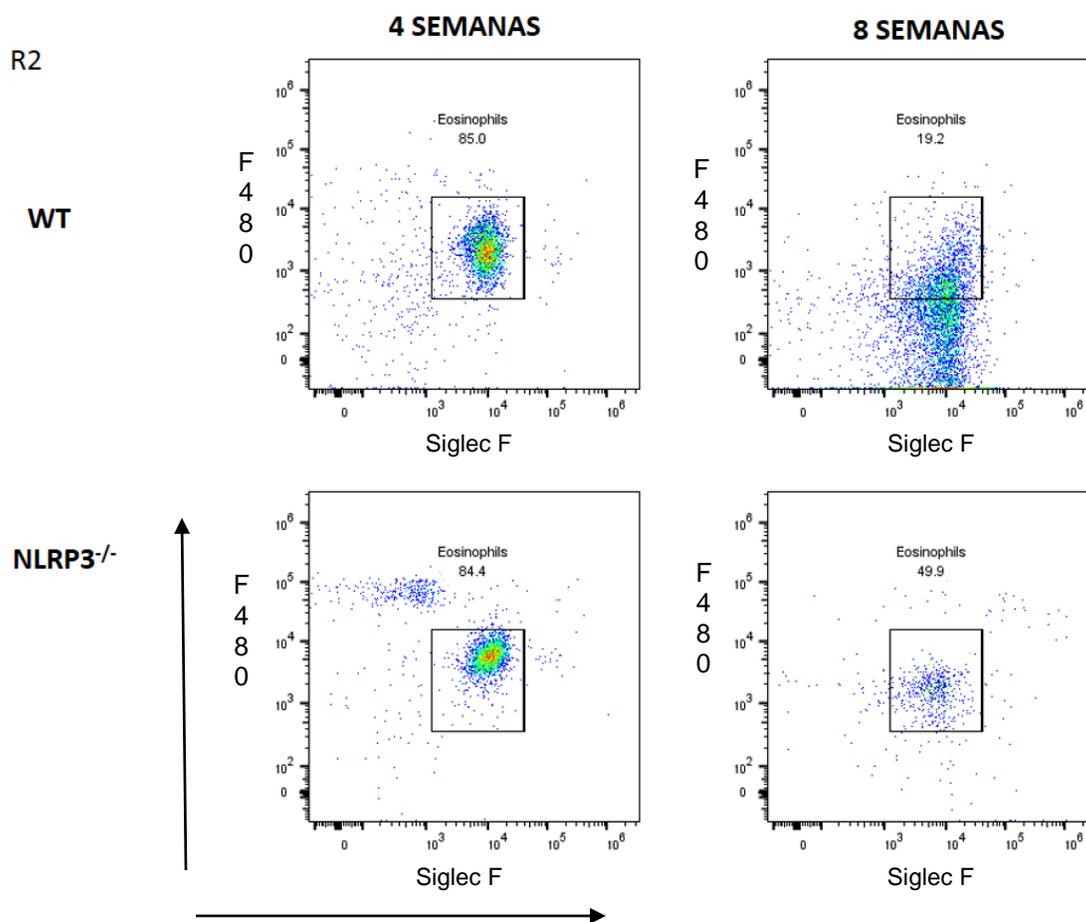


FIGURA 7. Porcentaje de eosinófilos presentes en cavidad peritoneal. En la semana 4, los ratones WT y NLRP3^{-/-} presentan un porcentaje similar de eosinófilos de 85% y 84% respectivamente. Las diferencias ocurren en la semana 8, ya que los ratones WT bajan de manera significativa su porcentaje de granulocitos hasta un 19% y los ratones resistentes sólo bajan hasta presentar 49.9%.

En la zona 3 de la Figura 5 (R3), es posible localizar a los monocitos en la figura 7 se observa el porcentaje de macrófagos que albergan en la cavidad peritoneal de los ratones experimentales.

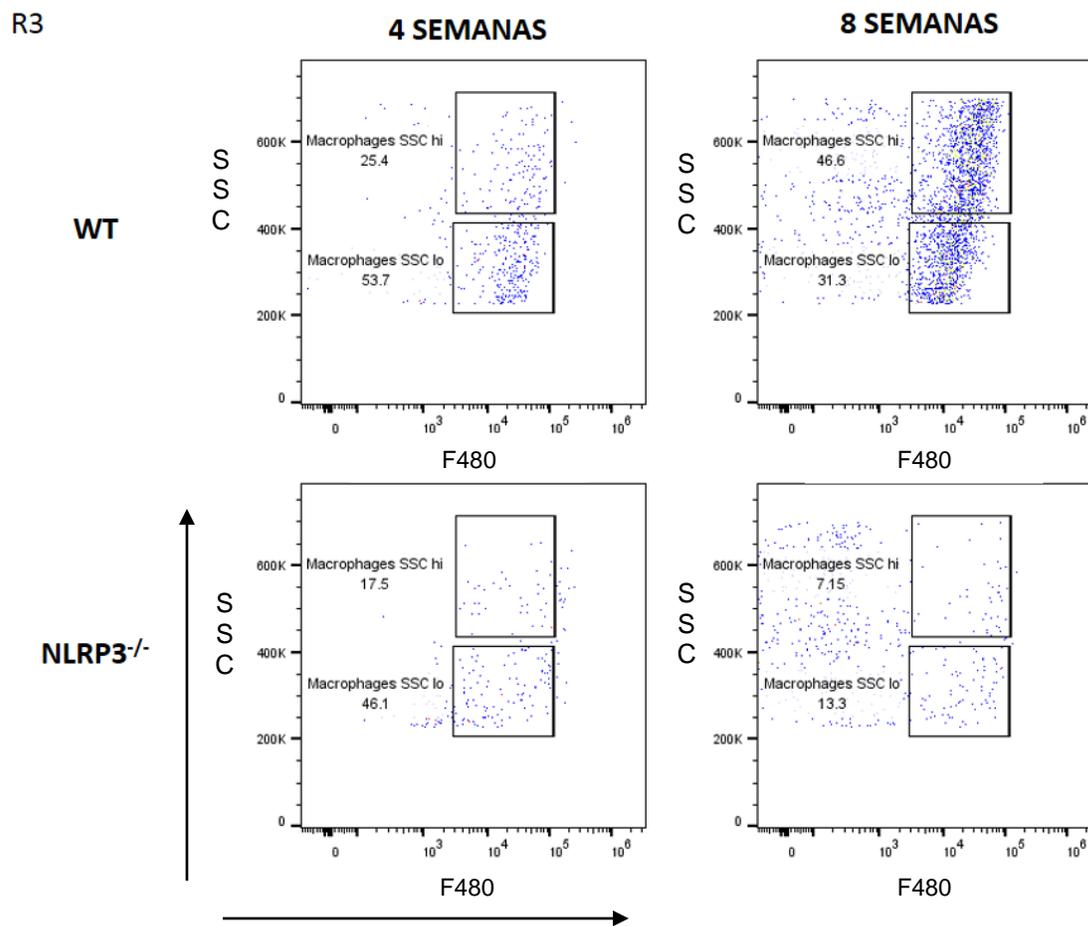
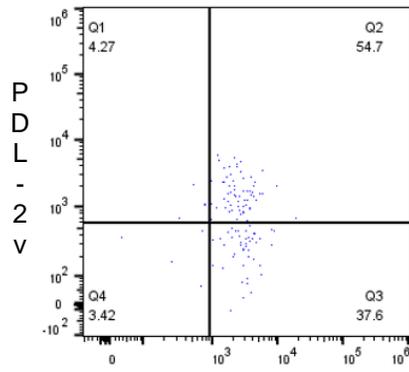


FIGURA 8 a)

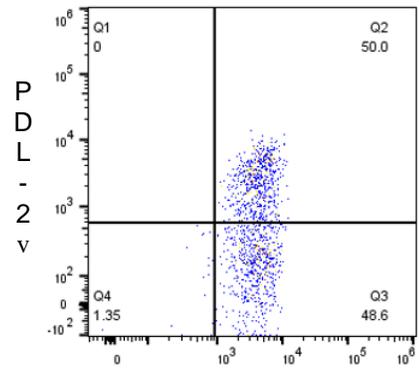
Macrófagos SSC hi

WT

4 SEMANAS



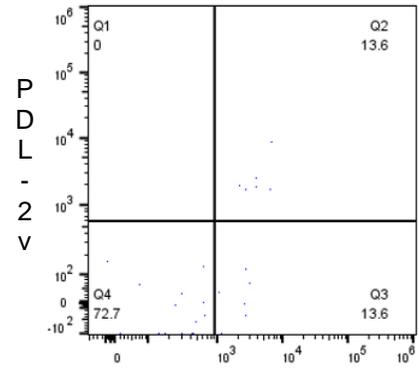
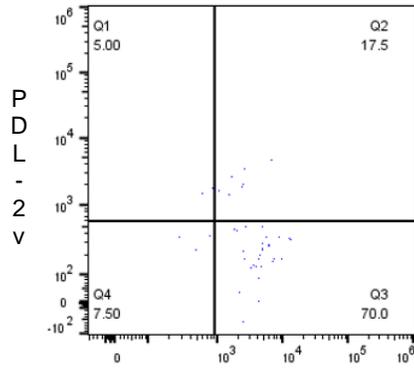
8 SEMANAS



PDL-1

PDL-1

NLRP3^{-/-}



PDL-1

PDL-1

FIGURA 8 b)

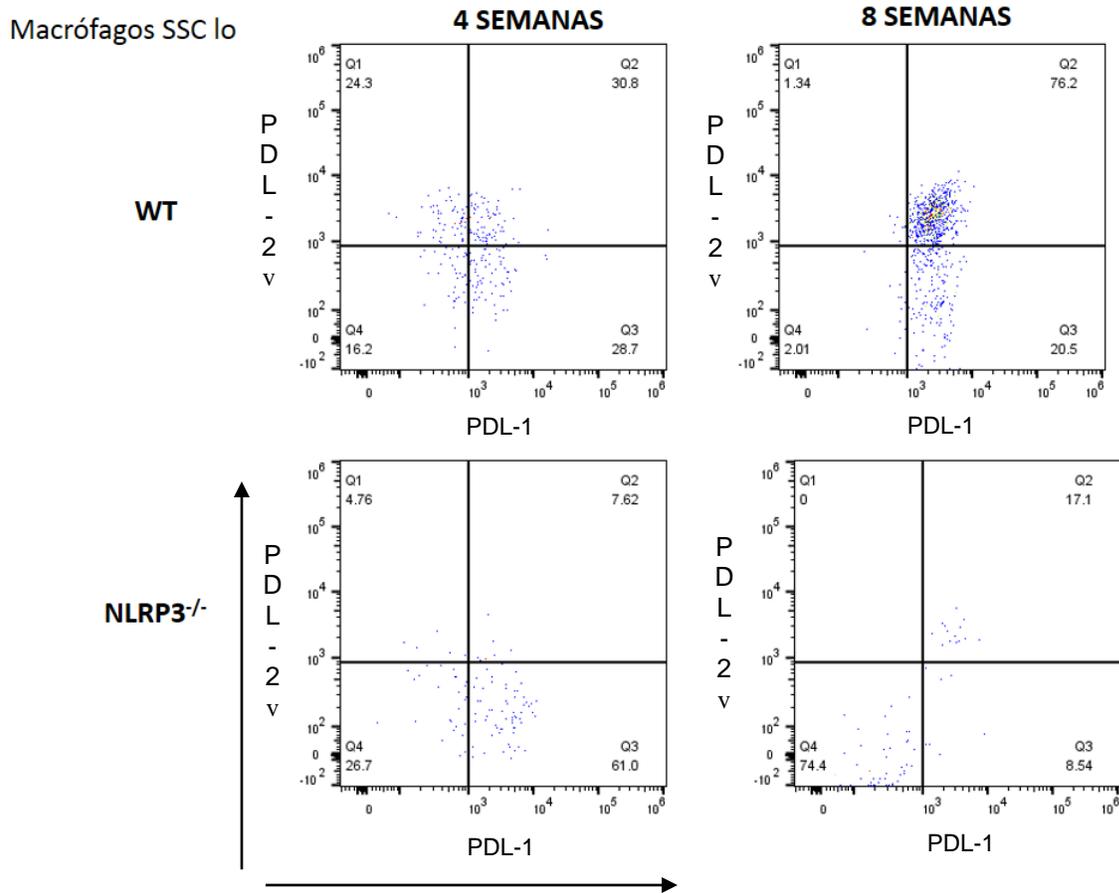


FIGURA 8 c)

FIGURA 8. A) A la semana 4 los ratones WT presentan el doble de macrófagos que los ratones NLRP3^{-/-}. En la semana ocho se observa un número abundante de macrófagos en el grupo de ratones WT, sin embargo, los ratones resistentes no infiltran macrófagos supresores desde la semana 4. **B)** Los ratones WT presentan macrófagos de alta densidad positivos para PDL2 y positivos para CD19, caso contrario a los ratones resistentes que presentan un muy bajo número de macrófagos. **C)** En el caso de los macrófagos de baja densidad, los ratones NLRP3^{-/-} nuevamente presentan tan pocas células positivas para PDL2, que es notorio la respuesta de los ratones WT a la octava semana de infección.

8.4 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS POR TÉCNICA DE ELISA

8.4.1 CITOCINAS EN BAZO

Tal y como se detalló en el apartado de materiales y métodos, se extrajo el bazo de ratones WT y NLRP3^{-/-} a la semana 4 y 8 post infección. Se obtuvieron las células totales de el órgano y se estimularon con ConA para obtener un sobrenadante por el cual se determinó la proliferación de de citocinas como IL-1 β , IL-4 e IL-15. Los ratones NLRP3^{-/-} presentaron niveles de IL-4 por debajo de los ratones WT en la semana 4 y 8 de infección. También se observó que los ratones NLRP3^{-/-} a la octava semana de infección presentan los niveles más alto de la citocina IL-15, incluso se observa que los ratones resistentes son capaces de producir IL-1 β aún cuando no puede llevarse a cabo el ensamblaje del inflammasoma NLRP3.

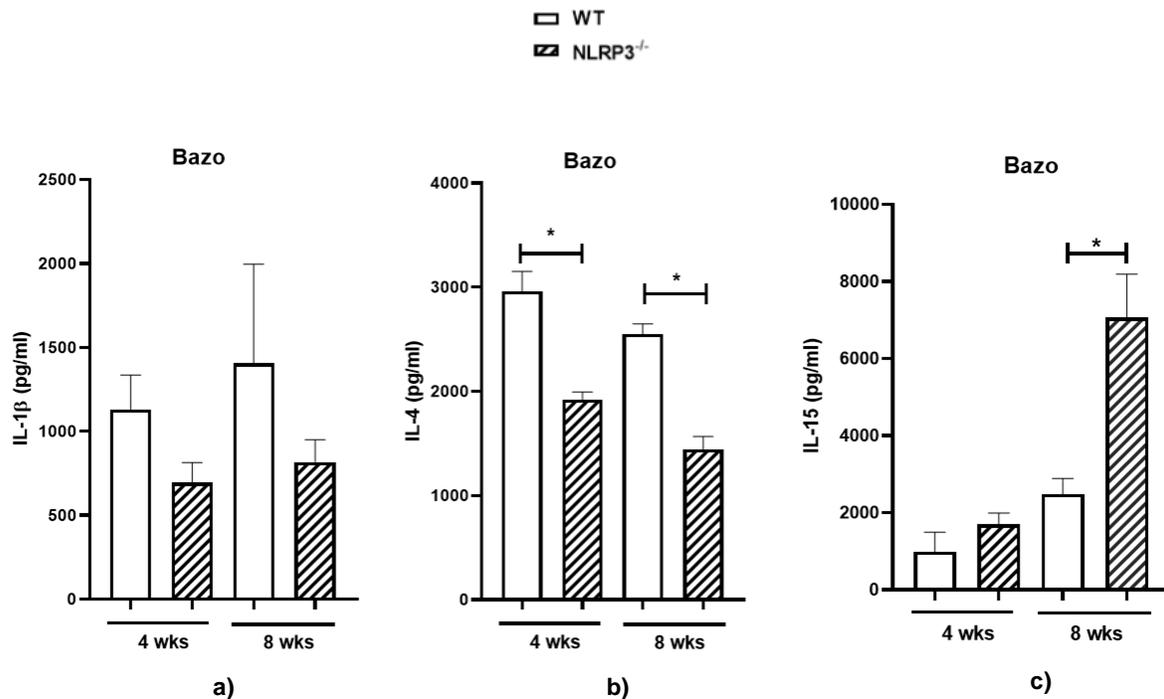


FIGURA 9. Niveles de citocinas en sobrenadante de cultivo de células totales de bazo estimuladas con Concanavalina A. **A)** La proliferación de la citosina IL-1 β aumenta conforme la parasitemia avanza y se observa que no hay diferencias significativas entre los grupos de ratones, sin embargo, los ratones NLRP3^{-/-} están por debajo de los ratones WT. Los valores graficados son el promedio de 4 ratones por grupo que representan 4 experimentos independientes. **B)** La proliferación de la citosina IL-4 es mayor en ratones WT que en ratones NLRP3^{-/-}, aunque en ambos casos la proliferación se reduce a la octava

semana de infección. *p 0000 C) En cuanto a la citosina IL-15, se observa que los ratones WT no presentan altos niveles de segregación en la cuarta semana e incluso no aumentan de manera significativa para la octava. Contrario a los ratones resistentes a la parasitemia que se observan altos niveles de IL-15, sobre todo en la última semana del modelo experimental con *T. crassiceps*. *p 000

8.4.2 CITOCINAS EN SUERO SANGUÍNEO

Tres la obtención de muestras de suero sanguíneo se realizó la prueba ELISA para detectar las citocinas IL-1 β , IL-4 e IL-15. Es posible observar que la producción de citocina IL-4 a la cuarta y octava semana de infección por *Taenia crassiceps* es igual a los niveles presentes en el bazo. Los niveles de IL-15 en suero sanguíneo decaen en ambos grupos de ratones al pasar de las semanas. Para IL-1 β se observa que los ratones WT presentan una elevada producción de la citocina a la semana 8, mientras que los niveles de los ratones resistentes se mantienen parecidos en ambas semanas.

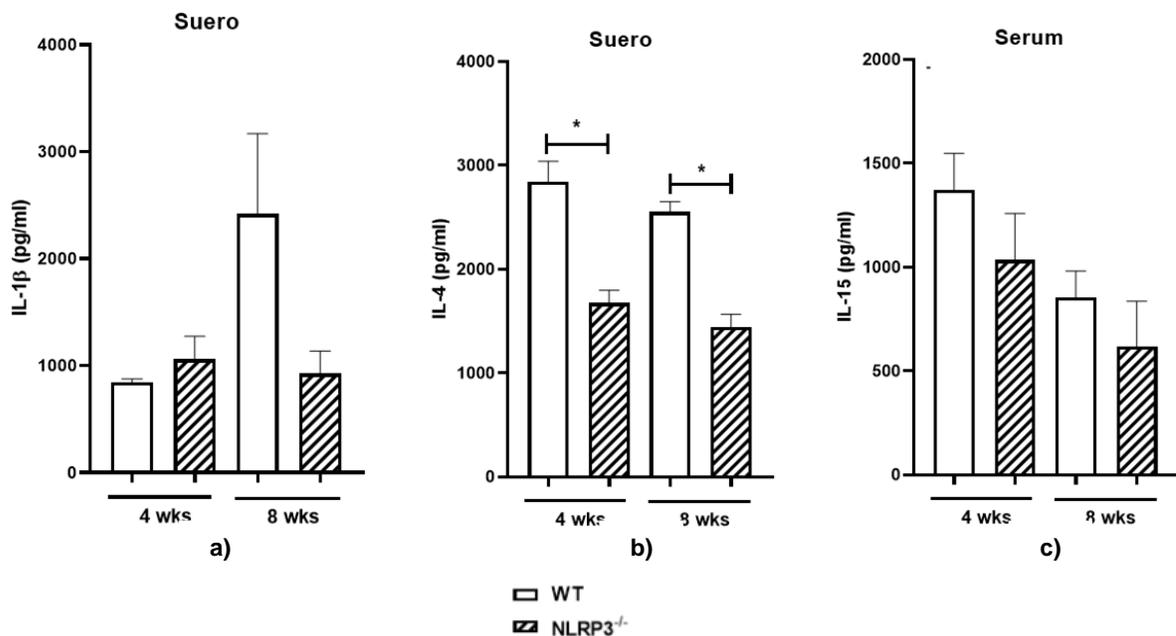


FIGURA 10. Niveles de citocinas en suero sanguíneo a la cuarta y octava semana de infección por *Taenia crassiceps*. **A)** En la semana cuatro es posible observar que los ratones NLRP3^{-/-} presentan niveles de IL-1 β mayores a WT, sin embargo, no hay diferencias significativas hasta la semana 8, que es cuando

los ratones WT sobresalen con la producción de la citosina pro inflamatoria mientras que NLRP3^{-/-} reduce sus niveles de IL-1 β . **B)** Los ratones WT presentan los niveles más altos de la citosina IL-4, mientras que los ratones NLRP3^{-/-} se mantienen por debajo de ese nivel. Estos resultados son parecidos a los presentados a la Figura 9 a **C)** Contrario a los niveles de IL-15 presentes en células totales de bazo, en suero sanguíneo observamos que los ratones WT son los que sobresalen con la proliferación de la citosina a la semana 4 e incluso a la octava semana. En ambos grupos se observa que la proliferación va en decremento a través de las semanas.

8.5 PCR DE MACRÓFAGOS EN MÉDULA ÓSEA

Con el fin de determinar si existía una regulación de marcadores de activación alternativa que permitiera el establecimiento del cestodo *Taenia crassiceps*, se recolectó la médula ósea de ratones sanos C57 y NLRP3^{-/-} para realizar un cultivo celular. Se adicionó M-CSF para la diferenciación de macrófagos y de la misma manera en la que se describe en materiales y métodos, las muestras se inocularon con antígeno de *T. crassiceps*, IL-4 y una combinación de estos mismos. Se recolectó el sobrenadante a las 24 y 48 horas de incubación para poder extraer el RNA y convertirlo en cDNA. La figura 7 muestra los resultados donde se observa que los ratones NLRP3^{-/-} tienen una baja expresión tanto de PDL1 como de PDL2. Para el caso de la proteína ATG16L1 y RELM en los sobrenadantes de 24 horas se expresan tanto en ratones WT y NLRP3^{-/-} con el antígeno del helminto, IL-4 y a combinación de estos dos, sin embargo, para las 48 horas no es el mismo caso, ya que los ratones NLRP3^{-/-} no expresan estos dos marcadores y los ratones WT sólo los expresan con la combinación de antígenos e IL-4. B-actina se utilizó como gen de expresión constitutiva.

Adicional, se midió la expresión de los componentes del inflammasoma NLRP3, de lo cual es posible observar una expresión sostenida de caspasa-1 a las 24 y 48 horas para ambos grupos de ratones, caso contrario para IL-1 β ya que no hay expresión en ratones WT y NLRP3^{-/-} en ninguno de los dos tiempos. También es posible observar que la proteína NLRP3 sólo se expresa a las 24 horas y en pocas cantidades.

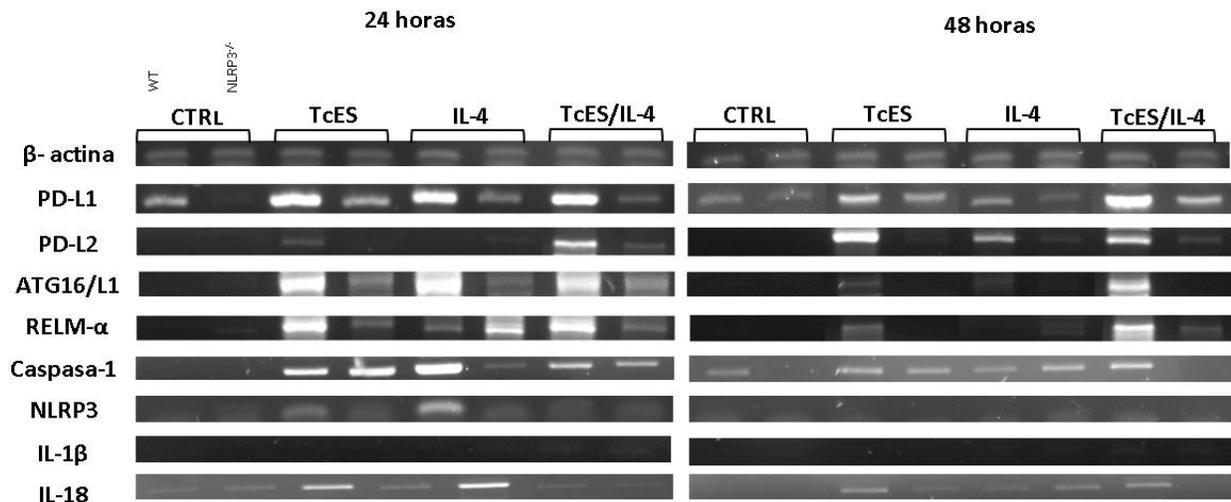


FIGURA 11. Electroforesis de fragmentos amplificados por el método de PCR en macrófagos de médula ósea para el análisis de expresión de marcadores de activación alternativa (Relm, PD-L1, PD-L2), la proteína NLRP3 y productos secretados por el inflammasoma NLRP3 como caspasa-1, IL-1 β e IL-18 y ATG16L1 como posible regulador de IL-1 β , en gel de agarosa al 1.5%. β -actina se utilizó como gen constitutivo. Los ratones NLRP3^{-/-} no expresan grandes cantidades del marcador PD-L1 y no expresan el marcador PD-L2 si no es con la combinación de antígeno de *T. crassieps* e IL-4. El marcador RELM y ATG16L1 en ratones WT se expresan en gran cantidad a las 24 horas y menos cantidad para las 48 horas, caso contrario para los ratones NLRP3^{-/-} que sólo lo expresan a las 24 horas.

8.6 CITOMETRIA DE FLUJO DE RATONES INYECTADOS CON TcES/IL-4

Como se detalla en materiales y métodos, se inyectaron i.p. ratones con una combinación de TcEs e IL-4, para después de 72 horas recolectar las células presentes en cavidad peritoneal. Esto se realizó con el objetivo de esclarecer los resultados obtenidos en el análisis de transcritos en macrófagos derivados de médula ósea con respecto a PD-L1 y PDL-2. Los resultados se observan en la Figura 12 a) donde esta señalizada la región de los monocitos (R1), no se observan diferencias significativas en el aumento de células entre grupo experimental y grupo control. Iosen cuanto al porcentaje de

macrófagos con PD-L1 y PD-L2 (figura 12 b) no encontramos diferencias entre grupos. Sin embargo, observamos que los macrófagos reclutados presentan un cambio en su complejidad. Interesantemente, los ratones WT no aumentan su porcentaje de células a pesar del estímulo de TcES/IL-4, pues el porcentaje es el mismo que los ratones NLRP3^{-/-}. Por otro lado, Observamos que los macrófagos reclutados únicamente expresan el ligando 1 (PDL1) del receptor PD-1, pero no el ligando 2 (PDL2), a diferencia de los macrófagos de médula ósea en donde se observa la expresión de PDL2 a las 24 y 48 hr. El análisis de citometría mostro que hay un aumento sustancial en las células reclutadas en respuesta a la combinación de estímulos (TcES/IL-4) comparado con la población de células residentes en los ratones no inyectados. Sin embargo, no hubo diferencias en cuanto al porcentaje de macrófagos PDL1+ entre ratones WT y ratones NLRP3^{-/-}.

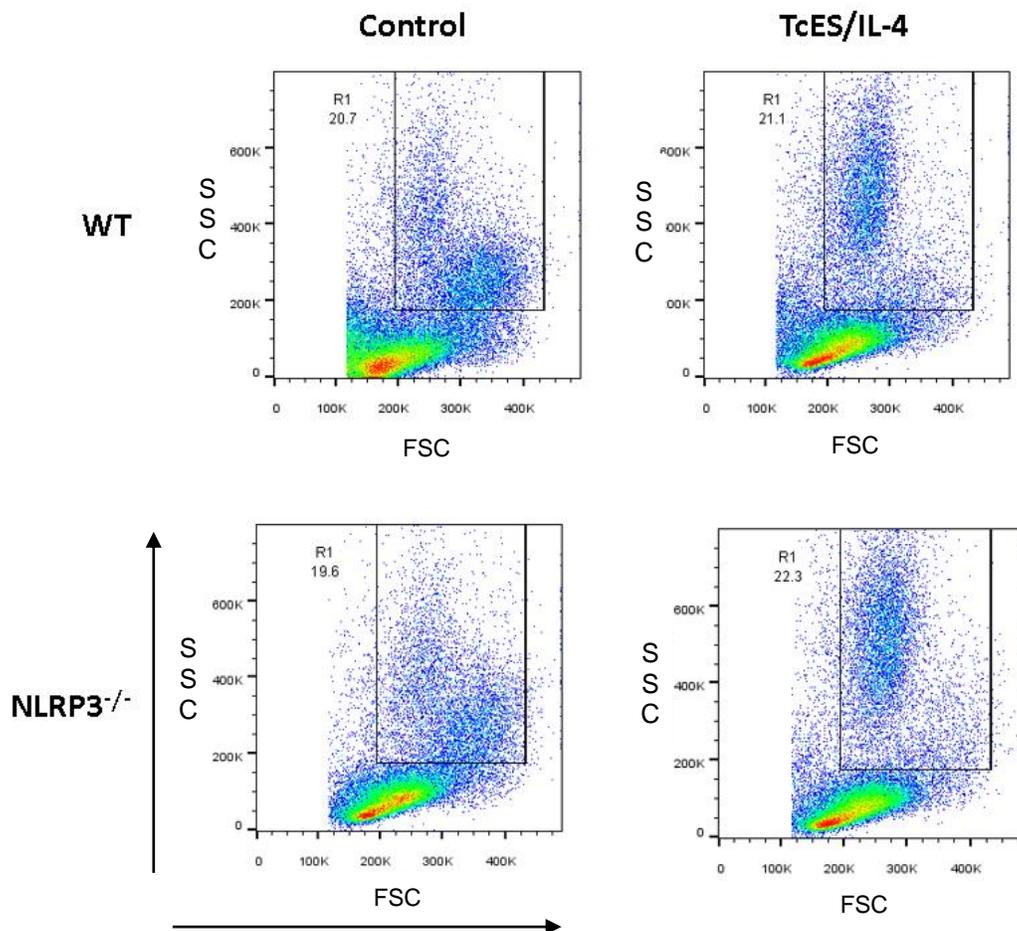


FIGURA 12 a)

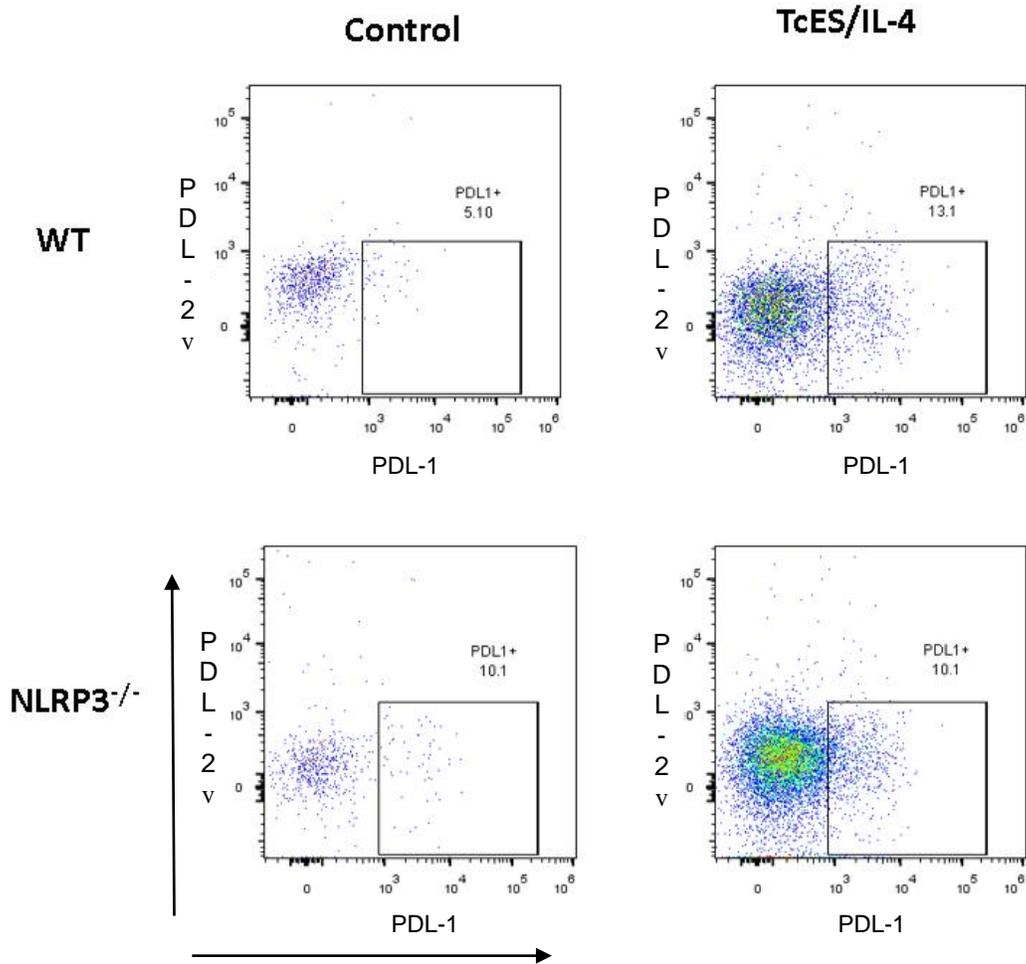


FIGURA 12 b)

FIGURA 12. A) Citometría de flujo de células alojadas en la cavidad peritoneal tras un estímulo i.p. de TcEs/IL-4, No hay diferencias significativas entre grupos. B) Los ratones NLRP3^{-/-} no presentan aumentan de macrófagos con PD-L1 y PD-L2.

9. DISCUSIÓN

El papel de los inflamasomas contra algunas infecciones parasitarias no es del todo claro, falta conocer de qué manera este receptor regula el establecimiento de este tipo de organismos. Con el objetivo de incrementar el conocimiento acerca de la participación del inflamasoma NLRP3 en infecciones causadas por cestodos, utilizamos el modelo de infección con *Taenia crassiceps*, en el que se sabe que la respuesta que genera el sistema inmune adaptativo contra parásitos helmintos va hacia un perfil del tipo Th2, caracterizada por la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13.

Después de haber infectado i.p con 20 metacestodos de *Taenia crassiceps* tanto a ratones WT así como ratones NLRP3^{-/-}, se dio seguimiento a la parasitemia durante 8 semanas. Se realizó el sacrificio de los animales a la semana 4 y 8 para el conteo de parásitos y recolección de líquido peritoneal y obtención del bazo.

Los resultados obtenidos mostraron que los ratones NLRP3^{-/-} son altamente resistentes al helminto *T. crassiceps*. Adicional, en los resultados presentados en la figura 8 y figura 11, se encontró que los ratones NLRP3^{-/-} presentan un porcentaje significativamente reducido de macrófagos supresores, es decir, macrófagos con PDL1 y PDL2 en la membrana celular. Se sabe que estas moléculas actúan como “freno” para controlar ciertas respuestas inmunitarias del cuerpo, cuando se unen a su receptor PD-1 no permite que las células T proliferen. De igual manera, PD-L2 es un ligando del receptor del *checkpoint* de control inmunitario PD1 que desempeñan una regulación negativa de la activación de Linfocitos T; se ha demostrado que el bloqueo de esta proteína exacerba la encefalomiелitis autoinmune experimental (Zhang, *et. al.*, 2006).

En 2005 Terrazas y colaboradores reportaron que existe una sobreexpresión de varios marcadores en macrófagos, el principal de estos fue PD-L1 y PD-L2. Por ello, bloquearon los ligandos de muerte programada 1 y 2 al igual que su receptor PD-1, observaron que se eliminó la capacidad para inhibir la proliferación de linfocitos T y se restableció la capacidad de proliferación de esplenocitos en respuesta a los antígenos del parásito. Además, los macrófagos inducidos por *Taenia* pudieron suprimir una reacción mixta de linfocitos de una manera dependiente a PD-1. Con este trabajo con-

cluyeron que la infección por *T. crassiceps* induce macrófagos alternativamente activados con una fuerte actividad supresora que implica la vía de PD-1/PD-L.

Como parte del trabajo de investigación, se midieron los niveles de citocinas como IL-1 β , IL-4 e IL-15, tal como se muestra en la figura 9 y 10. Se sabe que IL-4 tiene su origen en los linfocitos T que ha sido activados y actúa de manera que pueda promover la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B, además de intervenir de forma decisiva en la inducción de las células Th2. En este trabajo es posible observar que existe una disminución de células B y a su vez de la IL-4, fenómeno que Ccama y colaboradores reportaron en 2003, pues observaron que la disminución de CD4+ ocurría durante la fase aguda en cerdos infectados con huevos de *Taenia solium*, esto porque podría existir alguna clase de depresión inmune o un cambio a una respuesta celular. De igual manera, Ostroky y colaboradores (1996) observaron en pacientes con neurocisticercosis la citocina IL-4 se presentaba en niveles relativamente bajos (10%).

Dann y colaboradores (2005) demostraron que la citocina IL-15 en humanos tiene un papel fundamental en la activación de las células Natural Killer (NK) para remover al protozoario *Cryptosporidium sp.* en una infección intestinal. En 2018 Burrack y colaboradores observaron que el complejo IL-15 promovía un efecto protector a ratones WTB/6 contra malaria cerebral provoca por el parásito *Plasmodium sp.* En los resultados se muestra que los ratones NLRP3^{-/-} a la octava semana de infección no presentaron parásitos intraperitoneales, en cambio, sí se llegaron a encontrar restos del tegumento de los helmintos. Ahora bien, los ratones presentaron altos niveles de IL-15 a la semana 8 en bazo y pocos niveles en suero sanguíneo, estos resultados concuerdan con el tiempo estimado que tardan en expulsar al parásito de su organismo, lo que podemos asociar a que se está segregando la citocina cerca del área peritoneal que es donde se aloja el parásito y que la primera defensa que ayuda a controlar la parasitemia son las células T citotóxicas como las NKs.

La activación del inflamasoma tiene como resultado la liberación de citocinas pro inflamatorias como IL-1 β e IL-18. Observamos que los ratones NLRP3^{-/-} producen niveles reducidos de la citocina IL-1 β , sin embargo, en la figura 9 y 10 se observa su pre-

sencia en bazo y en suero sanguíneo. Los ratones resistentes no sobrepasaron los niveles de los ratones WT, excepto a la semana 4 y en suero sanguíneo. Esto nos hizo pensar en vías alternas que ayudaran a la liberación de la interleucina. Harris y colaboradores (2011) describieron un papel para la autofagia en la regulación de la producción de IL-1 β en células presentadoras de antígeno. Para lograr esto, después de realizar un tratamiento en macrófagos con ligandos del receptor tipo Toll (TLRs), pro IL-1 β se secuestró específicamente en los autofagosomas, mientras que la activación adicional de la autofagia con rapamicina indujo la degradación de la pro IL-1 β y bloqueó la secreción de la citocina madura. La inhibición de la autofagia promovió el procesamiento y la secreción de IL-1 β por parte de las células presentadoras de antígenos de manera dependiente de NLRP3 y TRIF. Estos datos demuestran que la autofagia controla la producción de IL-1 β a través de al menos dos mecanismos separados: apuntando a pro-IL-1 β para la degradación lisosomal y regulando la activación del inflamasoma NLRP3. Kumar & Lukens (2019) también se interesaron en entender cómo NLRP3 modula la inducción de autofagia durante una infección por parásitos y cómo esto podría dar cierta protección al hospedador a futuras infecciones. En un modelo experimental con *T. cruzi* concluyendo que el sensor de inflamasomas NLRP3 puede también alterar el flujo autofágico y que esto ayuda en la eliminación de *T. cruzi* desde los macrófagos. Para esclarecer las preguntas que surgieron, se utilizó el marcador ATG16L1 (figura 11) ya que, es una proteína asociada a la autofagia. Los resultados mostraron que los ratones NLRP3^{-/-} son capaces de llevar a cabo procesos autofágicos a las 24 horas de estar en contacto con antígeno segregado de *T. crassiceps*, IL-4 y la combinación de la interleucina y el antígeno. Y a las 48 horas suceden en menor cantidad.

Con estos datos, se encontró que otro regulador de IL-1 β es el factor inhibidor de la migración de macrófagos también conocido como MIF, responsable de ejercer múltiples efectos sobre células inmunitarias y promover la inflamación a través de la inducción de citosinas de la familia TNF, IL-1 e IL-6. En 2018, Lang y colaboradores mostraron que la inhibición de MIF regula la liberación de IL-1 α , IL-1 β e IL-18, a través de la activación del inflamasoma NLRP3. Se requiere MIF para la interacción entre NLRP3 y la

proteína de filamento intermedio vimentina, que es fundamental para la activación de NLRP3. Además, demostraron que MIF interactúa con NLRP3, lo que indica un papel para MIF en la activación del inflamasoma independientemente de su papel como citocina. Estos datos ayudan a entender cómo MIF regula la inflamación y lo identifican como un factor crítico para la activación del inflamasoma NLRP3, ampliando la posibilidad para estudiar el papel de MIF en cuanto a la parasitemia por *Taenia crassiceps*.

10. CONCLUSIONES

- El cestodo *T. crassiceps* requiere de la presencia del receptor NLRP3 para establecerse en la cavidad peritoneal de los ratones.
- En la ausencia de NLRP3 los ratones no presentan macrófagos supresores, mientras que se encuentra un número abundante de Linfocitos T.
- Los ratones resistentes a la infección por *T. crassiceps* presentan altos niveles de IL-15
- Los resultados de los experimentos *in vitro*, sugieren que la proteína ATG16L1 es parte del programa de activación alternativa de los macrófagos.
- El experimento *in vitro*, sugiere que *Taenia crassiceps* induce componentes del inflamasoma de manera no canónica.
- La inducción de los ligandos del receptor PDL1 es modulada por NLRP3, sin embargo, depende de la fuente de macrófagos y el microambiente en el que se presenten los estímulos.

11. REFERENCIAS.

Abais, J.M., Xia, M., Zhang, Y., Boini, K.M., & Li, P.L., (2015). Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? . *Antioxidants & Redox Signaling*, 22 (13): 1111-1129. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5994>

Adalid-Peralta, L., Arce-Sillas, A., Fragoso, G., Cárdenas, G., Rosetti, M., Casanova-Hernández, D., Rangel-Escareño, C., Uribe-Figueroa, L., Fleury, A., & Sciotto, E. (2013). Cysticerci drive dendritic cells to promote in vitro and in vivo Tregs differentiation. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 981468. <https://doi.org/10.1155/2013/981468>

Alhallaf, R., Agha, Z., Miller, C., Smith, N., Loukas, A. & Giacomini, P. (2018). The NLRP3 Inflammasome Suppresses Protective Immunity to Gastrointestinal Helminth Infection. *Cells Report*, 23;24(4) 1085-98. [https://www.cell.com/cell-reports/pdfExtended/S2211-1247\(18\)30473-X](https://www.cell.com/cell-reports/pdfExtended/S2211-1247(18)30473-X)

Behnke, J. M., Barnard, C. J., & Wakelin, D. (1992). Understanding chronic nematode infections: evolutionary considerations, current hypotheses and the way forward. *International journal for parasitology*, 22(7), 861–907. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90046-n](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90046-n)

Brys, L., Beschin, A., Raes, G., Hassanzadesh, G., Noël, W., Brand, Brombacher, F. & De Baetselier, P. (2015). Reactive Oxygen Species and 12/15-Lipoxygenase Contribute to the Antiproliferative Capacity of Alternatively Activated Myeloid Cells Elicited during Helminth Infection. *The Journal of Immunology* 174(10):6095-104. DOI:10.4049/jimmunol.174.10.6095

Burrack, K. S., Huggins, M. A., Taras, E., Dougherty, P., Henzler, C. M., Yang, R., Alter, S., Jeng, E. K., Wong, H. C., Felices, M., Cichocki, F., Miller, J. S., Hart, G. T., Johnson, A. J., Jameson, S. C., & Hamilton, S. E. (2018). Interleukin-15 Complex Treatment Protects Mice from Cerebral Malaria by Inducing Interleukin-10-Producing Natural Killer Cells. *Immunity*, 48(4), 760–772.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.012>

Caballero-Soto, L., (1998). Inmunología de los helmintos. *Rev. Esp. Alergol Inmunol Clin*. 13 (6), 297-313.

Cardozo, G. & Samudio, M. (2017). Factores predisponentes y consecuencias de la parasitosis intestinal en escolares paraguayos. *Pediatr*, 44 (2): 117-125.

Casson, C., Copenhaver, A., Zwack, E., Nguyen, H., Strowig, T., Javdan, B., Bradley, W., Fung, T., Flavell, R., Brodsky, I., & Shin, S., (2013). Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol. *PLoS Pathog*, 9 (6): 1-16.

Castañeda, M. (2016). Identificación de los productos de excreción y secreción del cisticero de *Taenia crassiceps* que inducen células T reguladoras [Tesis de Licenciatura.]. Universidad Ricardo Palma, Facultad de Ciencias Biológicas.

Ccama, Alberto, Gonzalez, Armando, Falcon, Néstor, & Bernal, Teresa. (2003). Persistencia de anticuerpos maternos contra cisticercosis porcina y su efecto en la interpretación de resultados del EITB. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 14(2), 140-144.

Celias, D. (2018). Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de antígenos de *Fasciola hepatica*: Aplicación en la inducción de mecanismos de protección [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional de Córdoba Argentina, Departamento de Bioquímica Clínica-Facultad de Ciencias Químicas.

Chen, J., & Chen, Z.J. (2013). Regulation of NF-kappaB by ubiquitination. *Curr Opin Immunol*, 25 (1): 4-12.

Damian R. T. (1987). Molecular mimicry revisited. *Parasitology today (Personal ed.)*, 3(9), 263-266. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(87\)90102-5](https://doi.org/10.1016/0169-4758(87)90102-5)

Dann, S. M., Wang, H. C., Gambarin, K. J., Actor, J. K., Robinson, P., Lewis, D. E., Caillat-Zucman, S., & White, A. C., Jr (2005). Interleukin-15 activates human natural killer cells to clear the intestinal protozoan cryptosporidium. *The Journal of infectious diseases*, 192(7), 1294-1302. <https://doi.org/10.1086/444393>

D'Elia, R., Behnke, J. M., Bradley, J. E., & Else, K. J. (2009). Regulatory T cells: a role in the control of helminth-driven intestinal pathology and worm survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(4), 2340-2348. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802767>

Dissanayake, S., Khan, N., Shahin, A., Wijesinghe, S., & Lukic, M. (2002). Induction of immunoglobulin G1, interleukin-6 and interleukin-10 by *Taenia crassiceps* metacystode carbohydrates. *Immunology*, 107(4), 411-419. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01519.x>

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moore, K. J., Wright, S. D., Hornung, V., & Latz, E. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464(7293), 1357-1361. <https://doi.org/10.1038/nature08938>

Dzik, J. (2006). Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochim*, 53 (1): 33-64.

Echeverri, D., Fontanilla, M. & Buitrago, L. (2004). El macrófago en enfermedad vascular ¿El enemigo oculto?. *Rev. Col. Cardiología*, 11 (3), 164-173.

Erb, K., (2007). Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand?. *Eur J Immunol*, 37 (5): 1170-1173. <https://doi.org/10.1002/eji.200737314>

Fernández-Rodríguez, R., González-Fernández, C., & Guitián, J. (2017). Neurocisticercosis: una enfermedad que no debemos olvidar. *Galicia Clínica, Sociedad Galega de Medicina Interna*, 78 (3): 116-122.

Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D., & Anderton, S. M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature immunology*, 3(10), 944–950. <https://doi.org/10.1038/ni833>

Fonte-Galindo, L., Baldriche-Acosta, J., Sarracent-Pérez, J., Hernández-Barrios, Y., & Fong-González, A. (2016). Regulación por helmintos de las respuestas inmunitarias del hospedero. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(1).

Galindo, L., Baldriche, J., Sarracent, J., Hernández, Y., & Fong, A. (2016). Regulación por helmintos de las respuestas inmunitarias del hospedero. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(1). Recuperado de <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/122/106>

Galliussi, G. (2015). Mecanismos antiinflamatorios de los nitroalquenos: Regulación del inflammasoma NLRP3. [Tesis de doctorado]. Universidad de la República, Facultad de Ciencias.c

García-Hernández, M. H., Alvarado-Sánchez, B., Calvo-Turrubiartes, M. Z., Salgado-Bustamante, M., Rodríguez-Pinal, C. Y., Gámez-López, L. R., González-Amaro, R., & Portales-Pérez, D. P. (2009). Regulatory T Cells in children with intestinal parasite infection. *Parasite immunology*, 31(10), 597–603. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01149>

Garg, S., Croft, A., & Bager, P. (2014). Helminth therapy (worms) for induction of remission in inflammatory bowel disease. *Cochrane database of Systematic Reviews*. Issue 1, Art no: CD009400. DOI: 10.1002/14651858.CD009400.pub2

Gurung, P., Karki, R., Vogel, P., Watanabe, M., Bix, M., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2015). An NLRP3 inflammasome-triggered Th2-biased adaptive immune response promotes leishmaniasis. *The Journal of clinical investigation*, 125(3), 1329–1338. <https://doi.org/10.1172/JCI79526>

Guzmán-Flores, J. & Portales-Pérez, D. (2013). Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). *Review. Gaceta Medica de México*. 149 (6), 630-638.

Haneklaus, M., O'Neill, L.A., & Coll, R.C., (2013). Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Curr Opin Immunol*; 25 (1): 40-45.

Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S., O'shea, A., Sharp, F., Lambe, E., Creagh, E., Golenbock, D., Tschopp, J., Kornfeld, H., Fitzgerald, K. & Lavelle, E. (2011). Autophagy Controls IL-1B Secretion by Targeting Pro-IL-1B for Degradation. *Journal of Biological Chemistry*; 286 (11), 9587-9597.

He, Y., Franchi, L., & Núñez, G. (2013). TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1 β production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 190(1), 334-339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202737>

Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., & Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology*, 9(8), 847-856. <https://doi.org/10.1038/ni.1631>

Instituto Nacional del Cáncer. (s. f.). Diccionario de cáncer del NCI. Instituto Nacional de Cáncer. Recuperado 10 de julio de 2022, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer>

Kahlenberg, J. M., & Dubyak, G. R. (2004). Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *American journal of physiology. Cell physiology*, 286(5), C1100-C1108. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00494.2003>

Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Van de Walle, L., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., Zhang, J., Lee, W., Rose, M., & Dixit, V. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 479: 117-121.

Kuang, P., Deng, H., Liu, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Sodium fluoride induces splenocyte autophagy via the mammalian targets of rapamycin (mTOR) signaling pathway in growing mice. *Aging*, 10(7), 1649-1665. <https://doi.org/10.18632/aging.101499>

Kumar, S., & Lukens, J. R. (2019). NLRP3 sets the table for a parasitic meal. *Journal of leukocyte biology*, 106(3), 505-507. <https://doi.org/10.1002/JLB.4CE0319-088R>

Lang, T., Lee, J., Elgass, K., Pinar, A., Tate, M., Aitken, E., Fan., H., Creed, S., Deen, N., Traore, D., Mueller, I., Stanistic, D., Baiwog, F., Skene, C., Wilce, M., Mansell, A., Morand, E. & Harris, J. (2018). Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation. *Natura Communications*, 9 (2223). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04581-2>

Latz, E., Xiao, T., & Stutz, A., (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Review Immunol*, 13 (6): 1-30.

Liu, W., Yin, Y., Zhou, Z., He, M., & Dai, Y. (2014). OxLDL-induced IL-1 beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production

leading to NLRP3 inflammasome activation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 63(1), 33–43. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0667-3>

Maillard, H., Marionneau, J., Prophette, B., Boyer, E., & Célerier, P. (1998). *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *AIDS (London, England)*, 12(12), 1551–1552. <https://doi.org/10.1097/00002030-199812000-00019>

Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-beta. *Mol Cell*, 10: 417-426.

McSorley, H. J., & Maizels, R. M. (2012). Helminth infections and host immune regulation. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 585–608. <https://doi.org/10.1128/CMR.05040-11>

Melgarejo Moreno , L. N. ., Suárez Velásquez , A. M. . & Fuentes Francia , A. L. . (2021). Rol del inflammasoma en la génesis del cáncer de cabeza y cuello. *Morfología*, 12(2). <https://revistas.unal.edu.co/index.php/morfologia/article/view/92689>

Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A. M., & Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(28), 11282–11287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117765109>

Ostoa, P., Esquivel, M., Ostoa, J., Bazúa, A., & Larralde, C. (2010). Budding of *Taenia crassiceps* cysticerci in vitro is promoted by crowding in addition to hormonal, stress and energy-related signals. *J Biomed Biotechnol*, 2010:1-5.

Ostrosky-Zeichner, L., García-Mendoza, E., Río, C. & Sotelo, J. (1996). Humoral and cellular immune response within the subarachnoid spaces of patients with neurocysticercosis. *Archives of Medical Research*. 1996 ;27(4):513-517. PMID: 8987187.

Pacheco-Fernández, T., Juárez-Avelar, I., Illescas, O., Terrazas, L. I., Hernández-Pando, R., Pérez-Plasencia, C., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Ávila-Moreno, F., Chirino, Y. I., Reyes, J. L., Maldonado, V., & Rodríguez-Sosa, M. (2019). Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes the Interaction between the Tumor, Macrophages, and T Cells to Regulate the Progression of Chemically Induced Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Mediators of inflammation*, 2019, 2056085. <https://doi.org/10.1155/2019/2056085>

Peón, A., Espinoza-Jiménez, A., & Terrazas, L. (2013). Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *BioMed research international*, 2013, 498583. <https://doi.org/10.1155/2013/498583>

Reyes, J. L., Espinoza-Jiménez, A. F., González, M. I., Verdin, L., & Terrazas, L. I. (2011). *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalo-

myelitis. Cellular immunology, 267(2), 77-87.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.11.006>

Reyes, J.L., (2011). Inmunoregulación por el céstodo *Taenia crassiceps* y su efecto sobre el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina.

Ruis, J. (2010) . Estudio de macrófagos alternativamente activados por *Taenia crassiceps* en coinfección por *Trypanosoma Cruzi* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional de la UNAM: https://repositorio.unam.mx/contenidos/estudio-de-macrofagos-alternativamente-activados-por-taenia-crassiceps-en-coinfeccion-por-trypanosoma-cruzi-462825?c=jMg17v&d=false&q=*&i=1&v=1&t=search_0&as=0

Ruiz-Monroy, N., López-Roblero, A., Nájera-Ocampo, M., Camacho-Vázquez, C., Arce-Sillas, A., Casanova-Hernández, C., 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 Neurociencia Mex; 18 (supl-1), 33.37.

Sawant D., Gravano D., Vogel P, G., Artis D. & Vignali D. (2014). Regulatory T cells limit induction of protective immunity and promote immune pathology following intestinal helminth infection. J Immunol. ;192(6):2904-12. DOI 10.4049/jimmunol.1202502

Silverman, W. R., de Rivero Vaccari, J. P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S. K., Scemes, E., Keane, R. W., & Dahl, G. (2009). The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. The Journal of biological chemistry, 284(27), 18143-18151. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004804>

Stempin, C. & Cerban, F. (2007). Macrófagos e inducción de arginase como mecanismo de evasión de parásitos.

Stutz, A., Kolbe, C. C., Stahl, R., Horvath, G. L., Franklin, B. S., van Ray, O., Brinkschulte, R., Geyer, M., Meissner, F., & Latz, E. (2017). NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. The Journal of experimental medicine, 214(6), 1725-1736. <https://doi.org/10.1084/jem.20160933>

Suárez, R., & Buelvas, N. (2015). El inflammasoma: mecanismos de activación. Investigación clínica, 56 (1): 74-99. <https://www.redalyc.org/pdf/3729/372937695009.pdf>

Swanson, K.V., Deng, M., & Ting, J.P. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nat Rev Immunol, 19; 477-489.

Tang, C. L., Lei, J. H., Wang, T., Lu, S. J., Guan, F., Liu, W. Q., & Li, Y. L. (2011). Effect of CD4+ CD25+ regulatory T cells on the immune evasion of *Schistosoma japonicum*.

nicum. *Parasitology research*, 108(2), 477–480. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2089-2>

Terrazas LI, Montero D, Terrazas CA, Reyes JL, Rodríguez-Sosa M. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol*. 2005 Nov;35(13):1349-58. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.06.003. Epub 2005 Jul 18. PMID: 16126211.

Terrazas, L., Montero, D., Terrazas, C., Reyes, J. & Rodríguez-Sosa, M. (2005). Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Inter Journal of Parasitology*; 35 (13), 1349-1359.

Veloz, A., (2000). Evaluación del efecto de la infección por cisticercos de *Taenia crassiceps* WFU en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica en ratonas Balb/c. [Tesis de doctorado]. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco.

Walsh, J., Muruve, DA., & Power, C., (2014). Inflammasomes in the CNS. *Nature Reviews Neurosciencie*. Online; 15:84.

Willms, K. & Zurabian, R. (2009). *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*, 137 (3): 335. doi:10.1017/s0031182009991442 10.1017/S0031182009991442

Zaiss, M., Maslowski K.M., Mosconi I., Guenat N., Marsland B., & Harris NL., (2013) IL-1beta suppresses innate IL-25 and IL-33 production and maintains helminth chronicity. *PLoS Pathog*. 9(8):e1003531.

Zakzuk, J. (2016) . Inmunorregulación inducida por helmintos: una actualización. *Iatreia*, 29 (2), 182-193. DOI: 10.17533/udea.iatreia.v29n2a07

Zaru, R. (2020). Receptores que reconocen patrones (PRRs) (Magadan, S., & Jouy en Josas, Trad). *British Society for Immunology*, consultado en Septiembre, 2022. Disponible en: <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/receptors-and-molecules/receptores-que-reconocen-patrones>

Zhang, Z., Meszaros, G., He, W. T., Xu, Y., de Fatima Magliarelli, H., Mailly, L., Mihlan, M., Liu, Y., Puig Gámez, M., Goginashvili, A., Pasquier, A., Bielska, O., Neven, B., Quartier, P., Aebersold, R., Baumert, T. F., Georgel, P., Han, J., & Ricci, R. (2017). Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of experimental medicine*, 214(9), 2671–2693. <https://doi.org/10.1084/jem.20162040>

12. APÉNDICE 1.

➤ **Buffer de solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS)**

Para 10L y pH 7.4

80 g NaCl (J.T. Baker)

11.6 g Na₂PO₄ (J.T. Baker)

2 g KH₂PO₄ (J.T. Baker)

2 g KCl (ICN Biomedicals Inc.)

➤ **Buffer de lisis**

(Laird W. P., *et. al.*, 1991, Simplified mammalian DNA isolation procedure, Nucleic Acids Research, 19 (15), 4293)

200 mM NaCl (J.T. Baker)

5 mM de Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA) (J.T. Baker)

0.2% Dodecil sulfato de sodio (SDS) (J.T. Baker)

100 mM Tris HCL, pH 8.5 (ICN Biomedicals Inc.)

Se afora a 1L con agua destilada.

➤ **Buffer TBE 10x**

890 mM Tris Base

890 mM Ácido Bórico

40 ml de 0.5 M EDTA disódico

Se ajusta todo a pH 8 y se afora a 500 ml con agua destilada.

➤ **Buffer de pegado (ELISA)**

0.1 M de NA₂HPO₄

Aforar a 1L con agua destilada.

➤ **Solución de lavado (ELISA)**

1L de PBS más 0.5% de Tween 20 (Promega co.)

➤ **Solución de bloqueo (ELISA)**

100 ml de PBS más 1% de albumina serica bovina (ICN Biochemicals)

➤ **Sustrato ABTS para revelado (ELISA)**

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN biomedicals) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a un pH de 4.35. Posteriormente se hicieron alícuotas de 11ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -70°C.

➤ **Buffer de FACS**

0.1% de azida de sodio NaN₃ (Sigma chemicals)

1% de suero fetal bovino SFB (Gibco)

En 1 L de PBS.

➤ **Bromuro de etidio.**

Stock 1000 x solución 0.5 mg/ml.

50 mg de Bromuro de Etidio

100 ml de agua

Diluir 1:1000 para teñir geles y proteger de la luz.

➤ **Solución para despegado de macrófagos de médula ósea.**

Se realiza una mezcla volumen-volumen de Tryple Express y THBSS Hanks (EDTA). Para 120 ml:

60 ml Tryple Express

60 ml THBSS Hanks (EDTA)

13. Apéndice 2.

Genes	Secuencias	Pares de bases	Temperatura de alineación (°C)	Referencia
NLRP3	GC TCA GGA CAT ACG TCT GGA TTG TAG TTG CCG TCG TCC TT TG AGG TCC ACA TCT TCA AGG	650	57 °C	
β-actina	GCT GTG CTA TGT TGC TCT AG CGC TCG TTG CCA ATA GTG	117	57 °C	(Pachecho-Fernandez, T., <i>et. al.</i> , 2019)
PDL-1	GCT CCA AAG GAC TTG TAC GTC TGA TCT GAA GGG CAG CAT TTC	238	59 °C	(Reyes, <i>et. al.</i> , 2011)
PDL-2	CTG CCG ATA CTG AAC CTG AGC ACG GTC AAA ATC GCA CTC C	126	60 °C	(Reyes, <i>et. al.</i> , 2011)
ATG16/L1	5- CTG AGA AGG CCC AAG AAG CC 5-GAC AGA GCG TCT CGT AGC TG	221	60 °C	(Kuang, P., <i>et. al.</i> , 2018)
RELM-α	CCC TTC TCA TCT GCA TCT CC CAG TAG CAG TCA TCC CAG CA	204	59 °C	(Reyes, <i>et. al.</i> , 2011)

IL-1β	TGA GGC CCA AGG CCCA CAG GT AAG CCT CGT GCT GTC GGA CC	140	66	
IL-18	GCC TCG GGT ATT CTG TTA TGG A GAC CTG GAA TCA GAC AAC TTT GG	579	56	
NLRP3	CAT GAG TGT GGC TAG ATC CAA G ATT ACC CGC CCG AGA AAG G	83	61	
CASPASE-1	GCA AGA CGT GTA CGA GTG GTT G GGC ACA TTT CCA GGA CTA ACT G	125	63	

