



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“LA PROTEÍNA AUTOFÁGICA ATG16L1 MODULA LA
RESISTENCIA EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Taenia*
crassiceps”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN ENFERMERÍA

P R E S E N T A:

FRANCISCO HERNANDEZ LARA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Luis Reyes Hernández



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 2021-2021-18.

Agradecemos a la MVZ María 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 brindado durante la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

Desde el momento en que comencé a escribir este proyecto me planté este momento y el qué escribiría una vez que llegara. Esperaba que las palabras vinieran a mí y, así es, pero todo aquí viene y va como las olas; igual de turbio y con carencia de claridad como la espuma que dejan al marcharse, es así como cada idea aquí vino por sí sola.

Quiero agradecer profundamente a mis padres por mostrarme todo el apoyo y cariño que les fue posible. A mi madre por no perder la fe en mí nunca, a pesar de no mostrarle potencial alguno y aun así decir que soy su orgullo. A mi padre por formarme como lo que soy: un hombre maduro que trabaja por un futuro mejor; que toda recompensa requiero de trabajo duro y esfuerzo, así como inculcarme sus valores y principios.

A pesar de no recibir el paso de la luz por parte de mis profesores como es tradición en esta carrera, para así iluminar el camino de los demás con ella, aún puedo hacer esto gracias a la luz de aquellos que estuvieron conmigo en todo momento, que me apoyaron en las situaciones difíciles, que me guiaron con su luz propia. Es por esto que desde lo más profundo de mi corazón agradezco a Jorge Quintero Hernández, por enseñarme que todos podemos cambiar y ser mejores cada día; un paso a la vez. A Javier Alejandro Martínez Morales por mostrarme la importancia de los amigos y compañeros que nos rodean, así como a Irán Marcela Flores Sotelo por compartirme su forma tan agradable y cálida de ver la vida sin importar que tan fuertes sean las dificultades que esta nos pueda poner en el camino. Gracias a Julián Candelario López por ser aquel que nunca y por ningún motivo se alejó y me dio una amistad valiosa.

Nada de esto podría haber sido posible sin la valiosa oportunidad que me proporcionó mi asesor José Luis Reyes; por mostrarme lo maravillosa que es la ciencia, por dejarme vivir una de las mejores experiencias de mi vida. Así como a Marisol Ibet González Gonzáles por guiarme en cada paso durante este proyecto, por su paciencia y sobre todo por mostrarme lo importante de la disciplina.

Gracias Nicole por darme todo tu amor sin restricción alguna, por amarme y aceptarme tal cual soy. Gracias a ti olvidé ese sentimiento de soledad que me acompañaba siempre y espero poder compartir contigo mucho tiempo de mi vida.

Todo este trabajo está dedicado a mi hermano ya que todo el esfuerzo, tiempo, trabajo arduo, sudor y lágrimas que representa este, es para él, que me vio tocar fondo y se tomó el tiempo de tenderme la mano. Por alentarme siempre y enseñarme a voltear a ver las estrellas y hacerme ver que algún día las puedo tocar; a tomar el timón de mi barco y dirigirlo al mejor puerto posible. Gracias a ti ahora sé muy bien que hay que abrir los ojos, siempre estar atento para no tropezar, que se necesita paz y amor para liberarse de las injusticias, y a siempre dar de mí lo mejor (David Velasco González, 2015) muchas gracias por todo Nelson.

—Cada vela que enciendes aviva la llama de tu vida—

ÍNDICE

1. Introducción	6
1.1 Inmunoregulación en infecciones con helmintos	6
1.2 Respuesta inmune en el modelo de infección con <i>Taenia crassiceps</i>	9
1.3 Proteínas asociadas a autofagia (ATGs).....	12
1.4 ATG16L1 y su papel en infecciones por virus y bacterias	14
1.4.1 Inmunidad Innata y autofagia.....	15
1.4.2 Inmunidad adaptativa y autofagia	17
2. Justificación	20
3. Hipótesis	20
4. Objetivo general.....	21
4.1 Objetivos particulares	21
5. Material y métodos	22
5.1 Ratones e infección.....	22
5.2 Determinación de la carga parasitaria.....	22
5.3 Obtención de suero	23
5.4 Obtención y cultivo de bazo	23
5.5 Citometría de flujo	24
6. Resultados.....	25
7. Discusión	40
8. Conclusión	47
9. Referencias.....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inmunoregulación en infecciones con helmintos

Los helmintos son un grupo de organismos pertenecientes a los invertebrados que ocupan una gran diversidad de nichos ecológicos. Además de encontrarse como organismos de vida libre, los helmintos tienen representantes que han desarrollado relaciones parasitarias con los mamíferos. Por lo tanto, existen helmintos que se consideran de importancia veterinaria y médica (Willms, 2010)

Con el objetivo de desarrollar tratamientos efectivos o vacunas dirigidos contra los helmintos parásitos se ha estudiado a estos organismos para entender más sobre la forma en que interactúan con los organismos que se encuentran compartiendo en su ambiente. Uno de los procesos más relevantes que se ha identificado es la capacidad de evadir la respuesta inmune, lo cual les permite colonizar de manera exitosa en sus respectivos hospederos. Desafortunadamente, este proceso de colonización tiene repercusiones en la salud de los hospederos, lo cual se hace evidente con el daño a los diversos órganos por donde migran o en los cuales se establecen estos parásitos (Willms, 2010)

Las infecciones por helmintos ejercen profundos efectos reguladores sobre el sistema inmunológico de sus hospederos utilizando una amplia gama de estrategias de infección, pero con pocas excepciones, el huésped mamífero responde a estos diversos grupos de organismos de una manera notablemente estereotipada, ya que los helmintos parásitos inducen un tipo de respuesta inmune polarizada hacia el perfil Th2, esta respuesta implica la producción de las citocinas como interleucina-

4 (IL-4), IL-5, IL-10 e IL-13. Este tipo de respuesta además incluye la participación de granulocitos de la inmunidad innata como eosinófilos, mastocitos y basófilos. (Maizels R. M., 2004).

Los helmintos parásitos incluyen algunos (Maizels R. M., 2004) con características diferentes en cuanto a su morfología (redondos o aplanados), hábitos alimenticios (hematofagos), formas de reproducción (sexual o gemación) y los estadios de sus respectivos ciclos de vida. Estos causan una variedad de enfermedades en sus hospederos los cuales responden pocas veces a las infecciones causadas por estos diversos grupos de organismos, aunque las respuestas no son precisamente únicas sino que por el contrario suelen ser compartidas (Maizels R. , 1993). Estas enfermedades serán variables y dependientes del sitio de alojamiento de los helmintos, la forma de adquisición de estos, así como las rutas de infección (*e. g.* oral y subcutánea) ya que estos han evolucionado para utilizar una amplia gama de estrategias de infección. La verdadera pregunta sería el ¿por qué este amplio espectro de parásitos tan distantes generan respuestas inmunes en sus huéspedes tan similares? (Tawill, 2004)

1.2 Respuesta inmune en el modelo de infección *Taenia crassiceps*

En el caso de la infección experimental con el cestodo *Taenia crassiceps* la inmunomodulación y supresión que ejerce este parásito favorece su establecimiento en el hospedero, debido a que las infecciones por helmintos parasitarios suelen ser

asintomáticas y la mayoría de los huéspedes son capaces de tolerar la presencia de parásitos normalmente considerados como patógenos durante un tiempo considerable sin efectos nocivos (Maizels R. M., 2004). Las principales estrategias de evasión inmune en el caso de *T. crassiceps* son la inducción de una respuesta de tipo Th2 y el reclutamiento de macrófagos supresores al sitio de infección, que en este caso es la cavidad peritoneal. La respuesta Th2 es evidente con altos niveles de IL-4 e IL-13 y anticuerpos de clase IgG1 e IgE. En el caso de los macrófagos supresores, se caracterizan por una alta presencia en la membrana celular de las moléculas PDL1 y PDL2, ambos ligandos del receptor PD-1. En la actualidad no se conocen los mecanismos por los cuales *T. crassiceps* genera este microambiente de regulación que le permite permanecer de manera indefinida en su hospedero (Valdor, 2012)

1.2 Respuesta inmune en el modelo de infección con *Taenia crassiceps*

El adulto de *T. crassiceps* se hospeda en caninos tales como los zorros, lobos y perros. Estos colonizan el intestino delgado, posteriormente, los huevos producidos son liberados con la materia fecal y consumidos por el hospedero intermedio (roedores). En estos hospederos, se desarrolla la fase de metacestodo (cisticerco) que reside en la cavidad peritoneal y pleural. Cuando un organismo ingiere a estos roedores parasitados nuevamente se desarrollan los adultos en el aparato gastrointestinal del hospedero definitivo (canidos). Véase [Figura 1](#), el ciclo de vida de *T. crassiceps*.

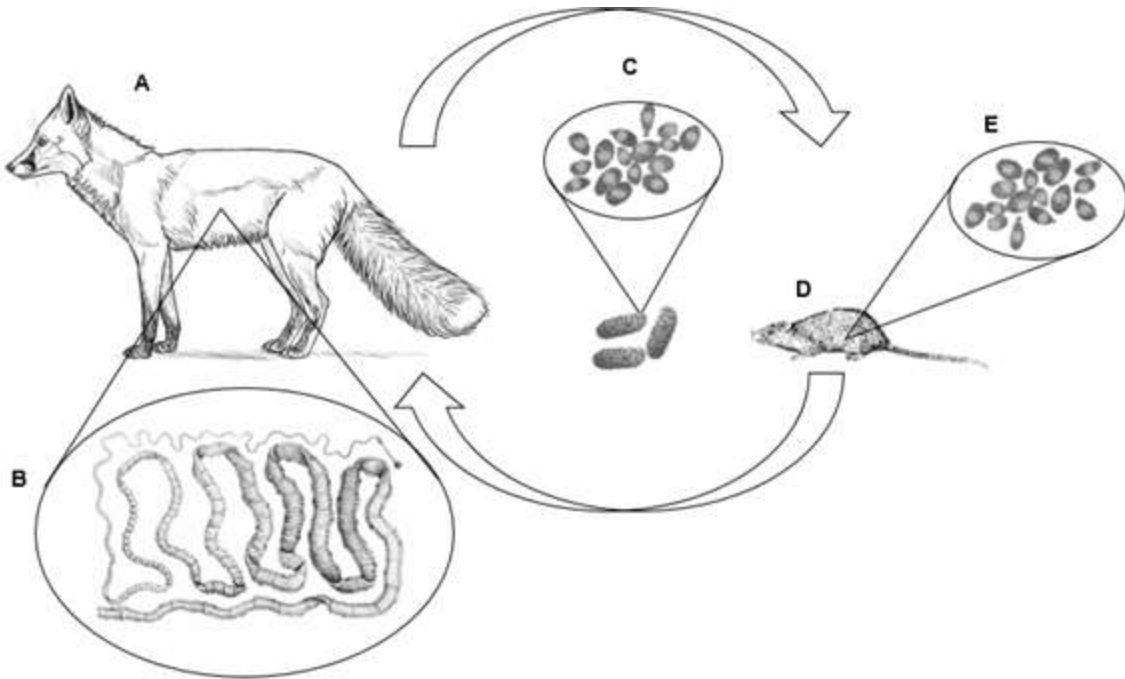


Figura1.- Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. **A)** Hospedero definitivo **B)** *T.crassiceps* adulta alojada en intestino delgado **C)** Oncósferas liberadas en las heces **D)** Hospedero Intermediario consume las oncósferas **E)** Larva desarrollada en el hospedero intermediario, que al ser consumido por el Hospedero definitivo se desarrolla como un gusano adulto. (Willms & Zurabian 2010).

Además del ciclo de vida natural, se ha utilizado la infección de tipo experimental de la fase de metacestodo de *T. crassiceps* y debido a su alta capacidad infectiva los metacestodos pueden ser inoculados a través de una inyección intraperitoneal en los ratones de laboratorio, de esta manera a través de un tipo de reproducción asexual (gemaciones) los parásitos generan una infección de tipo crónica. Los modelos experimentales han sido útiles para investigar características relacionadas con la cisticercosis porcina y humana, debido a que los metacestodos de *T. solium* comparten una gran similitud de antígenos con los de *T. crassiceps* (Willms & Zurabian 2010).

Este modelo de infección crónica ha servido para identificar diferentes mecanismos de evasión inmune. La persistencia de los parásitos helmintos es evidencia suficiente de que logran la evasión inmune, y está claro que la interferencia y la modulación ocurren desde los primeros eventos de la infección. Los helmintos no evitan simplemente el ataque inmunitario; más bien, influyen y alejan las respuestas inmunitarias de los modos más dañinos para ellos, regulando la respuesta inmunitaria del huésped para crear nichos que optimicen la alimentación y la reproducción exitosas (Maizels R. M., 2004)

Actualmente se sabe que la respuesta inducida por el *T. crassiceps* es de tipo Th2 evidenciada por las altas concentraciones de la citocina IL-4 así como una disminución considerable por parte de la respuesta de tipo Th1, caracterizada por el IFN γ es así como estas observaciones clave nos llevan a concluir que las citocinas inflamatorias de tipo Th1 y Th2 se antagonizan mutuamente (Maizels R. M., 2004). Adicionalmente, la infección con *T. crassiceps* causa un reclutamiento de macrófagos alternativamente activados (AAMs) que fomentan la persistencia del parásito a través de la supresión que permite la existencia continua de parásitos (Maizels R. M., 2004); debido a que los AAMs tienen un papel supresor de la respuesta inmune así como otras características anti inflamatorias (José L. Reyes, 2010). Se ha encontrado que la actividad supresora de los AAMs depende de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en la membrana celular. Todos los acontecimientos anteriores muestran que la respuesta Th2 y el reclutamiento de AAMs tienen efectos anti inflamatorios que favorecen la supervivencia del parásito por un periodo de tiempo indefinido. Sin embargo, como se da la polarización de los AAMs o que señales son requeridas aún no se conoce (José L. Reyes, 2010). Esta respuesta inmune deja varias dudas en el aire pero tal vez la más importante sea la siguiente ¿es la Inmunoregulación una decisión autónoma del sistema inmunitario del huésped o el resultado de una elaborada estrategia de supervivencia por parte del parásito? (Maizels R. M., 2004)

1.3 Proteínas asociadas a autofagia (ATGs)

Dentro del grupo de las proteínas relacionadas con la autofagia (autophagy-related genes ATGs) esta es el homólogo mamífero de Atg16 (presente solo en levaduras) el cual fue clonado en ratones en el 2003 (Mizushima, 2003) la opinión emergente es que ATG16L1 ejerce múltiples funciones (Daniel Hamaoui, 2021) para la biogénesis del autofagosoma y el reconocimiento de sustratos para degradación. La proteína ATG16L1 está involucrada en la fase de elongación del autofagosoma, esta proteína tiene tres dominios principales los cuales tienen un papel importante en cada una de las funciones de esta proteína. Comenzando por la región N-terminal la cual contiene una α -hélice mejor denominado hélice 1 que es requerido para unirse al complejo ATG5-ATG12. El segundo dominio esta nombrado como CCD (coiled-coil domain) o región media, esta regiones en espiral están compuestas por estructuras helicoidales que contribuyen en las interacciones de proteína-proteína en donde ATG16L1 forma un homodímero a través de su región coiledcoil y potencialmente a través de interacciones con el dominio WDD (Mizushima, 2003) (Bajagic, 2017) (Fujioka, 2010), su extremo amino-terminal se une a ATG5, que a su vez está unido covalentemente a ATG12 (Parkhouse, 2013) este complejo(ATG12-ATG5) cumple con un papel importante ya que este forma la maquinaria central que cataliza la adición de fosfatidiletanolamina(PE) a LC3 (Ishimoto, 2018), la región CCD es esencial en el proceso de la autofagia ya que LC3-PE posee propiedades fusogénicas y media el crecimiento del fagóforo y su cierre para formar el autofagosoma (Ishimoto, 2018). Su delección causa mortalidad neonatal en ratones. La región C-terminal está compuesta por siete repeticiones de tipo WD40 que forma

un b-hélice, a la que nos referiremos como WDD (Mizushima, 2003) (Bajagic, 2017) que abarca la mitad de C-terminal de ATG16L1. Estos dominios están completamente ausentes en Atg16 de levadura lo que nos indica que son dispensable para el papel que juega ATG16L1 en la autofagia canónica (The company of biologists, 2020), sin embargo, los ratones que carecen del dominio enlazador y la WDD de ATG16L1 sobreviven a la inanición neonatal, son fértiles y no muestran un fenotipo evidente en varios tejidos examinados debido a que en ausencia de este dominio el proceso se lleva a cabo (Rai, 2019). ATG16L1 también puede estar implicado en el reconocimiento de la carga ubiquitinada, ya que su WDD se une directamente a la ubiquitina, decorando los endosomas dañados que contienen Salmonela (Dudley, 2019)

Esta proteína más allá de su papel en la autofagia a través del reclutamiento del complejo ATG5-ATG12 para el fagoforo y formación del autofagosoma, participa en la regulación de más procesos celulares, incluyendo los que ocurren en células del sistema inmune.

ATG16L1 está presente en todos los tejidos, aunque los factores de transcripción específicos que regulan la expresión de ATG16L1 aún no han sido descritas (Daniel Hamaoui, 2021) .Por lo tanto, la proteína ATG16L1 se ha relacionado con una serie de funciones esenciales que conservan la homeostasis celular, como el reciclaje de orgánulos y agregados de proteínas a través de la autofagia, lo que protege de la neurodegeneración, el control de la señalización celular, el metabolismo celular y la defensa contra patógenos invasores. (Daniel Hamaoui, 2021)

1.4 ATG16L1 y su papel en infecciones por virus y bacterias

El proceso de autofagia está involucrada en diversos eventos durante la respuesta inmunitaria contra patógenos invasores como virus y bacterias donde se ha reportado la actividad de cada una de las formas de autofagia en varios tipos de células inmunes, como macrófagos (Mos), células dendríticas (DCs) y linfocitos” (Valdor, 2012), donde regulan diferentes funciones celulares que van desde el mantenimiento de la homeostasis celular a funciones más específicas como la destrucción de patógenos o el procesamiento y presentación de antígenos (Peña-Sanoja, 2013). Dos trabajos recientes investigaron cómo esto se relaciona con el resultado de la interacción huésped-microbiota en la barrera intestinal (Martin, 2018) (Samie, 2018) Los roedores deficientes de la proteína ATG16L1 estaban protegidos contra el patógeno bacteriano intestinal *Citrobacter* de una manera que dependía de la señalización de IFN-I y las vías de detección de ácidos nucleicos (Martin, 2018) cabe destacar que aquellos roedores hipomorficos de la proteína autofágica aumentaron su señalización de interferones de tipo I (IFN-I). Lo que indica que la señalización de IFN-I es una respuesta espontánea de las células epiteliales a la microbiota, que normalmente es suprimida por la maquinaria de autofagia. Estos y muchos otros estudios sobre la interacción entre la autofagia y la respuesta inmune a la infección viral convergen en un papel supresor ejercido por la autofagia sobre la producción excesiva de INF-I en respuesta a los ácidos nucleicos virales. (Daniel Hamaoui, 2021).

1.4.1 Inmunidad Innata y autofagia

La activación de la autofagia es una de las primeras líneas de defensa durante las infecciones por patógenos, debido a que esta reduce en gran medida las infecciones de origen viral, así como actúan ante la replicación de bacterias intracelulares. Algunos ejemplos que ilustran la participación de la autofagia en la inmunidad innata son: a) Bacterias libres, por ejemplo *Streptococos*, envueltas en un autofagosoma y luego liberadas para la hidrólisis lisosomal, infecciones con *Mycobacterium tuberculosis* que impide la biogénesis del fagolisosoma y de Rickettsias, *Listeria monocytogenes*, y *Salmonella tiphymurium* (Peña-Sanoja, 2013).

Aún se desconocen aspectos de la activación de la autofagia así como la forma de señalar de la misma durante la respuesta inmune de origen innata. Por otra parte el mecanismo mejor descrito es aquel mediado por los receptores tipo Toll (TLRs) los cuales son receptores transmembranales los cuales son capaces de reconocer patrones moleculares expresados por los agentes infecciosos (PAMPs). El mecanismo más estudiado que relaciona autofagia con inmunidad innata, propone que los lipopolisacáridos (LPS) activan la autofagia a través de TLR4 en macrófagos de ratón y humanos (Peña-Sanoja, 2013).

El tiempo de activación de la autofagia depende del estímulo recibido, debido a que los tiempos varían según la vía de activación, en el caso de la autofagia mediada por la privación de nutrientes abarca un tiempo estimado de 2 horas, a diferencia de la formación del autofagosoma después de la estimulación de LPS del macrófago murino o de humano que requiere de aproximadamente de 8 a 16 hrs (Peña-Sanoja, 2013)

Es así como se ha propuesto un modelo en el cual la autofagia retardada, mediada por TLR4, se deben a la necesidad primaria en el macrófago de internalizar el patógeno en un fagosoma por dos rutas (Peña-Sanoja, 2013) en donde la primera ruta mediada por MyD88 es rápida, y aquella secundaria mediada por TLR4-TRIF es más lenta.

Otro receptor mayormente asociado a la autofagia es el receptor de reconocimiento de oligomerización de nucleótidos (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) debido a que estos son receptores de PAMPs bacterianos así como de la producción de citocinas y péptidos antimicrobianos. La estimulación de NOD2 con MDP (muramyl dipeptide) induce la formación de autofagosomas y promueve la presentación antigénica de tipo MHC clase II en DCs humanas en donde se requiere ATG16L1 para una respuesta equilibrada de células dendríticas a la infección (Hubbard-Lucey, 2014). En Mos, NOD1 y NOD2 reclutan la proteína ATG16L1 al sitio de la membrana celular donde se ha internalizado el microorganismo (Peña-Sanoja, 2013). Más allá de su contribución al etiquetado de bacterias invasoras con LC3, la interacción de ATG16L1 con proteínas NOD tiene un fuerte papel antiinflamatorio, independientemente de su participación en la autofagia (Daniel Hamaoui, 2021), la disminución de la expresión de ATG16L1, pero no de ATG5o ATG9 demostró una mejoría específicamente en la producción de citosinas impulsadas por NOD, implicando a la proteína ATG16L1 con un papel de tipo supresor en la señalización de NOD (Daniel Hamaoui, 2021)

La autofagia es capaz de regular la activación del inflamasoma, esta maquinaria inflamatoria se activa en casos de infecciones o estrés a través de caspasa 1 que conlleva a la maduración de citocinas pro-inflamatorias como son IL-1 β e IL-18 así como la liberación de HMGB1. La activación del inflamasoma NLRP3 debido a la respuesta ante las estructuras correspondientes a PAMPs y DAMPs, irritantes extracelulares o desregulación metabólica, son reguladas por la autofagia con el fin de proteger de la activación persistente del inflamasoma durante la respuesta inmune. Debido a que la ausencia de autofagia puede potenciar la activación del inflamasoma (Peña-Sanoja, 2013).

El nivel de ATG16L1 condiciona la amplitud de la respuesta inmune innata ante una lesión o una infección. A nivel mundial, la opinión emergente es que la respuesta innata se exagera cuando ATG16L1 es bajo o está ausente, lo que implica que, en general, ATG16L1 suprime la inflamación. No obstante Independientemente de los mecanismos en funcionamiento, el resultado es que la presencia de ATG16L1 parece tener un efecto adverso en algunas situaciones, ya que su ausencia ayuda a eliminar ciertas infecciones o lesiones. (Daniel Hamaoui, 2021) La mayoría, si no todos, los componentes de la maquinaria molecular para la autofagia también median funciones independientes de la autofagia.

1.4.2 Inmunidad adaptativa y autofagia

En el caso de la inmunidad adaptativa se ha reportado la capacidad de la autofagia de influir en la presentación del antígeno extracelular e intracelular a las células T CD4+. Las moléculas Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I

presentan principalmente productos de degradación proteosomal a las células T CD8 +, mientras que las moléculas de MHC de clase II presentan péptidos que son principalmente generados por degradación lisosomal a las células T CD4+ (Peña-Sanoja, 2013).

Tradicionalmente el MHC de clase II tienen como papel la presentación de péptidos antigénicos derivados de proteínas extracelulares. El MHC de clase II se expresa en la superficie de células presentadoras profesionales tales como son las células B, DCs, MoS, así como células tímicas medulares y corticales, algunos estudios de secuenciación de MHC II han demostrado la presencia de antígenos virales citoplasmáticos y nucleares, antígenos propios y tumorales. Por ello, la participación de la autofagia en la inducción de respuesta de las células T es crítico en la respuesta inmune (Peña-Sanoja, 2013). Esto se describió por primera vez en un modelo de ratón de modelo de trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas, en el que la deficiencia de ATG16L1 condujo a un aumento del número de DC y proliferación de células T alorreactivas. (Hubbard-Lucey, 2014)

La relación entre el MHC clase II y la autofagia se da debido a que entre el 10 al 25% de los antígenos citoplasmáticos y nucleares son liberados en los endosomas que a su vez son cargados en el MHC II para su posterior presentación ante la célula T CD4+ (Crotzer V B. J., 2009) . Como resultado la intersección física de la autofagia con endosomas y lisosomas es crítica para el procesamiento y presentación de antígenos nucleares y citoplasmáticos por moléculas de MHC clase II (Crotzer V B. , 2010)

Con respecto a la autofagia y la presentación de antígeno en el MHC I la autofagia también constituye un eslabón en la cadena de presentación de antígenos virales y extracelulares por la vía de MHC I con el fin de ser presentadas a las células T CD8+. Los epítopes de antígenos citoplasmáticos y nucleares comprenden proteínas virales y antígenos tumorales endógenos y/o auto antígenos, que son cargados sobre las moléculas de MHC clase I por una ruta dependiente de la degradación proteosomal y un transportador de péptidos antigénicos (TAP) (Crotzer V B. , 2010)

En lo que respecta a la participación de la macroautofagia en la presentación-cruzada, básicamente dos estudios han demostrado que los antígenos tumorales y virales son presentados con mejor eficiencia por las células T CD8+ cuando es activada la ruta autofagia (Crotzer V B. J., 2009), (Münz, 2010) (Uhl M, 2009)

Se requieren más estudios que permitan establecer la importancia de la macroautofagia en la presentación-cruzada antigénica (Uhl M, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

La proteína ATG16L1 además de participar en el proceso de autofagia, está involucrada en la regulación de otros procesos celulares, incluyendo los relacionados en la modulación de la respuesta inmune ante patógenos. Los antecedentes muestran que las proteínas ATGs pueden modular las funciones de células de inmunidad innata como macrófagos, así como una respuesta inflamatoria. Debido a que los macrófagos juegan un papel fundamental para permitir el crecimiento de *T. crassiceps*, nuestro interés es entender si es que ATG16L1 modula la actividad de los macrófagos en el modelo de infección con *T. crassiceps*.

3. HIPÓTESIS

Debido a que la proteína ATG16L1 controla la respuesta inflamatoria y esta es requerida para restringir el crecimiento de *T. crassiceps*, los ratones que tienen una disminución en la producción de ATG6L1, ratones hipomorficos para ATG16L1 (ATG16L1^{HM}), serán más resistentes ante la infección con este helminto.

4. OBJETIVO GENERAL

- Determinar cuál es el papel de ATG16L1 en el curso de la infección experimental con *T. crassiceps*.

4.1 Objetivos particulares

- Determinar la carga parasitaria de ratones WT y ratones ATG16L1^{HM} para reportar si los ratones hipomórficos para ATG16L1 son más resistentes o no ante la infección con *T. crassiceps*.
- Caracterizar la población de macrófagos y eosinófilos peritoneales en ambos grupos de ratones experimentales en diferentes fases de la infección.
- Cuantificar los niveles de citocinas Th2 como IL-4 e IL-13, así como los niveles de citocinas inflamatorias como IL-1 β e IL-15 secretadas en órganos linfoides secundarios y presentes en sangre.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Ratones e infección

Ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad, silvestres (WT) y ratones de la misma edad hipomorficos para la proteína ATG16L1 (ATG16L1^{HM}), ambos en fondo genético C57BL/6, fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala e infectados con 20 metacestodos de *Taenia crassiceps* cepa ORF de un tamaño aproximado de 2 mm sin la presencia de gemaciones a través de una inyección intraperitoneal usando una jeringa de tuberculina (Beckton Dickinson), con un tiempo de evolución del cestodo esperado de 12 semanas en total.

5.2 Determinación de la carga parasitaria

En los tiempos indicados, los ratones fueron anestesiados y sacrificados para la extracción de los parásitos, a través de un lavado peritoneal para lo cual se usaron jeringas conteniendo 8 ml de solución salina estéril, esta se infiltro en la cavidad peritoneal con el fin de recolectar las células de exudado peritoneal (peritoneal exudate cells PECs), una vez extraída la solución salina cargada con las PECs, los parásitos se recolectaron para después pasar a ser colocados en un tubo falcón de 50 ml y después contados en una caja de Petri para su conteo uno a uno haciendo uso de una jeringa de 10 ml para la recolección. Se muestra el número de parásitos obtenidos por ratón ([Figura 2](#)).

5.3 Obtención de suero

Se realizaron tomas de muestras sanguíneas durante las 12 semanas de infección en intervalos de 4 semanas, haciendo uso de una (caja de sangrado) con el fin de aumentar la temperatura corporal del ratón logrando así una vasodilatación, permitiéndonos tomar una muestra significativa. Se realizó un corte en cola con una hoja de bisturí y las muestras se recolectaron en tubos eppendorf de 1.8 ml, se rotularon para colocarlas en la centrifugadora durante 10 minutos a una velocidad de 5000 rpm, recolectando únicamente el suero sobrenadante que se mantuvo en un ultracongelador hasta su uso.

5.4 Obtención y cultivo de bazo

Durante el sacrificio se extrajo el bazo de cada ratón y se colocaron en tubos eppendorf con 1 ml de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (10%) y antibioticos, para su conservación con el fin de ser procesados más adelante. El bazo se colocó en una caja de Petri con 2 ml de medio y un separador celular con poro de 70 μ m (Falcon), en donde se maceraron los bazos con el embolo estéril de una jeringa de 3 ml para cada uno de los órganos , obteniendo así células totales de bazo, una vez recolectadas las células gentilmente evitando el maltrato de estas se colocaron en tubos eppendorf y se colocaron en la centrifugadora durante 5 minutos a una velocidad de 3000 rpm, se decantó el resultante, se agregaron 3 ml de buffer de cloruro de amonio (ACK) con el fin de lisar a los eritrocitos , este actuó durante 5 minutos exactos, a continuación se neutralizó la reacción del buffer ACK adicionando 3 ml de medio con suero fetal bovino. Una vez neutralizada la reacción se coloca nuevamente en la centrifugadora durante 5 minutos a una velocidad de

3000 rpm, el resultante es decantado, re suspendido y por último se adicionaron 10 ml de medio, para continuar con el conteo. El cultivo se realizó en una placa de 12 pozos, los cuales contenían 5 millones de células y se estimularon por 48 hrs con el mitógeno concanavalina A. A las 48 hrs de incubación se analizó la producción de IL-4 e IL-15 en el sobrenadante de cultivo de células de bazo estimuladas.

5.5 Citometría de flujo.

Se colectaron las células peritoneales de los grupos experimentales a las 4, 8 y 12 semanas posteriores a la infección con *T. crassiceps*. Se ajustaron a la densidad de 1×10^6 células/ml y se tiñeron con anticuerpos de citometría de flujo acoplados a diferentes fluorocromos para las siguientes moléculas F4/80, PDL1, PDL2 y Siglec F. Se adquirieron 20 000 eventos por muestra, se llevó a cabo el análisis con el software FlowJo V.10 y se muestran los plots representativos.

6. RESULTADOS

La recolección de los cestodos los cuales dieron como resultado una marcada diferencia entre los ratones ATG16L1^{HM} con la cantidad de 90-125 cestodos en promedio dentro de la cavidad peritoneal y en su contra parte los ratones WT presentaron un promedio de 225 cestodos durante sus primeras 4 semanas. En la semana 8 los ratones WT presentaron entre 500 a 650 metacestodos en comparación con los ATG16L1^{HM} con cantidades entre 800 a 1000 parásitos. Para finalizar en la semana 12 de infección con una cantidad entre 1900 a 2800 parásitos por ratón WT y en caso de los ratones ATG16L1^{HM} 1300 a 1600

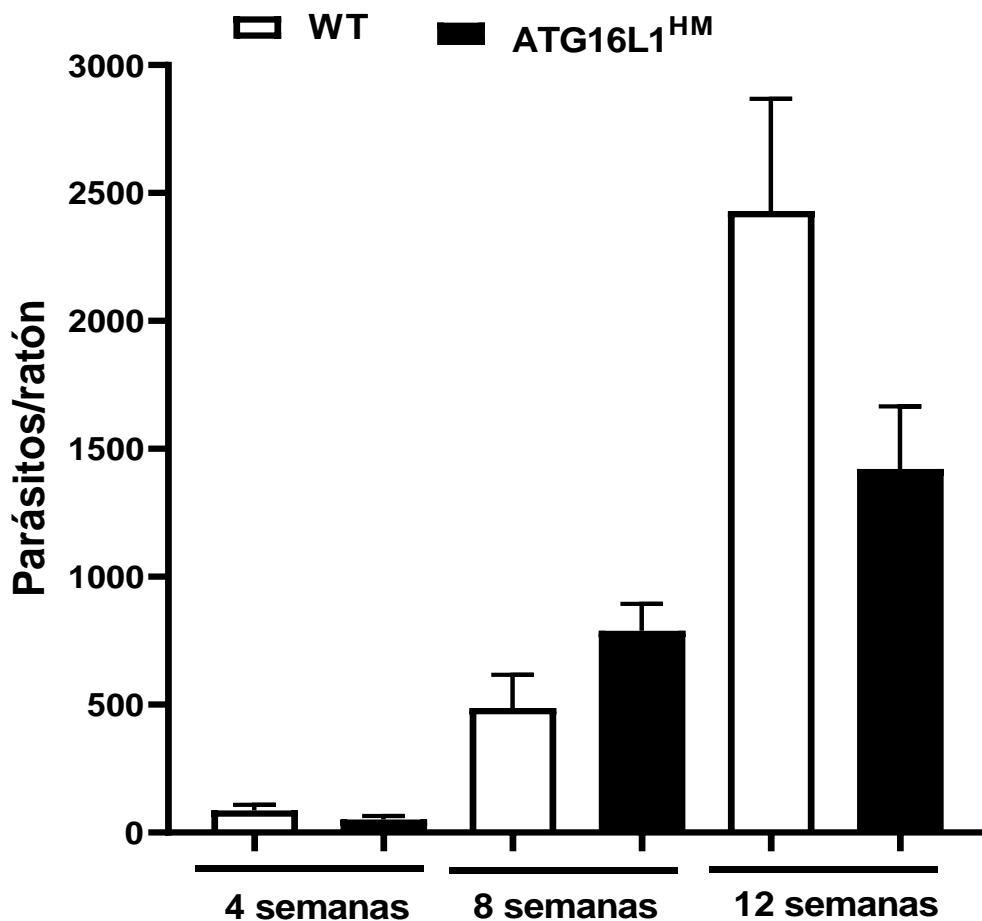


Figura 2.-Se muestra la comparativa entre los ratones hipomorficos ATG16L1 y WT, DURANTE LAS SEMANS 4, 8 y 12 semanas de infección con una diferencia marcada en el número de parásitos contabilizados

Lo cual nos muestra una marcada susceptibilidad por parte de los ratones hipomorficos de ATG16L1, con respecto a las tomas de hematocrito no hubo una diferencia importante. Véase [Figura3](#)

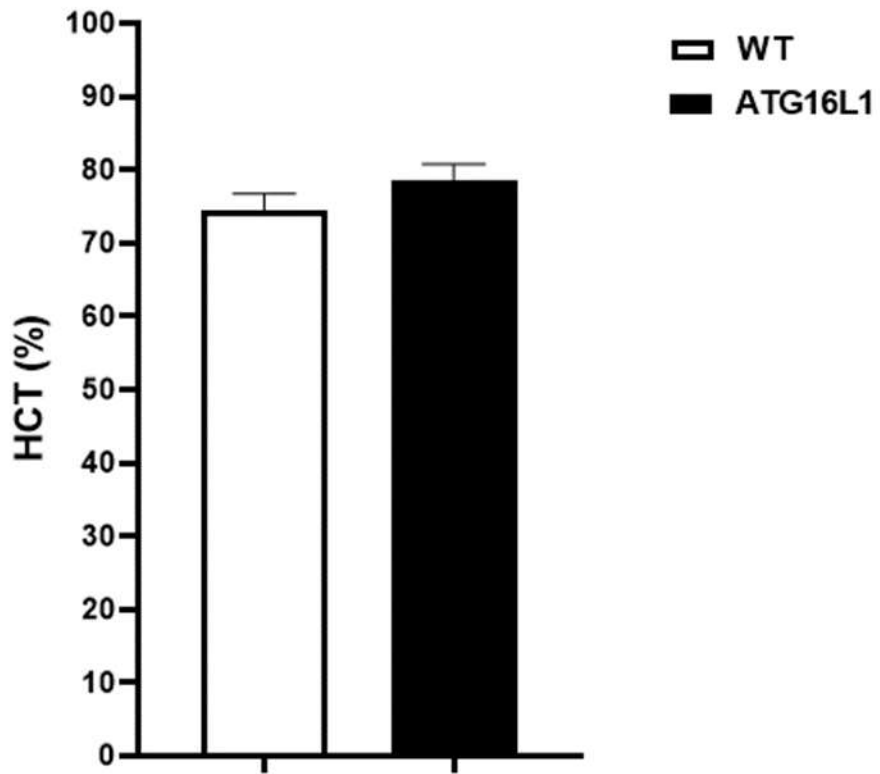
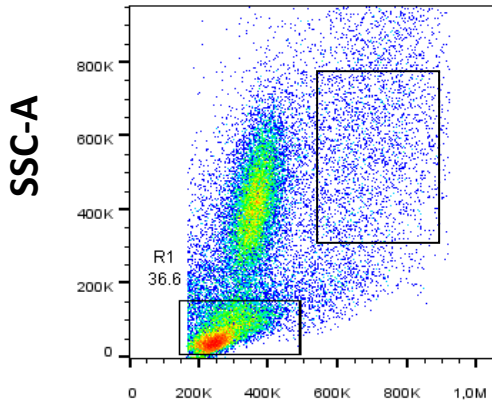


Figura3.- Comparativa entre los resultados de las mediciones de hematocrito entre los ratone ATG16L1^{HM} y WT

El siguiente paso fue la comparación de citometría en las cuales se busca determinar si existe la presencia y participación de PDL1 así como de PDL2, de los cuales se detectó presencia en la población de macrófagos véase, [Figura 4](#).

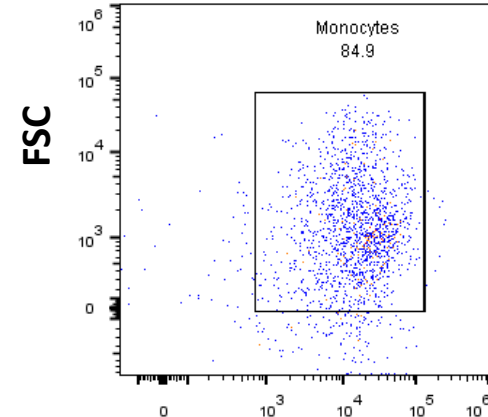
WT

A)



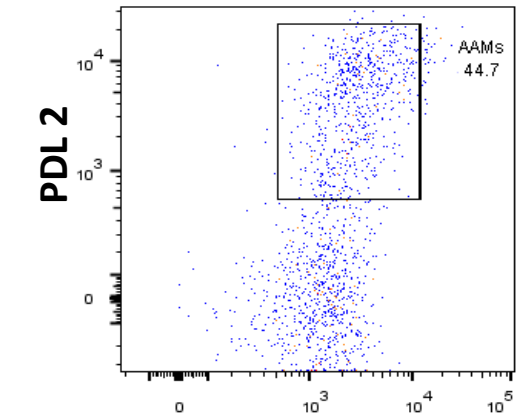
FSC-A

B)



F480

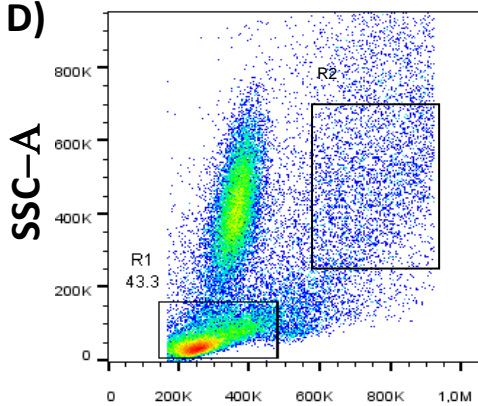
C)



PDL 1

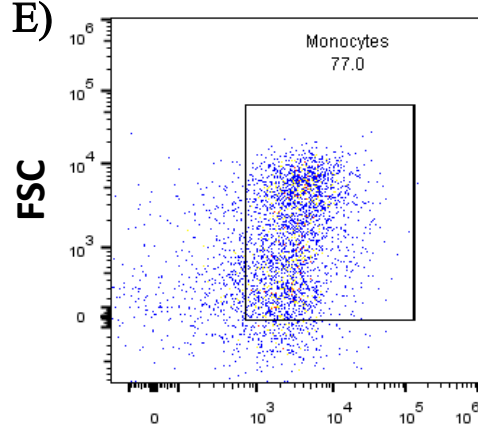
ATG16L1^{HM}

D)



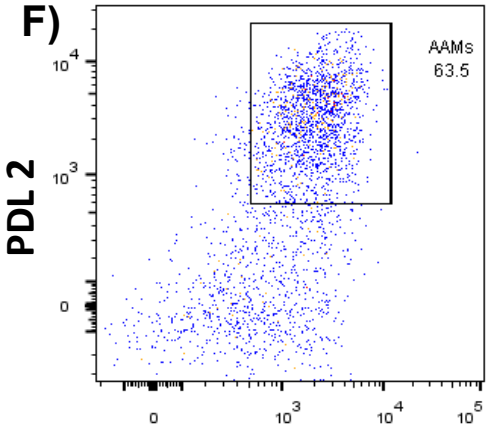
FSC-A

E)



F480

F)



PDL 1

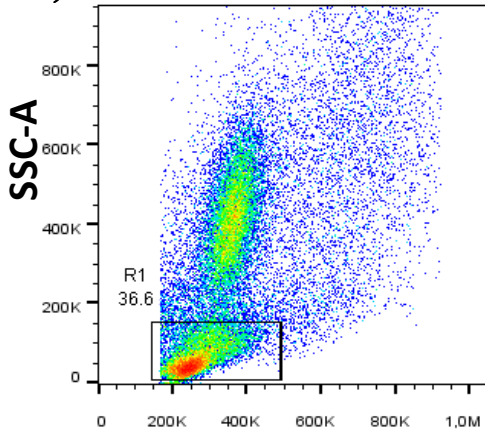
Figura 4.- **A)** Relación entre Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) **B)** R2 nos muestra la población de monocitos de los ratones de cepa C57BL/6 **C)** de los cuales el 44.7% de estos cuentan con la presencia de los ligandos PDL1 y PDL2 lo que nos sugiere, que existe una mayor cantidad de macrófagos supresores (Presentan características supresoras otorgadas por PDL1 y PDL2)

D) Relación entre Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) **E)** R2 nos muestra la población de monocitos de los ratones de la cepa ATG16LN^{HM} **F)** de los cuales el 63.5% de estos cuentan con la presencia de los ligandos PDL1 y PDL2 lo que nos sugiere, que existe una mayor cantidad de macrófagos supresores en comparación a su contraparte de control C57BL/6.

Con una gran diferencia entre los valores obtenidos los cuales son para C57BL/6 con 44.7% de células que presentan los ligandos PDL1 y PDL2. Los ratones ATG16L1^{HM} presentaron un 63.5% de macrófagos con la presencia de ambos ligandos. De la misma forma se buscó la presencia de los ligandos aunque ahora en una población distinta en este caso fueron los linfocitos b, en donde los porcentajes de células reguladoras b no fueron de interés debido a los porcentajes similares entre ambos grupos experimentales véase [Figura 5](#)

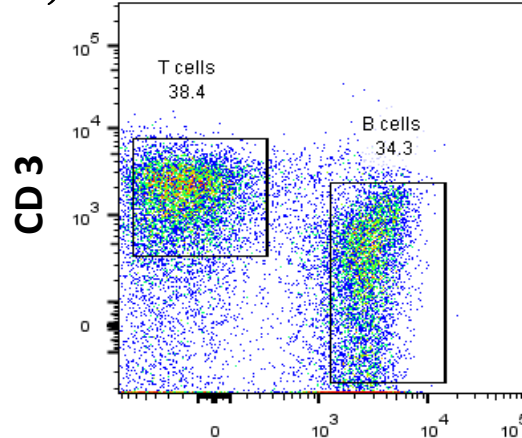
WT

A)



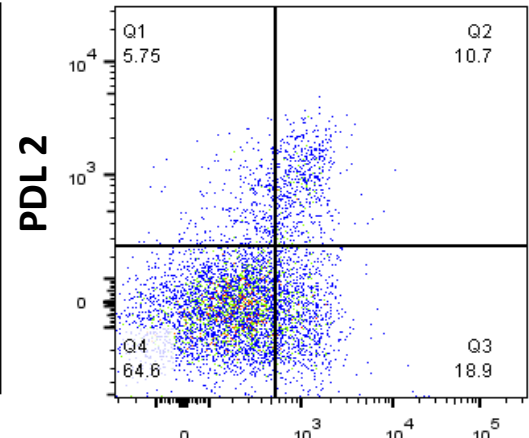
FSC-A

B)



CD19

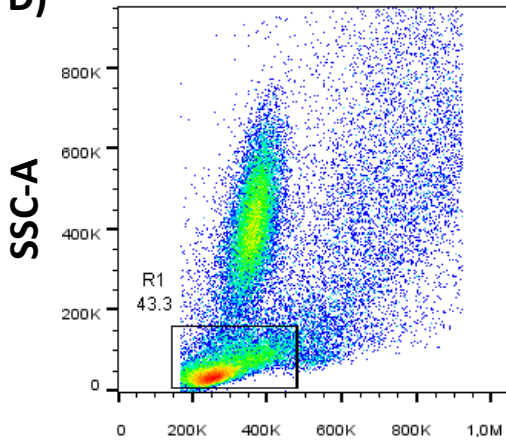
C)



PDL 1

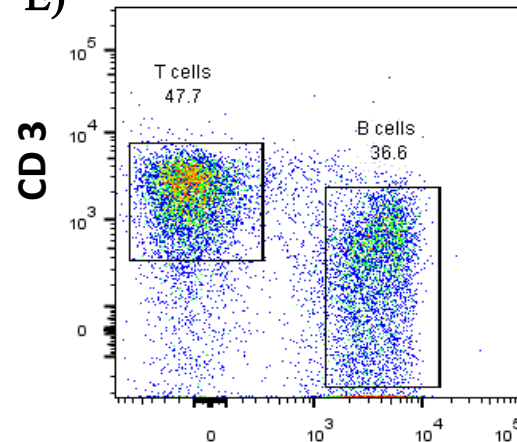
ATG16L1^{HM}

D)



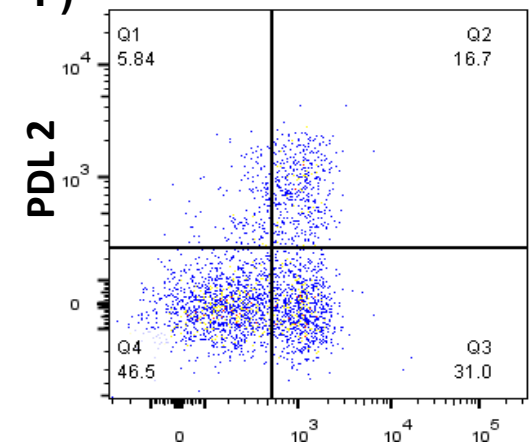
FSC-A

E)



CD19

F)



PDL 1

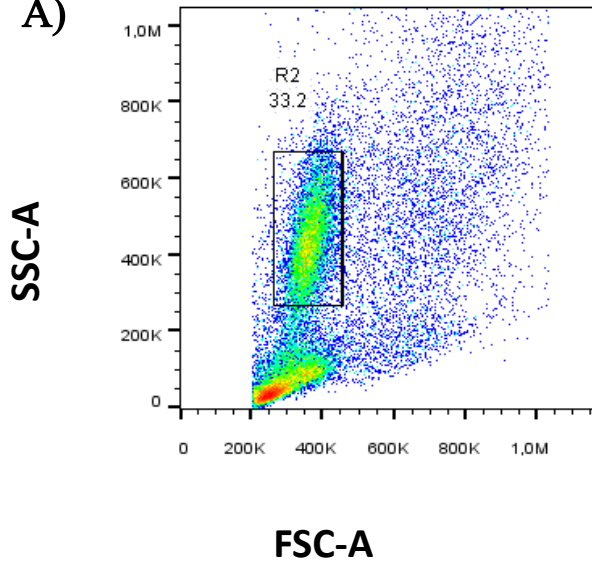
Figura 5.- **A)** Relación entre Forward Scatter (FSC) y Side Scartter (SSC) **B)** R1 nos muestra los porcentajes de células T (CD3) que es de un total de 47.7% y un 36.6% para las células B (CD19) **C)** Se observa que del 36.6% de las células B el 5.84 de estas cuentan con la presencia de PDL2 mientras que el 31% de los receptores están unidos a él ligando PDL1 otro 16.7% están unidos a ambos ligandos y el 46.5% restante no mostro la presencia de ninguno de los dos ligandos buscados.

D) Relación entre Forward Scatter (FSC) y Side Scartter (SSC) **E)** R1 nos muestra los porcentajes de células T (CD3) que es de un total de 38.4% y un 34.3% para las células B en ratones (CD19) **F)** en este caso se observa que 34.3% de las células B el 5.75% de estas cuentan con la presencia de PDL2 mientras que el 18.9% de los receptores están unidos a él ligando PDL1 otro 10.7% están unidos a ambos ligandos y el 64.6% restante no mostro la presencia de ninguno de los dos ligandos buscados.

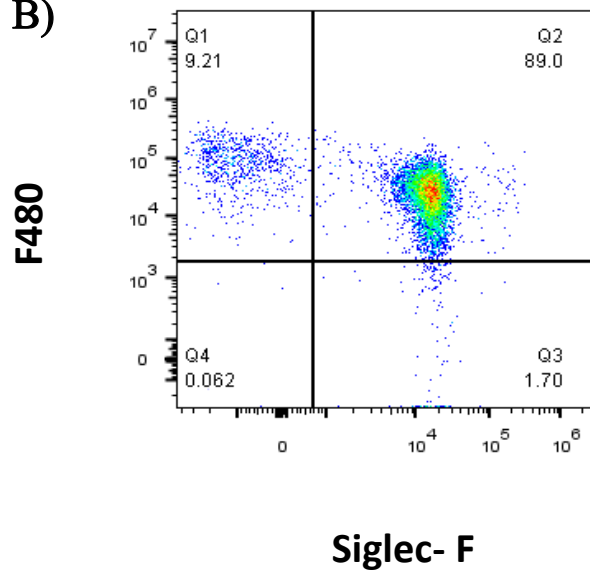
Con respecto a la presencia de eosinófilos detectados se puede hablar de poblaciones se encontraron los siguientes resultados véase [Figura 6](#)

WT

A)

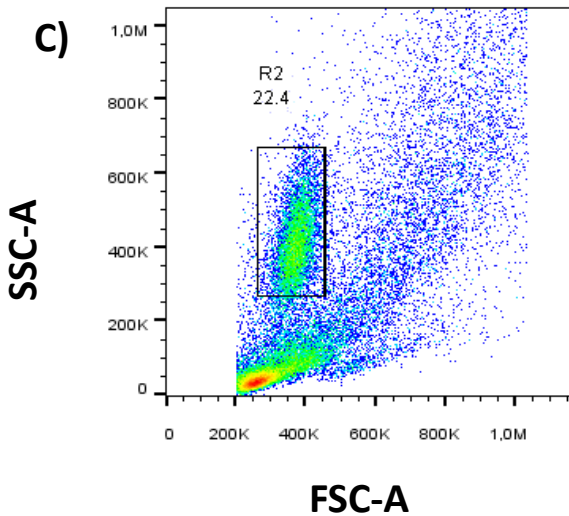


B)



ATG16L1^{HM}

C)



D)

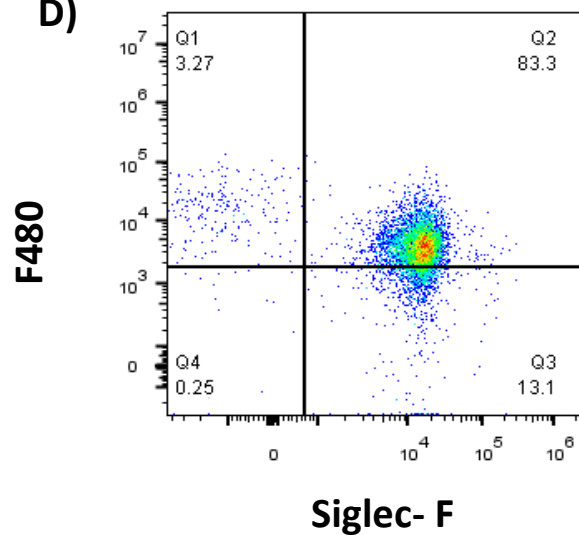
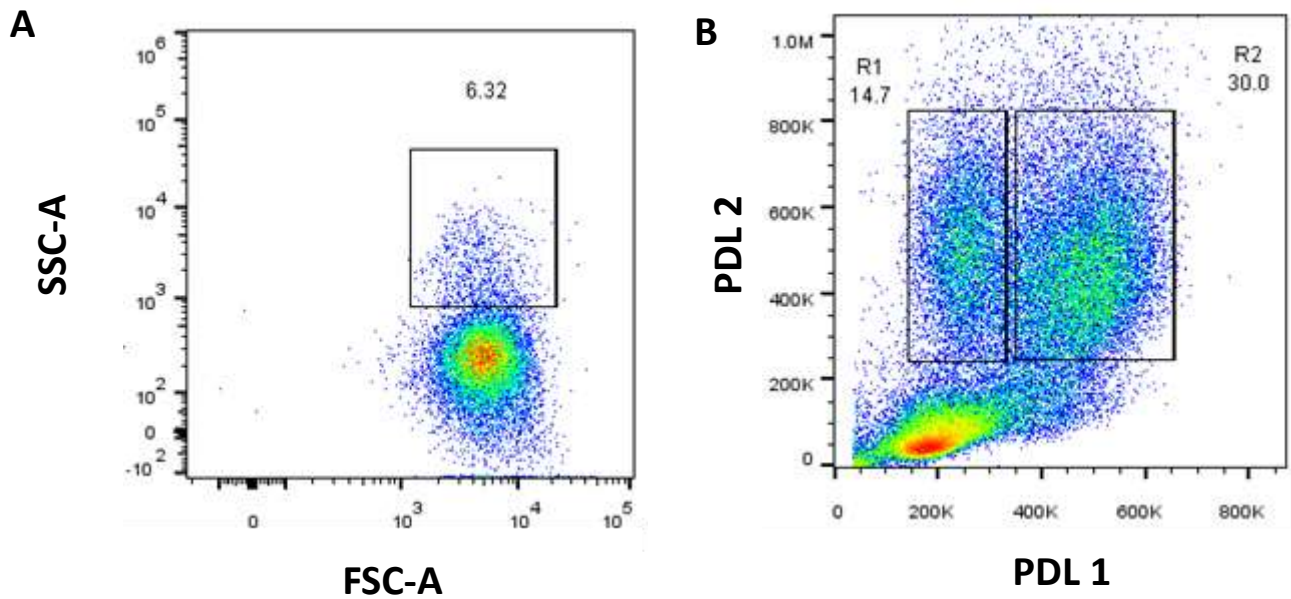


Figura 6.- **A)** Relación entre Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) en donde R2 nos muestra las células con más granularidad de la lectura de eventos de los cuales podemos observar un 33.2% de células con una granularidad y tamaño alta **B)** en los ratones de la cepea C57BL/6 hubo una presencia de 1.70% de eosinófilos.

C) Relación entre Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) en donde R2 nos muestra las células con más granularidad de la lectura de eventos de los cuales podemos observar un 22.4% de células con una granularidad y tamaño alta **D)** en los ratones de la cepea ATG16L1^{HM} hubo una presencia de 13.1% de eosinófilos.

Debido al porcentaje de macrófagos polarizados hacia una respuesta TH² volviendo a estos mismos en Macrófagos alternativamente activados se decidió analizar a la población de macrófagos en las semanas anteriores de infección en la búsqueda de respuestas comenzando por el análisis de citometría de flujo de las primeras cuatro semanas resultando en vease [Figura 7](#). Seguidas por los eventos capturados durante la octava semana vease [Figura 8](#). Y por último con los eventos analizados en la semana 12 vease [Figura 9](#)

WT



ATG16L1^{HM}

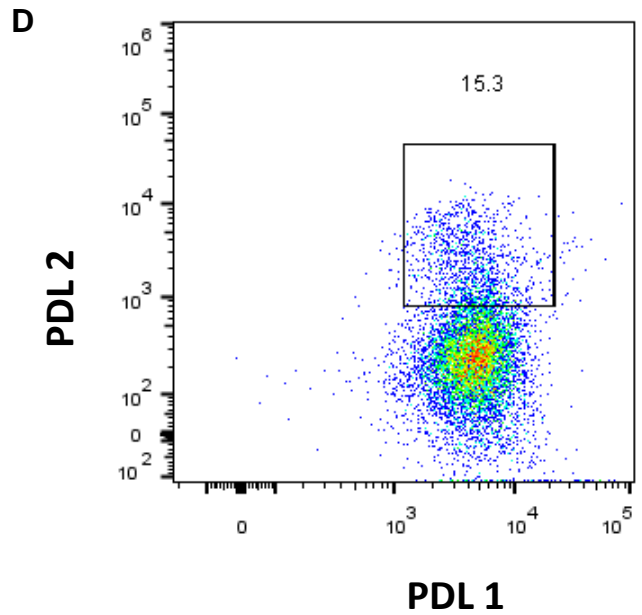
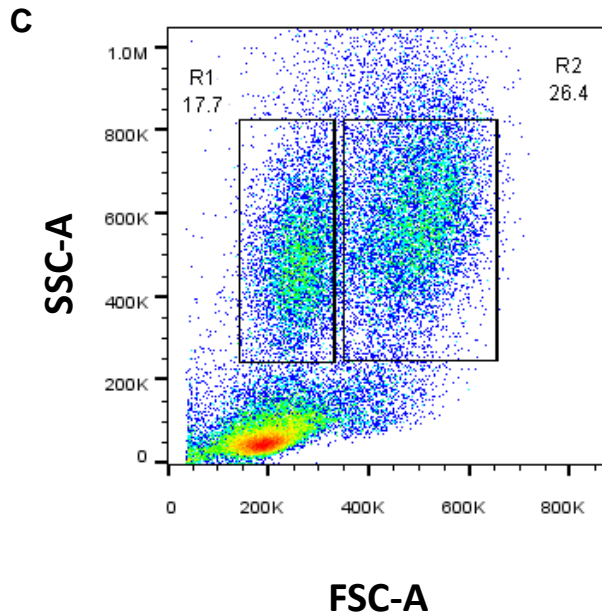
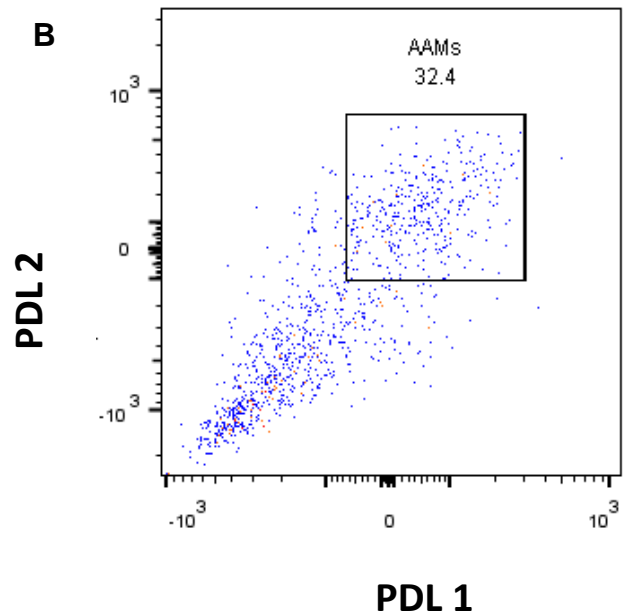
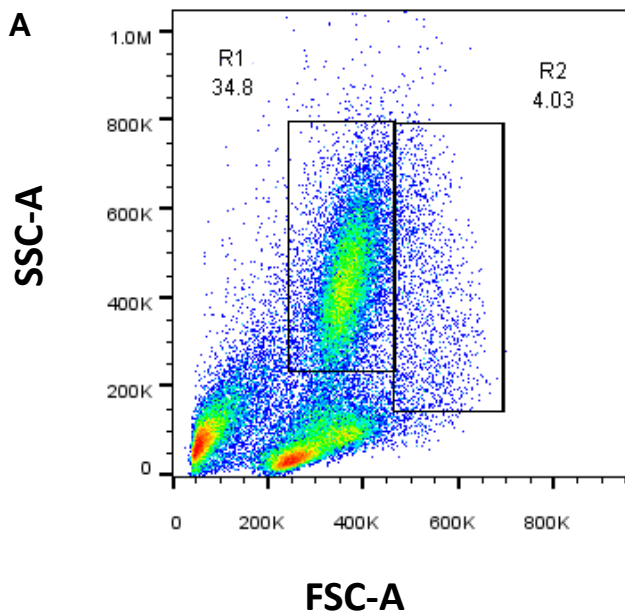


Figura7.- **A)** Se realiza una comparación Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) con el fin de identificar las poblaciones, una vez identificadas segregamos dos poblaciones específicamente en R1 y R2 respectivamente **B)** Aquí se tomó la región R1 en donde se encontraron macrófagos con una granularidad menor y se usaron marcadores de los receptores PDL1 así como de PDL2. En dicho análisis solo el 6.32% de esos macrófagos cuenta con la presencia de estos ligandos.

C) De la misma forma se realizó el análisis de comparación Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) con el fin de identificar las poblaciones, una vez identificadas segregamos dos poblaciones específicamente en R1 y R2 respectivamente **D)** en el caso de los sujetos ATG16L1^{HM} el 15.3% de los macrófagos contaban con la presencia de estos ligandos

WT



ATG16L1^{HM}

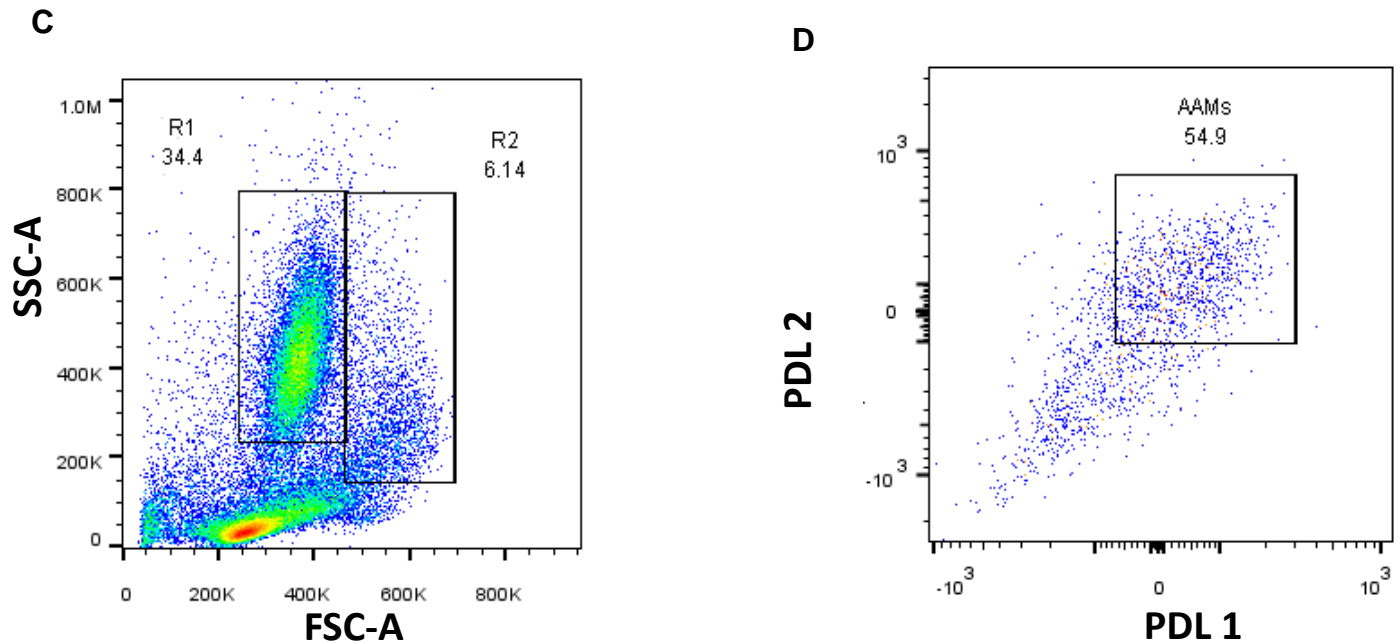
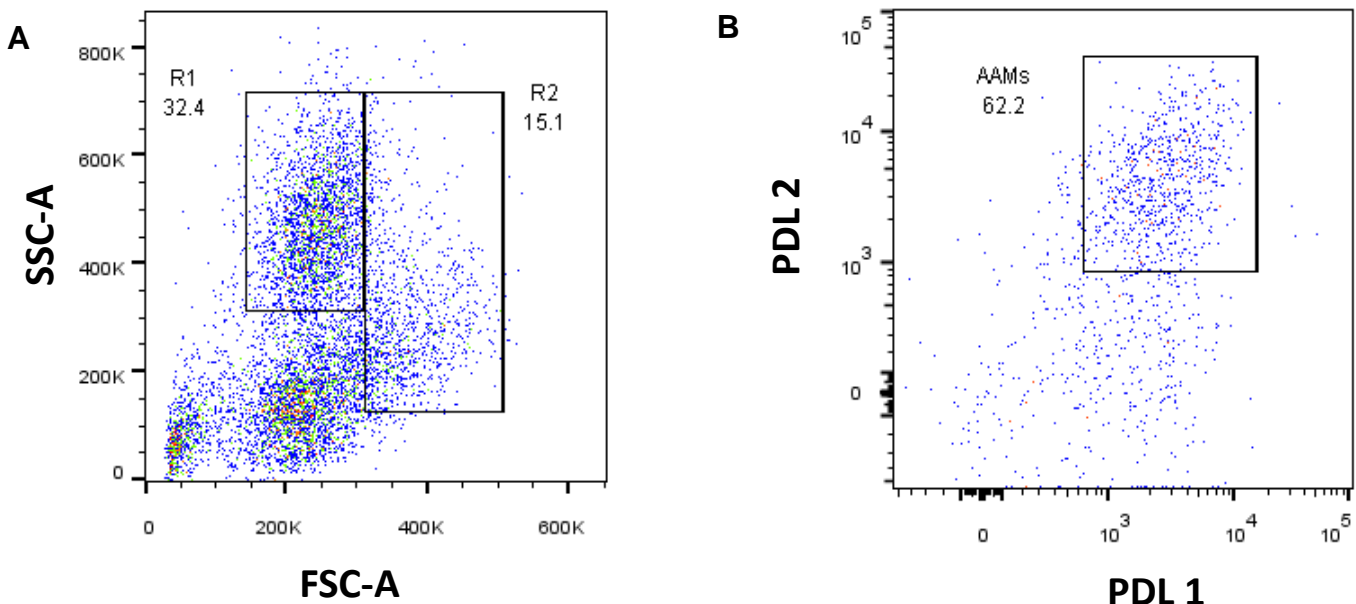


Figura 8.- **A)** Se realiza una comparación Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) con el fin de identificar las poblaciones, una vez identificadas segregamos dos poblaciones específicamente en R1 y R2 respectivamente **B)** Aquí se tomó la región R1 en donde se encontraron macrófagos con una granularidad menor y se usaron marcadores de los receptores PDL1 así como de PDL2. En dicho análisis hubo un aumento exponencial en donde del 6.32 % de esos macrófagos con la presencia de ambos ligandos en la semana 4 a pasar 32.4 % en la semana 8

C) De la misma forma se realizó el análisis de comparación Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) con el fin de identificar las poblaciones, una vez identificadas segregamos dos poblaciones específicamente en R1 y R2 respectivamente **D)** en el caso de los sujetos ATG16L1^{HM} del 15.3% de los macrófagos que contaban con la presencia de estos ligandos en la semana 4 al 54.9% en la semana 8

WT



ATG16L1^{HM}

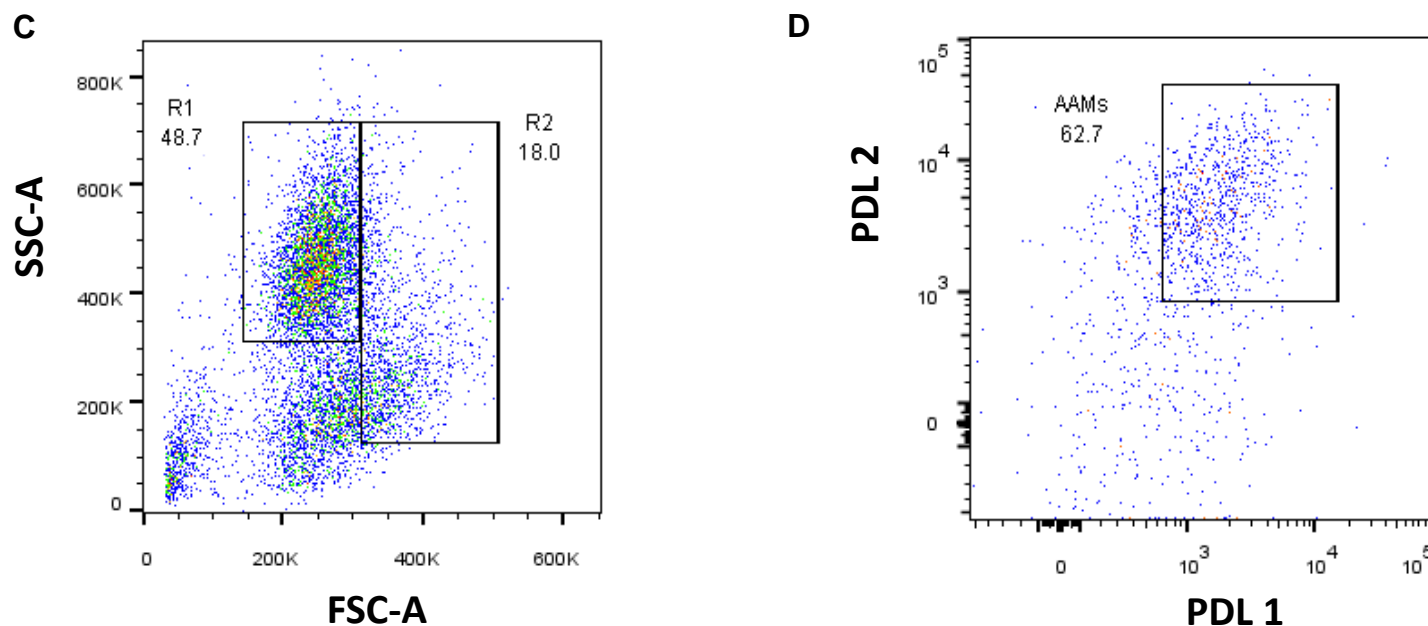


Figura 9.- **A)** Se realiza una comparación Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) con el fin de identificar las poblaciones, una vez identificadas segregamos dos poblaciones específicamente en R1 y R2 respectivamente **B)** Aquí se tomó la región R1 en donde se encontraron macrófagos con una granularidad menor y se usaron marcadores de los receptores PDL1 así como de PDL2. En dicho análisis hubo un aumento exponencial en donde del 32.4 % de esos macrófagos con la presencia de ambos ligandos en la semana 8 pasaron al 62.7% en la semana 12.

C) De la misma forma se realizó el análisis de comparación Forward Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC) con el fin de identificar las poblaciones, una vez identificadas segregamos dos poblaciones específicamente en R1 y R2 respectivamente **D)** en el caso de los sujetos ATG16L1^{HM} del 54.9% de los macrófagos que contaban con la presencia de estos ligandos en la semana 8 al 62.7% en la semana 12

Los resultados más relevantes son aquellos obtenidos durante la detección de IL-15 e IL-4 aunque esta donde la presencia de IL-4 en los sujetos C57BL/6 fue de 2000 pg/ml en cambio los sujetos hipomorfos de ATG16L1 fue de 7500 pg/ml, por otro lado la presencia de IL-15 en los sujetos C57BL/6 fue de 2500 pg/ml y por su parte los sujetos hipomorfos de ATG16L1 presentaron 1000 pg/ml véase [Figura 7](#)

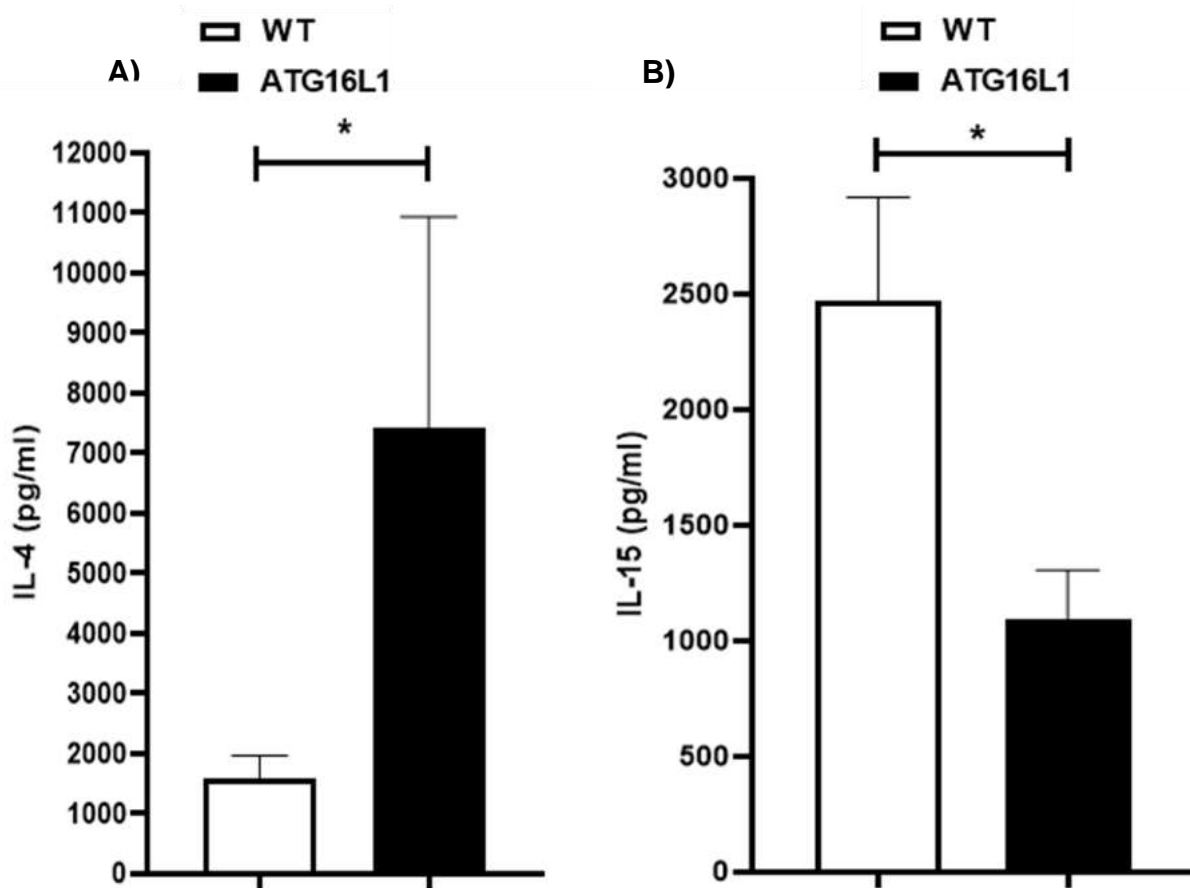


Figura 7.- Se muestran los niveles de interleucina IL-4 (A) e IL-15 (B) encontradas en el sobrenadante de cultivo de esplendorcitos.

De la misma manera se revisaron valores de IL-4 e IL-1 β en suero [Figura 8](#), líquido peritoneal [Figura 9](#), nódulo mesentérico [Figura 10](#) y bazo [Figura 11](#) como se muestra a continuación véase.

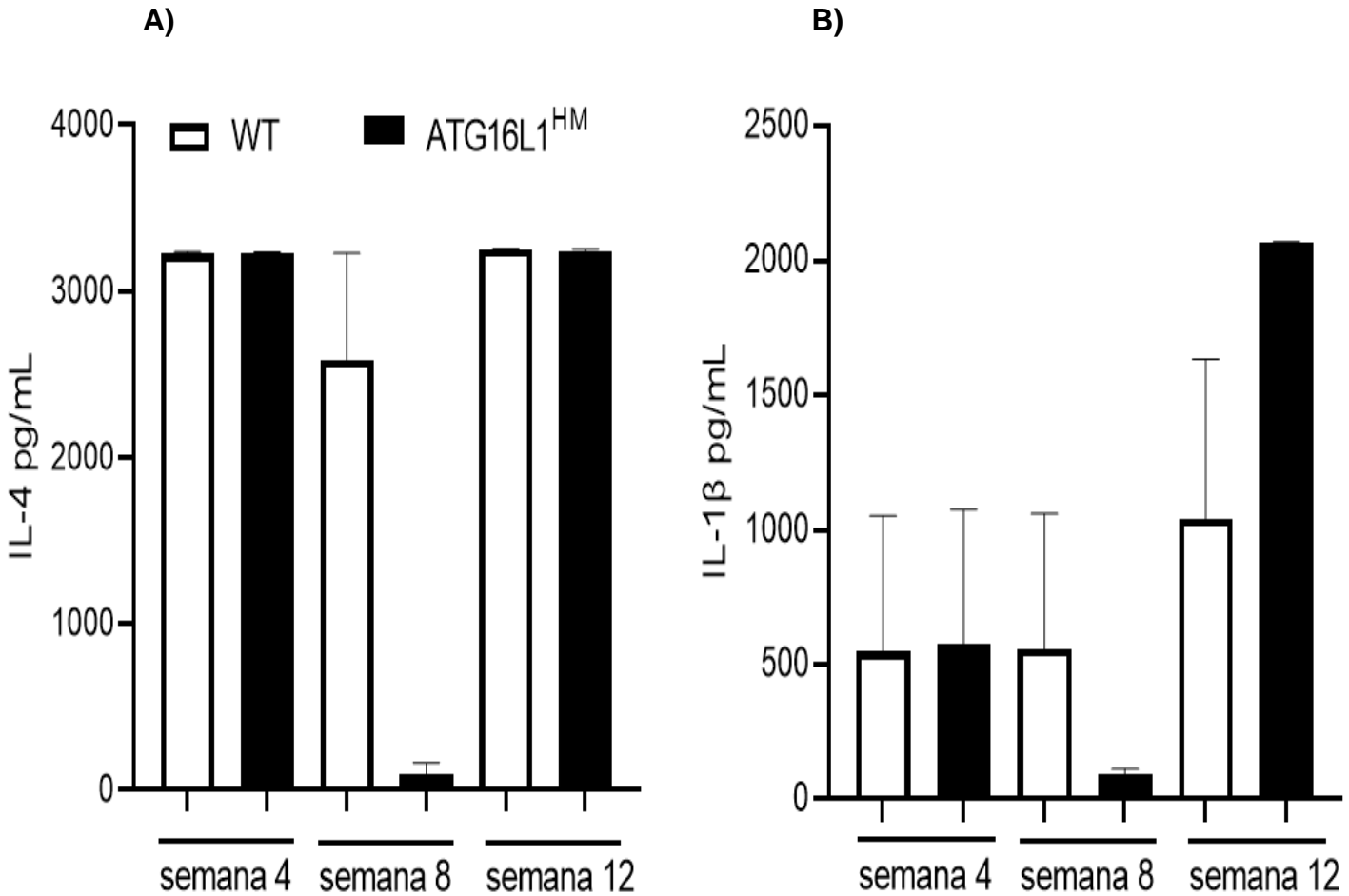


Figura 8.- Se muestran los niveles de IL-4 (A) con valores bastante similares en semanas 4 y 12. Aunque en la semana 8 se observa una diferencia bastante marcada la cual nos lleva a valores bajos de IL-4 en los sujetos ATG16L1^{HM} y por el contrario los sujetos WT presentan cantidades más altas en comparación de IL-4

IL-1 β (B) encontrados en sueros sanguíneos en ambos grupos de ratones durante las semanas 4,8 y 12 semanas de infección respectivamente. Mostrando valores similares en la semana 4 de infección y un cambio drástico con la cantidad de IL1 β que presentan los sujetos ATG16L1^{HM} en la semana 8, dejando por último los valores durante la semana 12 en este caso se observa una mayor presencia de IL1 β en los ratones ATG16L1^{HM}.

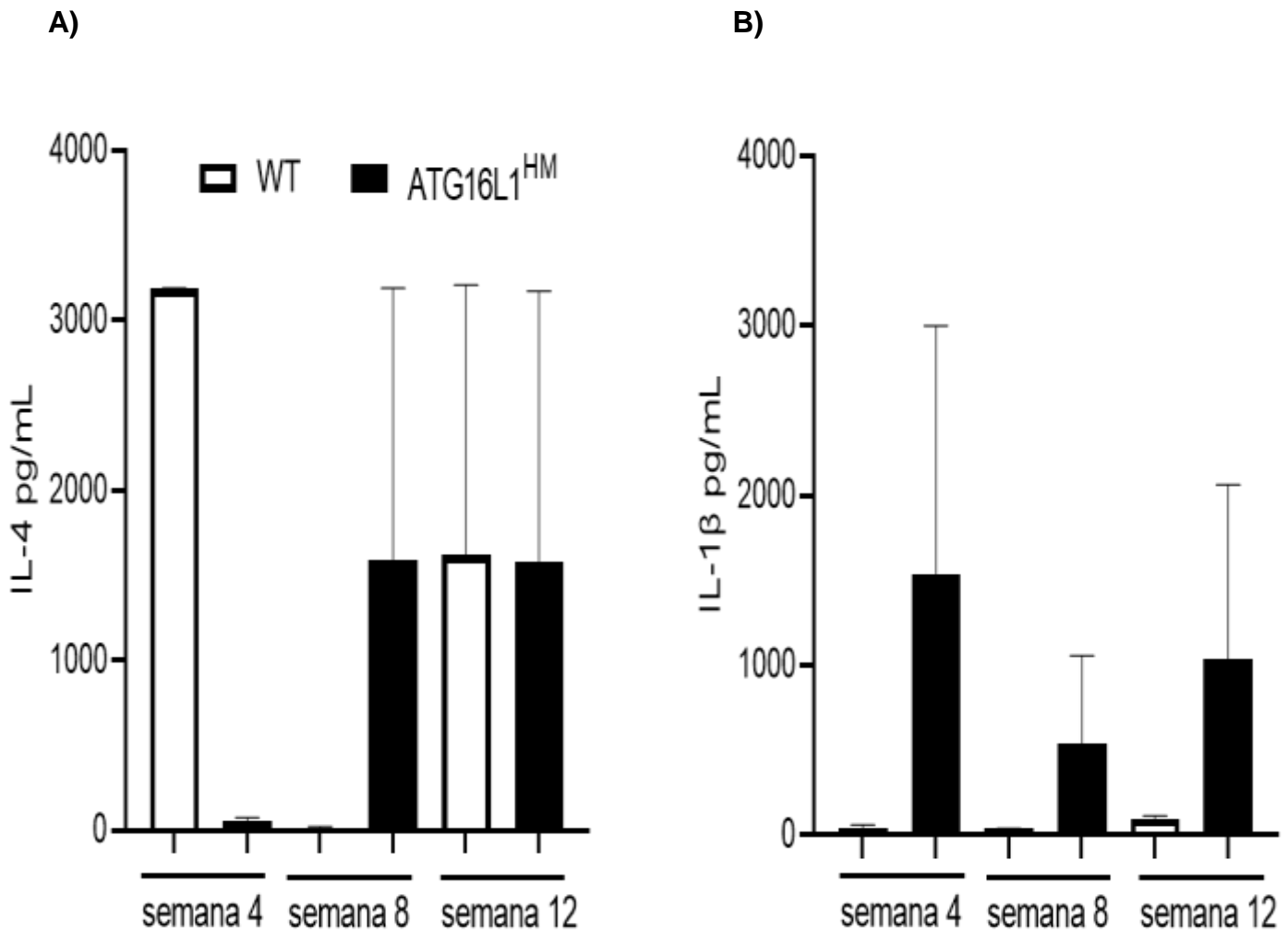


Figura 9.- Se muestran los niveles de IL-4 (A) que durante la semana 4 hubo un aumento exponencial en los sujetos WT y por el contrario en la semana 8 sucedió lo contrario con un aumento en los sujetos ATG16L1^{HM} Y finalizando con valores similares en la semana 12 de infección.

Por su parte la IL-1β (B) encontrados en Líquido peritoneal durante las primeras 4 semanas es más alta en los ratones ATG16L1^{HM} y de esta misma forma en las semanas posteriores durante las semanas 8 y 12 semanas de infección respectivamente.

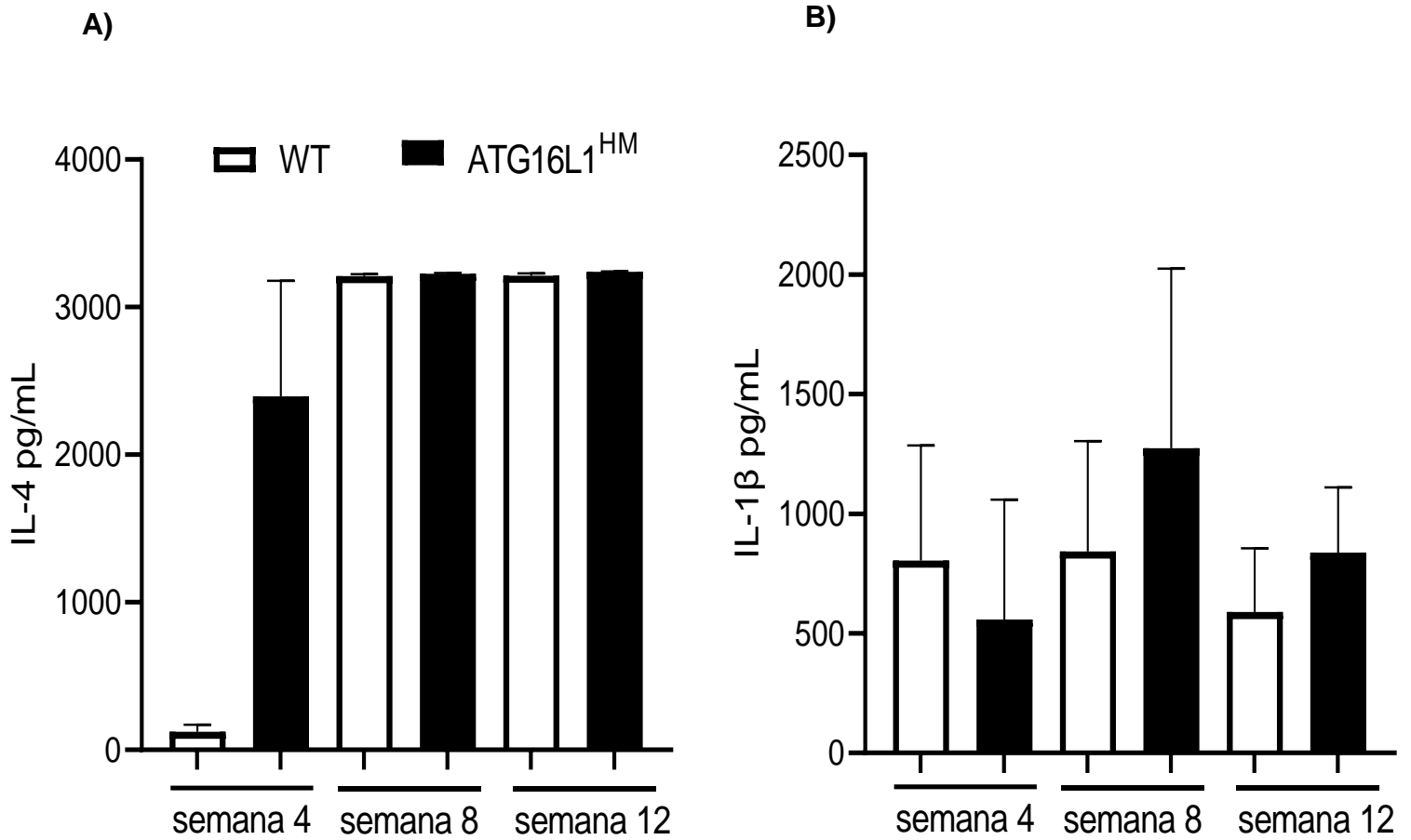
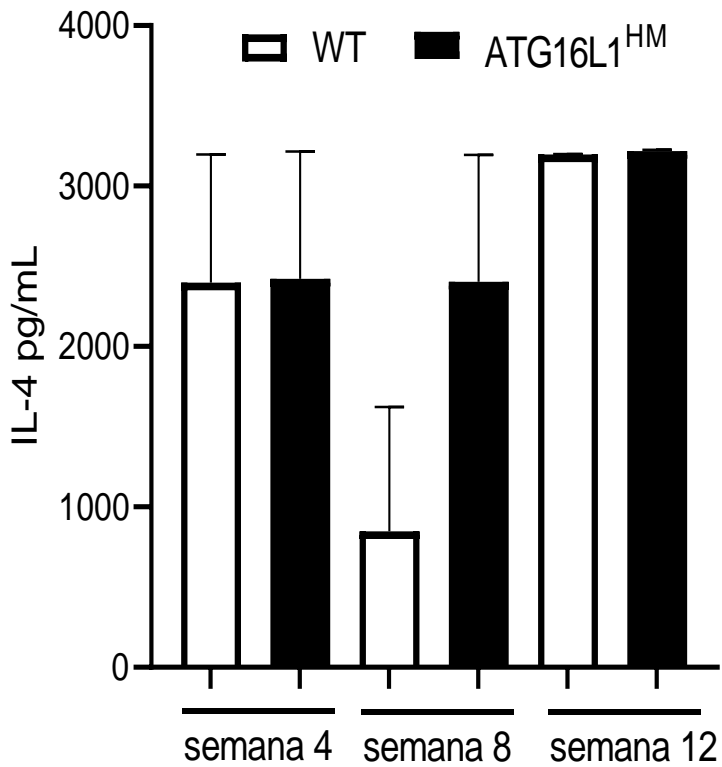


Figura 10.- Se muestran los niveles de IL-4 (A) que solo presenta diferencias marcadas durante la semana 4 con una menor cantidad de IL-4 en los sujetos WT

En caso de la IL-1 β (B) encontrados en cultivos de nódulo mesentérico en ambos grupos de ratones durante las semanas 4,8 y 12 semanas de infección respectivamente. Se encuentran variaciones en las cuales no hay diferencias significativas.

A)



B)

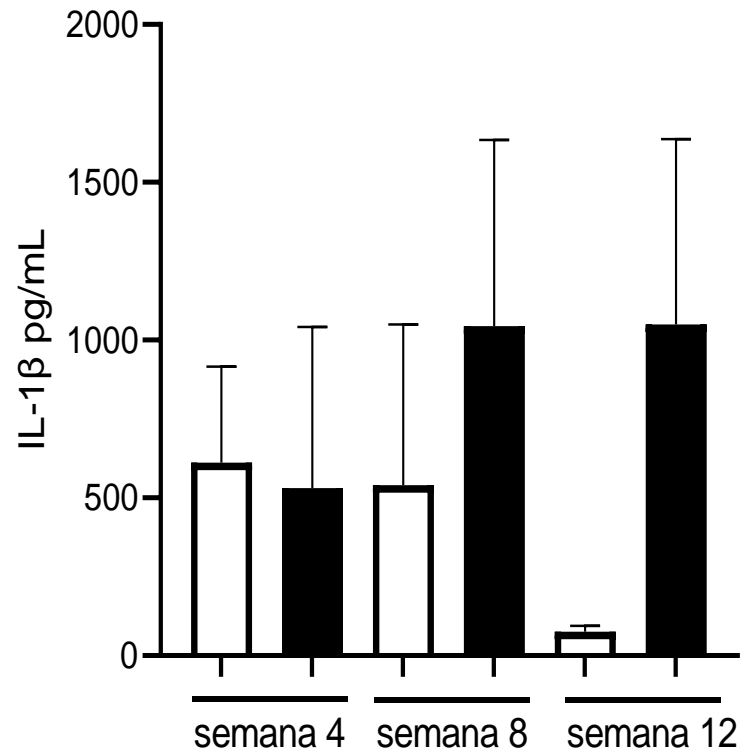


Figura 11.- Se muestran los niveles de IL-4 (A) con niveles similares entre grupos en las semanas 4 y 12 pero con una marcada diferencia en la semana 8 con una mayor cantidad de IL-4 en los sujetos ATG16L1^{HM}

IL-1 β (B) por su parte nos muestra valores similares durante las primeras 4 semanas y valores más altos en los sujetos ATG16L1^{HM} durante las 8 semanas, para finalizar con la misma tendencia pero con descenso de los niveles de IL-1 β en la semana 12.

7. DISCUSIÓN

Los resultados nos sugieren que existe una marcada diferencia entre ambos sujetos experimentales WT y aquellos de la cepa ATG16L1^{HM}, estas diferencias comienzan a partir del conteo de los cestodos obtenidos durante el lavado peritoneal los cuales nos mostraron que mientras que los ratones WT contaban con una cantidad aproximada de 225 cestodos en promedio, los ratones ATG16L1^{HM} mostraron entre 90-125 cestodos en cavidad peritoneal que los ratones WT en las primeras 4 semanas de infección esto según lo esperado. Aunque en la semana 8 los papeles fueron invertidos de tal manera que los ratones WT presentaron entre 500 a 650 metacestodos en comparación con los ATG16L1^{HM} con cantidades entre 800 a 1000 parásitos lo que nos indicaba que la ausencia de la proteína ATG16L1 tiene algún papel parcialmente importante durante estas semanas, aunque en la semana número 12 lo esperado era un crecimiento exponencial del parásito, pero por el contrario de alguna manera los ratones hipomorficos lograron contener la infestación por el metacestodo presentando una cantidad de 1300 a 1600 metacestodos en comparación con los ratones WT con 1900 a 2800 parásitos por ratón. Estos resultados nos sugieren que la proteína ATG16L1 cuenta con un papel relativamente importante durante la respuesta ante la infección con *T. crassiceps* ya que su ausencia muestra una tendencia a la proliferación del parásito, pero de alguna forma en la semana 12 de infección esta al parecer comienza a mantenerse a raya lo que nos da nuevas interrogantes en las cuales que pensar y posiblemente abordar en el futuro aunque en primeras instancia no podemos hablar del motivo de esta tendencia sin antes analizar los demás resultados.

En la citometría de flujo se buscó la presencia de los ligandos PDL1 así como la de PDL2 en primer lugar se buscó en los macrófagos los cuales nos mostraron que el 63.5% de los macrófagos en peritoneo en los sujetos pertenecientes a la cepa ATG16L1^{HM} cuentan con estos ligandos que nos dejan en claro que estos tienen una naturaleza supresora, lo cual nos puede llevar a pensar que debido a estos AAM's la respuesta inmunológica así como la distribución de los monocitos dentro de la cavidad se ve afectada de manera que la respuesta pro inflamatoria se ve reducida en gran medida, lo que resalta cual es el motivo de la acción supresora en la semana 8. Aunque la presencia de una población de macrófagos significativamente menos granulares puede tener algo que ver con la reducción de metacestodos ocurrida en la semana 12 de infección, y por esto se analizaron estas regiones de macrófagos menos granulares en la semana 4 con un 6.32% de AAM's en los ratones WT y un 15.3% en caso de los ratones ATG16L1^{HM} lo que no nos muestra una menor cantidad de AAM'S en los ratones WT pero por el contrario estos presentaron una mayor cantidad de parásitos que su contra parte ATG16L1^{HM}. Durante la semana 8 los ratones WT presentaron 32.4% de AAM's mientras que los ratones ATG16L1^{HM} presentaron un 54.9% de AAM's y en este caso si existió un aumento significativo en el número de parásitos en los ratones ATG16L1^{HM}. Lo esperado era un aumento de parásitos en los ratones ATG16L1^{HM} debido a la tendencia que presentaron y la cantidad de AAM's que presentaron, pero los resultados en el conteo de parásitos mostraron una baja en la cantidad de estos mismos, pero la citometría mostro que los ratones WT tenían un 62.2% de AAM's mientras que los ratones ATG16L1^{HM} 62.7%. Ambos grupos nos muestran cantidades similares de AAM's pero al mismo tiempo cantidades menores de

parásitos en los ratones ATG16L1^{HM} lo que nos deja aún más incógnitas sobre cuál es la piedra angular durante la reducción de parásitos en la semana 12 de infección en los sujetos ATG16L1. Al mismo tiempo se analizaron las poblaciones tanto de linfocitos B como de eosinófilos, en estas poblaciones no existe una diferencia significativa. En el caso de los linfocitos b estos no mostraron una cantidad de linfocitos b con naturaleza supresora con respecto a su contra parte experimental. En el caso de la población sucedió algo parecido debido a que la cantidad de eosinófilos hallados dentro de la cavidad no suponen una gran diferencia entre los grupos experimentales.

Los resultados más relevantes son aquellos obtenidos durante la detección de IL-15 e IL-4 donde la presencia de IL-4 en los sujetos WT fue de 2000 pg/ml en cambio los sujetos ATG16L1^{HM} fue de 7500 pg/ml lo cual es una diferencia muy marcada, esto nos deja vislumbrar que una sobre expresión de IL-4 en los sujetos hipomorficos sugiere que esta tiene un papel inmunomoduladora. Suprimiendo así la respuesta Th1 reduciendo en gran medida la respuesta inflamatoria, por otro lado la presencia de IL-15 en los sujetos C57BL/6 fue de 2500 pg/ml y por su parte los sujetos ATG16L1^{HM} presentaron 1000 pg/ml estos resultados sugieren una regulación con respecto a la respuesta inflamatoria en consecuencia a la alta presencia de IL-4 y una baja presencia por parte de IL-15 y por consecuencia un poca proliferación de células NK.

De la misma forma se analizaron muestras de suero, líquido peritoneal, ganglio mesentérico y bazo de 4,8 y 12 semanas de infección con el fin de medir IL-4 e IL-1 β . En donde los resultados no fueron tan reveladoras de manera que los sueros

presentaron niveles similares durante las primeras 4 semanas y un descenso de IL-4 en la semana 8 de infección en los ratones ATG16L1^{HM} y niveles parecidos a los de la semana 4 en los ratones ATG16L1^{HM} en donde los resultados sugieren que probablemente la semana 8 es crucial por algún factor que desconocemos que reduce la cantidad de parásitos en los ratones ATG16L1^{HM} pero los resultados de las citometría de flujo muestran que este suceso relevante no recae en los macrófagos teniendo niveles similares de AAM's . Por otro lado la medición de IL-1 β en suero dio niveles bastante igualados durante las 4 primeras semanas de infección, pero nuevamente la semana 8 nos muestra una menor cantidad de IL-1 β lo que tal vez justifica la cantidad de parásitos encontrados en los ratones ATG16L1^{HM} y su reducción en la semana 12 debido a la mayor cantidad de IL1 β encontrada en suero durante esta semana. En caso del líquido peritoneal la IL-4 en los ratones WT contaba con altos niveles de IL-4 mientras que los ratones ATG16L1^{HM} presentaban niveles muy bajos de esta interleucina y cambiando de lugares durante la semana 8 siendo los ratones ATG16L1^{HM} los que mayores niveles de esta interleucina presentaban y regresando a niveles similares en la semana 12. En el caso de IL-1 β los ratones ATG16L1^{HM} fueron los que tuvieron una mayor cantidad de esta interleucina mientras que los ratones WT presentan valores mínimos de estos mismos, lo que puede ser la respuesta a que es lo que sucede durante la semana 12 ya que es la semana en la que los niveles de IL-1 β repunta sus niveles los que podría ser una señal de respuesta inmune.

Estos resultados sugieren que nuestra hipótesis no se cumplió debido a que se esperaba que en ausencia de la proteína ATG16L1 esta misma ausencia provocara

un aumento en la inflamación debido a la baja regulación de aquellos eventos causantes de la activación de los inflamasomas como son la producción en cadena de las especies reactivas al oxígeno. Es así como se esperaba que la inflamación causada por la ausencia de la proteína autofágica ATG16L1 afectará de forma directa sobre el desarrollo del cestodo de *T.crassiceps*. En este caso la predicción no fue acertada y por consecuencia no sucedió y por el contrario el desarrollo del cestodo no se vio afectada si no que por el contrario se vio beneficiada, esto debido a la alta liberación de IL-4 la cual tiene un papel antiinflamatorio, y al suprimir la síntesis de IL-1 que tiene como tarea la activación del inflamasoma NLRP3, lo que afecta directamente las acciones contra el cestodo y no permite que la inflamación actúe de una forma eficaz. igualmente se ve reflejado en la cantidad de IL-15 medida, debido a que se encuentran en niveles bajos en aquellos ratones de la cepa ATG16L1^{HM} a comparación de su contra parte WT, estos niveles sugieren una baja activación de células NK , esto igualmente beneficia el desarrollo del cestodo.

Aunque la hipótesis no se cumplió al final del experimento corriente esta nos demostró que la proteína ATG16L1 juega un papel importante durante la infección de *Taenia crassiceps*, sin embargo ATG16L1 no es el actor principal, puesto que lo esperado era el aumento de la inflamación debido a la ausencia de ATG16L1 y con esto la pérdida de la homeostasis, pero contra lo esperado la inflamación fue regulada por otro mecanismo el cual con los resultados podríamos sugerir que se trata de la producción de interleucinas pero cuál es la ruta que se desarrolla para la liberación de interleucinas supresoras(IL-4) de la respuesta inmune(IL-15) no permitiendo así la liberación de células inmunitarias NK y al mismo tiempo suprimiendo la producción de interleucinas pro inflamatorias como es la IL-1, aunque los resultados son prometedores, una nueva pregunta se puede plantear la cual es ¿El hospedero puede mantener esa respuesta supresora inducida por el parasito?, esta pregunta es de gran interés debido a que *Taenia crassiceps* se caracteriza por estancias crónicas dentro del hospedero final. Pero ¿podría haber alguna posibilidad de que la proteína ATG16L1 sea más importante en una infección crónica? Tal vez su papel sea más importante o no en un periodo largo tiempo. Aunque los resultados son prometedores lo mejor y más posibles sería cambiar el punto de vista de abordaje con el fin de encontrar la ruta no canónica de supresión que usa el cestodo para evitar la activación del inflammasoma NLRP3 o si siquiera existe la presencia de este en los ratones de la cepa ATG16L1^{HM}. Lo que nos lleva a la modificación de nuestra hipótesis inicial y al posible cambio de esta.

Lo que nos deja finalizar con las mediciones de ambas interleucinas en el nódulo mesentérico donde los resultados no son lo suficientemente relevantes como para poder especular acerca de su papel durante la infección con niveles bastante parecidos en ambos grupos experimentales. Por otro lado los resultados de las mediciones de estas en el bazo nos muestra el mismo patrón de los resultados anteriores con niveles similares en la semana 4 una diferencia en las semana 8 en el caso de IL-4 los ratones ATG16L1^{HM} presentaron una mayor cantidad de esta interleucina y posteriormente en la semana 12 ambos grupos experimentales presentaron niveles bastante similares. La medición de IL-1 β concluyo en niveles más altos en los ratones ATG16L1^{HM} y una disminución de esta en los ratones WT. Aunque se esperaba un aumento de la inflamación debido a la ausencia de la proteína ATG16L1 esta no está presente lo suficientemente como para marcar una diferencia en el número de parásitos contabilizados, pero la presencia de IL-1 β nos lleva a pensar si es que de alguna manera esta tiene algún papel que repercuta en la respuesta ante el parasito, y si es así por que la respuesta se ve refleja de una forma tan tardía.

8. CONCLUSIÓN

Los ratones que presentan una alteración en la producción de la proteína ATG16L1 presentan números de parásitos variables dependiendo del tiempo de infección con el cestodo *T. crassiceps*

9. REFERENCIAS

- Bajagic. (2017). Structure of the WD40 domain of human ATG16L1. *science*, 1828-1837.
- Crotzer V, B. (2010). Autophagy and adaptative immunity. *Immunology. Journal immunology* , 9-17.
- Crotzer V, B. J. (2009). Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *Journal Inmunol* , 182.
- Daniel Hamaoui, A. S. (2021). ATG16L1 functions in cellular homeostasis beyond autophagy. *The FEBS journal*, 1779-1800.
- David Velasco González, D.E. (2015) Palapa [Grabado por D.V. González].México.
- Dudley. (2019). The intrinsic lipid-binding activity of ATG16L1 supports efficient membrane anchoring and autophagy. *EMBÚ*.
- Fujioka. (2010). Dimeric Coil Coil structure of *Saccharomyces cerevisiae* ATG16 and its funcional significance in autophagy. *Journal Biol Chem*, 1508-1515.
- Hubbard-Lucey. (2014). Autophagy gene Atg16l1 prevents dendritic cell-mediated lethal T-cell alloreactivity. *Inmunidad*, 579–591.
- Ishimoto, M. (2018). Autophagy and inflammation. *Annu Rev Immuno*, 73-101.
- José L. Reyes, C. A. (2010). Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps*. *Revista internacional de parasitología*, 731-742.

- Maizels, R. (1993). Immunology and evasion by helminth parasites in human populations. *Naturaleza*, 797-805.
- Maizels, R. M. (10 de 2004). *Helminth parasites: masters of regulation*. Dinamarca: Revisiones Inmunologicas. Obtenido de PubMed.gov.
- Martin. (2018). Autophagy proteins suppress protective type 1 interferon signaling in response to murine microbiota. *Microbiol Natural*, 1131-1141.
- Mizushima. (2003). The novel WD repeat protein targets the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Ciencia celular*, 1679–1688.
- Münz. (2010). Antigen processing for MHC presentation by autophagy. *F1000 Biol Report*, 4-61.
- Parkhouse. (2013). The N-terminal region of the human autophagy protein ATG16L1 contains a domain that folds into a helical structure consistent with the formation of a coiled coil. *Más uno*.
- Peña-Sanoja, M. J. (28 de 02 de 2013). *Autofagia y respuesta inmunitaria*. Caracas, Maracaibo, Venezuela.
- Rai, S. (2019). The coiled-coil and ATG5-binding domains of ATG16L1 maintain autophagy and tissue homeostasis in mice independent of the WD domain required for LC3-associated phagocytosis. *Autofagia*, 599–612.
- Samie. (2018). TRIF adapter selective autophagy regulates innate inflammatory signaling. *inmunol nat*, 246–254.

Tawill, S. (2004). Both free-living nematodes and parasites induce a characteristic Th2 response that depends on the presence of intact glycans. *Infect Immun*, 398–407.

The company of biologists. (2020). The multifaceted functions of ATG16L1 in autophagy and. *Journal of Cell Science*, 1-11.

Uhl M, K. O. (2009). Autophagy within the donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cell. *Cell Death Differ*, 991-1050.

Valdor, R. (03 de 10 de 2012). Autophagy and the regulation of the immune response. New York, Bronx, United Estate of America.

Willms, Z. (2010). *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitologia*, 335-346.