



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

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

**Ausencia del receptor de IL-4 y sus implicaciones en las
características de células inmunosupresoras durante la
infección con *Taenia crassiceps***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

Edmundo Corano Arredondo

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Jonadab Efraín Olgúin Hernández



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado 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.

El presente trabajo fue realizado en el área de Citometría de Flujo del Laboratorio Nacional en Salud de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Se financio gracias los recursos del Programa de Apoyos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección general de Asuntos de Personal Académico (DGAPA)-UNAM número IA205622, y del programa de apoyo a los profesores de carrera (PAPCA) FESI-PAPCA-2021-2022-24 de la FES Iztacala.

Así mismo recibí una beca para titulación por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONACYT) número A1-S37879, y de (PAPIIT) (DGAPA)-UNAM número IA205622.

“Uniendo todos mis sueños
me voy en busca de mis deseos,
una brújula solo retrasa las cosas
lleno de emoción tomo el timón,
si podemos encontrar el tesoro de este viejo mapa
entonces no será más una leyenda”

We are

Hiroshi Kitadani

“La tormenta viene ya
y muy pronto llegará,
el sonar de los tambores nos alcanzará,
no te vayas a rendir
es momento de vivir,
que el sol siempre volverá a salir”

Binks no Sake

Eiichirō Oda

Para mis grandes amores; Guadalupe y Alejandro,
mi hermano Alex y Jessica.
Infinitas gracias por absolutamente todo.

Agradecimientos

El ser, una de las grandes incógnitas del ser humano y que diversos filósofos han tratado de describir igualmente de diversas maneras, sin embargo; me gusta la idea de que cada uno, cada persona construye su propio significado del ser con base en sus acciones, sentimientos, creencias, vivencias, pasiones, deseos, forma de percibir esta vida y que gracias a ello; nuestra existencia es única y válida. No hay que dejar de soñar, ¡jamás!

Primera y nuevamente quiero agradecer a mis padres y mi hermano, por su apoyo incondicional durante todos estos años, por tanto amor y por enseñarme que al final de todo, el éxito no es éxito si no es compartido con la gente que más quieres.

A Jessica, muchas gracias por ser parte de mi vida y secundarme en cada situación, como dices; “no podemos lograr todo solos, hay que saber pedir ayuda cuando la necesitamos”.

Y aprovechando este espacio quiero darle gracias también a mi tío José Santos, una gran persona y buen amigo, gracias por tu apoyo y tus consejos.

Al buen Dr. Efraín, por su inmenso apoyo, paciencia y por guiarme durante todo este proceso. Asimismo le agradezco los consejos y por darme la oportunidad de trabajar bajo su tutela.

A mis compañeros del laboratorio, Eli, Vicky, Sebas y Vale, por su apoyo en la realización de este proyecto, por todas sus enseñanzas y por brindarme su amistad.

A la Dra. Imelda y al laboratorio 5, por su apoyo en la realización de diversos experimentos.

A los integrantes del sínodo:

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, por permitirme ser parte del Laboratorio Nacional y de su gran equipo de trabajo.

A la Dra. Araceli Pérez López, por su apoyo con los espacios para la realización de este proyecto.

Al Dr. José Luis Reyes Hernández, la Mtra. Margarita Vera Arias, y los anteriormente mencionados, por su valiosa orientación.

1	Índice	
1	Introducción	9
1.1	Generalidades de <i>Taenia crassiceps</i>	9
1.1.1	Ciclo de vida	10
1.1.2	Cepa ORF	11
1.2	Respuesta inmune.....	11
1.2.1	Linaje mieloide.....	12
1.2.2	Linaje Linfoide	12
1.2.3	Células T reguladoras (Tregs)	14
1.3	Respuesta inmune contra <i>T.crassiceps</i>	16
1.3.1	Macrófagos alternativamente activados (AAMs ϕ).....	17
1.4	Vía de señalización de la Interleucina-4 (IL-4)	18
1.5	Generación de ratones KO específicos de IL-4R α mediante el sistema Cre/loxP 20	
2	Antecedentes directos	21
2.1	Justificación.....	21
3	Hipótesis y objetivos	22
3.1	Hipótesis.....	22
3.2	Objetivo general	22
3.2.1	Objetivos particulares	22
4	Materiales y métodos.....	22
4.1	Animales de bioterio	22
4.2	Genotipo.....	23
4.2.1	Extracción de DNA	23
4.2.2	Cuantificación de DNA.....	23
4.2.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
4.2.4	Gel de electroforesis.....	24
4.3	Infección de ratones con <i>T. crassiceps</i>	25
4.3.1	Sacrificio de ratones	25
4.3.2	Recuento de parásitos.....	25
4.4	Citometría de flujo.....	25
4.4.1	Obtención de células del peritoneo.....	25
4.4.2	Recuento de células del peritoneo.....	25
4.4.3	Tinciones de inmunofluorescencia.....	25
4.4.4	Obtención de células de bazo.....	26

4.4.5	Cultivo de células de bazo	26
4.4.6	Cytometric bead array (CBA)	27
4.5	Análisis de muestras	28
4.5.1	Programas utilizados	28
4.5.2	Análisis estadístico	28
5	Resultados	28
5.1	Carga parasitaria	28
5.2	Análisis de células mieloides	29
5.3	Análisis de células linfoides	33
5.4	Análisis de células T reguladoras	36
5.5	Cuantificación de citocinas por CBA	38
6	Discusión y conclusiones	39
7	Anexo	48
8	Referencias	49

Resumen

La cisticercosis es una enfermedad originada por la infestación de parásitos dentro del intestino y otros sitios dentro del organismo. La infección por el parásito helminto *T. crassiceps* se caracteriza por inducir una respuesta inmune pro-inflamatoria o de tipo Th1, donde se presentan niveles elevados de IFN- γ , óxido nítrico (NO) e IgG2. Posteriormente se da un cambio en la respuesta de tipo Th1 hacia una respuesta crónica de tipo Th2, donde destaca la presencia de citocinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-13, y una participación importante de poblaciones celulares como los linfocitos T CD4⁺, macrófagos alternativamente activados o M2 y recientemente descrito, las células T reguladoras. Este cambio en la respuesta Th1 hacia una respuesta de tipo Th2, se ha asociado con la susceptibilidad a la infección y sobrevivencia del parásito. Debido a la importancia de la IL-4 durante el desarrollo de una respuesta Th2, decidimos evaluar las características fenotípicas de las células mieloides y linfoides a través de un modelo murino deficiente del IL-4R α durante la infección con *T. crassiceps*. Se infectaron hembras Balb/c WT e IL-4R α KO y 10 semanas después por medio de citometría de flujo, evaluamos células linfoides: T CD4⁺ y CD8⁺, así como sus marcadores de activación y supresión; CD25, Tim-3 y PD-1. También evaluamos el porcentaje de células Ly6G⁺, Ly6C^{hi}, Ly6C^{low}, células F4/80⁺ y sus marcadores IL-4R α , MHC-II y PD-L2. Los datos obtenidos durante nuestra investigación sugieren un incremento de células Ly6G⁺, Ly6C^{hi}, macrófagos M2 con un fenotipo supresor, un incremento de células CD8⁺ con un perfil supresor y/o anérgico, y el mantenimiento de las células Tregs. Además observamos un incremento en la producción de la citocina pro-inflamatoria TNF- α y la citocina antiinflamatoria IL-4, todo esto en ausencia del IL-4R α . Por lo tanto en ausencia de la señalización de la IL-4 se mantiene un perfil antiinflamatorio en poblaciones celulares inmunes, sugiriendo que existen mecanismos compensatorios que mantienen la infección crónica por *T. crassiceps* en el modelo murino.

1 Introducción

1.1 Generalidades de *Taenia crassiceps*

T. crassiceps (Zeder, 1800), es un parásito helminto perteneciente a la clase Céstoda y que tiene una relación sistemática cercana con *T. solium*. En su estado larvario principal o metacéstodo, se encuentra en el tejido muscular y subcutáneo, así como en la cavidad pleural y peritoneal de roedores y pequeños mamíferos, mientras que su forma adulta (Fig. 1) se encuentra principalmente en el intestino de cánidos como lobos y zorros (Willms, K. y Zurabian, R., 2009, Loos-Frank, 2000). La cisticercosis es una enfermedad originada por la infestación de parásitos dentro del intestino y otros sitios dentro del organismo (WHO, 2022), la cisticercosis murina provocada por *T. crassiceps* puede darse de forma natural mediante la ingesta de huevos producidos por la forma adulta de este parásito o bien, a través de la inoculación directa de cisticercos de manera experimental (Ruiz-Monroy *et al.*, 2013). Actualmente es muy rara en el ser humano ya que afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos o con síndromes de inmunodeficiencia (K. Heldwein, H.G. Biedermann, W.D. Hamperl, 2006), pero también se puede presentar en pacientes sanos, comúnmente en zonas rurales de países en desarrollo o con malas condiciones de higiene (Olguín J.E. y Terrazas L.I., 2021; Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, 2013).

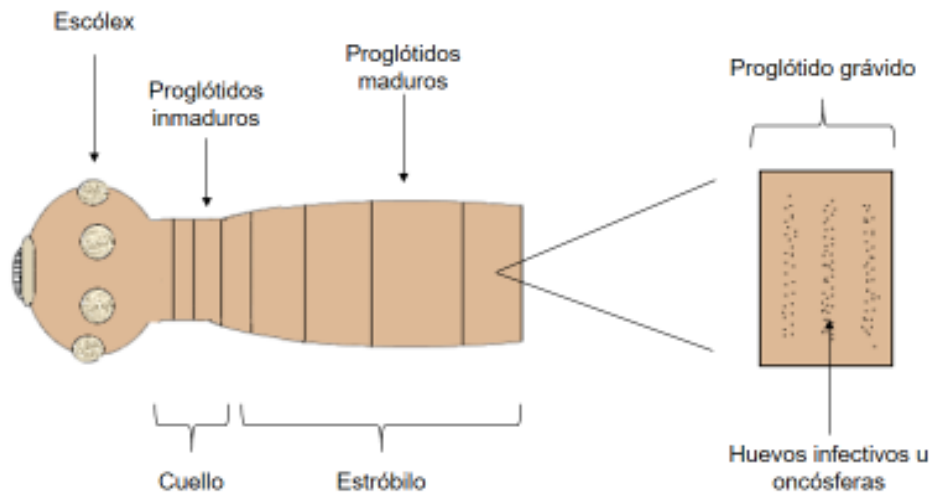


Figura 1. Morfología de *T. crassiceps*. El céstodo está conformado por un escólex; en la parte anterior, seguido del cuello y el estróbilo que contiene segmentos o proglótidos. En la parte proximal al cuello se encuentran los proglótidos inmaduros, mientras que en la parte distal del estróbilo se encuentran los proglótidos maduros, estos contienen oncósferas o

huevos infectivos que son expulsados por medio de las heces. Imagen modificada de Guerrero-García, 2019.

1.1.1 Ciclo de vida

La etapa adulta de *T. crassiceps* se encuentra en el intestino delgado de zorros, perros y otros cánidos de vida salvaje que fungen como hospederos definitivos del parásito, posteriormente éstos liberan proglótides grávidas con huevecillos infectivos por medio de las heces, que son ingeridas por roedores y son la fuente de infección. Una vez dentro del hospedero intermedio, los huevecillos u oncósferas atraviesan el epitelio intestinal, y se alojan en tejidos, en la cavidad pleural y peritoneal donde se diferencian a una etapa larval o cisticerco. La etapa larval de *T. crassiceps* puede reproducirse de forma asexual o por gemación, lo que le permite multiplicarse e incrementar la probabilidad de infección cuando éstos roedores sean ingeridos por el hospedero definitivo (Freeman, 1962; Willms, K. y Zurabian, R., 2009) (Fig. 2).

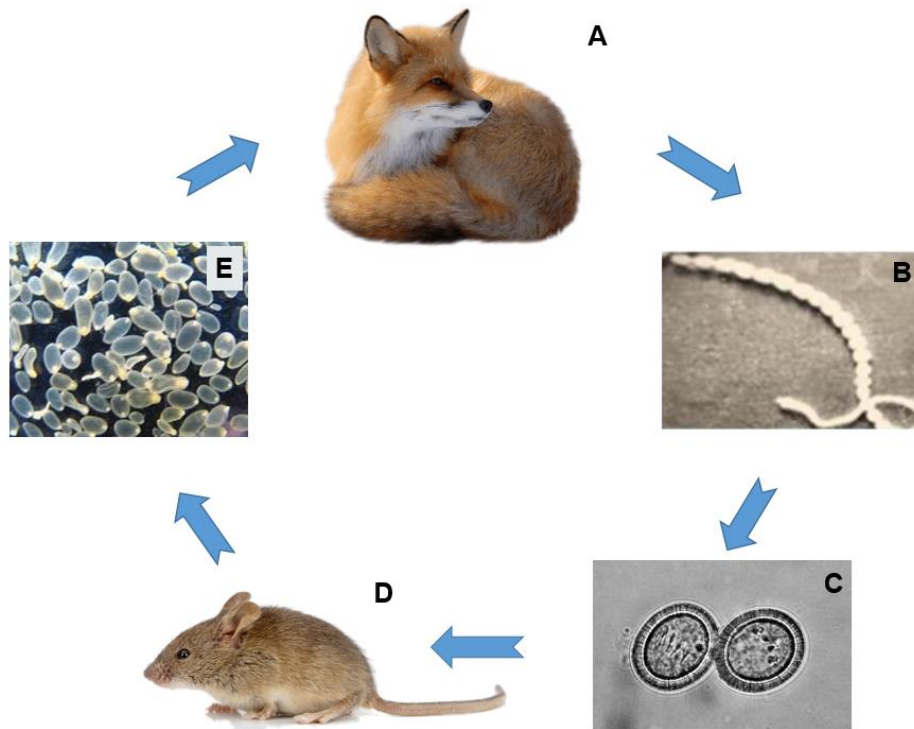


Figura 2. Ciclo de vida de *T. crassiceps*. (A) Hospedero definitivo; (B) Larva adulta en el intestino delgado del hospedero; (C) Huevos infectivos son desechados en las heces y; (D) serán ingeridos por el hospedero intermedio donde se alojaran en tejidos y se diferenciarán en; (E) metacéstodos presentes también en la cavidad pleural. El roedor

infectado será ingerido por el hospedero definitivo continuando con el ciclo. Imágenes tomadas de Willms, K. y Zurabia, R., (2009); L. Hofmanovva *et al.*, (2018).

1.1.2 Cepa ORF

Los modelos de cisticercosis con *Taenia* han permitido investigar la regulación de la respuesta inmune, así como también otros eventos moleculares y genéticos en la parasitosis. En 1952 el Dr. Reino Freeman aisló la cepa ORF de *T. crassiceps* de un zorro, en “Ontario Research Fundation”, de ahí las siglas que lleva por nombre. Esta cepa se caracteriza por presentar tasas de crecimiento significativamente más altas que otras cepas aisladas como la KBS, WFU y HYG (Dorais y Esch, 1969; Ruiz-Monroy *et al.*, 2013). Debido a su alta capacidad de reproducción por gemación en la cavidad peritoneal de ratones; la cepa ORF ha sido la más utilizada en modelos de infección experimentales para el estudio de la respuesta inmunológica. Otra característica de ésta cepa es que cuenta con una mutación genética que impide a los metacéstodos desarrollar el escólex y por ende impide también la transición a la etapa adulta (Smith *et al.*, 1972; Kenneth *et al.*, 1972; Ruiz-Monroy *et al.*, 2013).

1.2 Respuesta inmune

El sistema inmune está constituido por diferentes tipos celulares y moléculas coestimuladoras como citocinas y quimiocinas, responsables de coordinar respuestas que conducen a la eliminación de agentes patógenos o extraños en un organismo, así como también productos dañinos y células transformadas del mismo (Abbas *et al.*, 2011). Existe una gran variedad de células que conforman el sistema inmune, todas provenientes de un precursor en común; la célula troncal hematopoyética (HSC) de la medula ósea. Esta HSC da origen a los diversos tipos celulares a través de un proceso conocido como hematopoyesis, que se produce durante el desarrollo embrionario y la edad adulta (Jagannathan-Bogdan y Zon, I.L., 2013). En este proceso intervienen diversos tipos celulares y está regulado por diferentes hormonas y factores que promueven o inhiben algunas etapas del proceso (Mayani *et al.*, 2007), según sea la madurez y los mecanismo involucrados; se dará origen al tipo de célula sanguínea. A grandes rasgos, el sistema inmune está dividido en dos grandes grupos celulares: el linaje linfoide y el linaje mieloide.

1.2.1 Linaje mieloide

La generación de células mieloides es un proceso conocido como mielopoyesis, llevado a cabo en la médula ósea, en donde las células troncales hematopoyéticas (HSCs) dan lugar a los progenitores mieloides comunes (PMC). Estos PMC más adelante se pueden diferenciar hacia progenitores más específicos como progenitores gránulo-monocíticos y progenitores eritroides-megacariocíticos. Entre los genes involucrados en la diferenciación del linaje mieloide se encuentran: C/EBPa, CEBPb, y C/EBPb, RUNX1, SCL, pero destacan los genes PU.1 y Hox (John F. *et al.*, 1999). Altos niveles de PU.1 se asocian con la diferenciación granulocítica, mientras que su baja o nula expresión se asocian con una diferenciación hacia células eritroides. Los progenitores mieloides incluyen unidades formadoras de colonias gránulo-monocíticas (CFU-GM), que dan origen a unidades formadoras de colonias granulocíticas (CFU-G) y monocíticas (CFU-M). Las CFU-G dan lugar a eosinófilos, neutrófilos y basófilos, mientras que las CFU-M dan lugar a monocitos y más adelante a macrófagos, todo esto con la intervención de diferentes citocinas como la IL-3, IL-6, el factor de células seminales (SCF), entre otras (Mayani *et al.*, 2007).

Los neutrófilos forman parte de la respuesta inmune innata y son la población más abundante en circulación así como también la primera en acudir al sitio de infección. Su función principal es la opsonización y destrucción de patógenos y productos de células apoptóticas. Los basófilos, eosinófilos y mastocitos juegan un papel importante en la inmunidad innata, ya que contienen granulos citoplasmáticos que son mediadores de la inflamación (prostaglandinas, leucotrienos, ficolinas y pentraxinas) (Abbas *et al.*, 2015). Otra población celular mieloide, son las células dendríticas (DCs) ubicadas principalmente en tejidos epiteliales, las cuales migran hasta los nódulos linfáticos para presentar antígenos a células T. Existen diferentes subpoblaciones de DCs que pueden ser diferenciadas según las moléculas expresadas en su superficie, a los factores de transcripción que presenten, y por los tejidos donde se localicen (Abbas *et al.*, 2015).

1.2.2 Linaje Linfoide

La diferenciación del linaje linfoide se lleva cabo gradualmente en la médula ósea con progenitores muy primitivos, más adelante éstos dan origen a los progenitores linfoides comunes o CLPs, que darán origen a diversos tipos celulares y que son reconocidos como eficientes progenitores de linfocitos B y células NK. La generación de células linfoides es mantenida por la adquisición de progenitores linfoides a través del sistema circulatorio hacia el timo. Los precursores son células inmaduras que darán origen a las diferentes

poblaciones linfoides: TCD4⁺ y TCD8⁺. La linfopoyesis es estrictamente dependiente de la interleucina 7 (IL-7) en el timo (Mayani *et al.*, 2007). La expresión de diferentes proteínas de membrana es una característica importante para distinguir las diferentes poblaciones de células del sistema inmune. Los cúmulos de diferenciación o CD's (cluster of differentiation, por sus siglas en inglés), forman parte de una nomenclatura aplicada en la diferenciación de los diferentes subtipos o subpoblaciones de linfocitos, así como también para nombrar proteínas o marcadores de superficie de éstas células (Abbas *et al.*, 2015). Los linfocitos T, se agrupan en dos subtipos principalmente; los linfocitos T cooperadores o CD4⁺ y, los linfocitos T citotóxicos o CD8⁺, ambas son poblaciones mediadoras de la inmunidad celular y forman parte de la respuesta inmune adaptativa. Tanto las células CD4⁺ como CD8⁺, cuentan con receptores de antígeno en su superficie; llamados TCRs, que reconocen antígenos específicos a través de la interacción con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) expresado por macrófagos, células dendríticas, células B y células epiteliales, también conocidas como células presentadoras de antígeno (APC's). Esta interacción induce la secreción de citocinas en linfocitos TCD4⁺, lo que provoca la activación de otros linfocitos T, así como también de células B y macrófagos. Las células TCD8⁺ tienen la capacidad de reconocer y eliminar células infectadas con virus y otros microorganismos intracelulares a través de moléculas como la granzima y la perforina (Abbas *et al.*, 2015).

Las células NK juegan un papel importante en la respuesta inmune innata durante infecciones virales y en presencia de tumores (Gotthardt D. *et al.*, 2019). Estas son formadas a partir de progenitores linfoides y con ayuda de los factores de transcripción Id2 e Id3 (Mayani *et al.*, 2007), posteriormente viajan a tejidos linfoides secundarios para llevar a cabo su maduración y salir a la circulación. En ratón, las células NK se caracterizan principalmente por presentar un fenotipo CD3⁻CD49b⁺NKp46⁺, aunque el cambio o pérdida de alguno de estos marcadores puede distinguir a estas células en tres subconjuntos: células NK inmaduras, semimaduras y maduras (Gotthardt D. *et al.*, 2019). La maduración de estas células y la expresión de sus receptores está íntimamente relacionada con la presencia de la interleucina-15, que mantiene viables a éstas células y sostiene su proliferación (Dontje W. *et al.*, 2006), así como también interviene la regulación positiva de los receptores CD11b, CD43, KLRG1 y Ly49, además de la regulación negativa de CD27. Por otra parte, en el desarrollo de las células B los progenitores linfoides comunes dan origen a células B tempranas caracterizadas por la expresión de CD34⁺, CD19⁺ y CD10⁺ y

el BCR, este proceso está condicionado por los factores de transcripción Pax5, EBF y E2A (Mayani *et al.*, 2007). Más adelante estas células serán ubicadas en los tejidos linfoides periféricos donde cumplirán su función de reconocimiento antigénico, activación, diferenciación y posteriormente producción de anticuerpos específicos (Mayani *et al.*, 2007).

1.2.3 Células T reguladoras (Tregs)

Las células T reguladoras (Tregs) juegan un papel importante en el mantenimiento de la respuesta inmunológica y en la supresión de respuestas inmunitarias exacerbadas perjudiciales (Sakaguchi *et al.*, 2008). Muchas de las Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) tienen la capacidad de suprimir la activación, proliferación y las funciones efectoras (producción de citocinas) de otros tipos celulares incluidas las células T CD4⁺ y T CD8⁺, células NK, células B y células presentadoras de antígeno (Sakaguchi *et al.*, 2010). Las Tregs constituyen alrededor del 5-10% de las células T CD4⁺ maduras en el timo y en la periferia (Sakaguchi, 2007).

1.2.3.1 Factor de transcripción Foxp3

Las Tregs se caracterizan principalmente por la expresión del factor de transcripción forkhead box P3 (Foxp3), que es considerado un maestro regulador del desarrollo y función de dicha población, así como también es el marcador molecular más confiable para su identificación. Con base en la literatura se sabe que este factor de transcripción se expresa de forma natural en células T CD4⁺ periféricas que co-expresan CD25 (cadena- α del receptor de interleucina-2 (IL-2), generalmente expresado en células T activadas) (Sakaguchi, 2000), al igual que en timocitos CD4⁺ CD25⁺ (Sakaguchi *et al.*, 2008, 2010). Las mutaciones del gen FOXP3 pueden inducir el desarrollo de enfermedades inflamatorias, autoinmunes, y diversas patologías derivadas de la inmuno desregulación dando lugar al síndrome de poliendocrinopatía autoinmune ligado a X (IPEX) (Sakaguchi *et al.*, 2008). La transducción de Foxp3 en células T naive puede incrementar la expresión de CD25 y otras moléculas de superficie de células Tregs como el antígeno-4 asociado a células T citotóxicas (CTLA-4), suprimiendo la producción de IL-2, IFN- γ (Interferón-gamma) e IL-4 (Sakaguchi *et al.*, 2008).

1.2.3.2 Otros marcadores de superficie característicos de células Tregs y mecanismos de supresión

Existen una serie de moléculas en común expresadas constitutivamente en las diferentes poblaciones células T, y que son de gran importancia para su desarrollo, función y caracterización. En el caso de las células T reguladoras existen marcadores de gran importancia como CD25, CTLA-4 y GITR (Glucocorticoid-Induced TNF-Related, por sus siglas en inglés) (Sakaguchi *et al.*, 2006), cambios en la expresión de estas moléculas intervienen en diferentes mecanismos de desarrollo, proliferación y supresión.

El marcador CD25 (IL-2R α) es un componente del receptor de IL-2 de alta afinidad, con un papel importante en el desarrollo de Tregs. La IL-2 ha sido propuesta como la principal citocina involucrada en la proliferación y diferenciación de células T en modelos *in vitro*. Polimorfismos en los genes codificantes de las cadenas de IL-2R o moléculas transductoras de señales río debajo de dicho receptor, como STAT-5, pueden predisponer a enfermedades como la diabetes tipo 1 y otras enfermedades autoinmunes (Sakaguchi *et al.*, 2006).

Las células Tregs naturales CD4⁺CD25⁺ tanto en el timo como en la periferia, se caracterizan por la expresión constitutiva de CTLA-4 en su superficie, mientras que las células T naive la expresan únicamente después de ser activadas (Sakaguchi *et al.*, 2006). CTLA-4 compete con la molécula CD28 por los ligandos CD80/86, donde una vez unido a ellos; tiene la capacidad de desactivar a células presentadoras de antígeno. Las células Tregs expresan CTLA-4 constitutivamente en sus funciones supresoras, regulando negativamente la proliferación de otras células T así como también la producción de citocinas (Pentcheva-Hoang *et al.*, 2004). Ratones deficientes de CTLA-4 en células Tregs (Foxp3⁺), desarrollan linfoproliferación sistémica y enfermedades autoinmunes mediadas por células T, lo que sugiere fuertemente que esta molécula es necesaria para suprimir respuestas inmunes exacerbadas y mantener autotolerancia inmunológica (Wing K. *et al.*, 2008, Sakaguchi *et al.*, 2010, Sobhani *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que las células T reguladoras pueden ser activadas mediante la presentación antigénica conservando sus capacidades supresoras en estudios *in vitro*, sin embargo; la estimulación de diversas moléculas en su superficie pueden conducir a su proliferación *in vivo* e *in vitro* (Sakaguchi *et al.*, 2008). Tal es el caso de la proteína GITR; una molécula expresada de manera constitutiva en Tregs naturales y que se ha descrito

promueve su proliferación en presencia de la IL-2, aunque se sabe que otros subconjuntos de células T, células B, macrófagos y DCs también expresan GITR basalmente pero en niveles más bajos (Sakaguchi *et al.*, 2006). Independientemente del reconocimiento específico de antígenos, la Tregs tienen la capacidad de activarse por medio de receptores de tipo toll (TLRs) como el TLR 4, 5 y 8 (Sakaguchi *et al.*, 2008).

1.2.3.3 Células T reguladoras naturales e inducidas

Las Tregs son producidas en el timo como una subpoblación funcionalmente madura de células consideradas Tregs naturales, cuyo desarrollo es dependiente de diferentes mecanismos como las células estromales incluidas las células corticales y medulares tímicas, y células dendríticas (DC's), ya que se requiere una interacción de alta afinidad entre el TCR de las Tregs y el complejo MHC en la presentación de antígenos de las células tímicas estromales. Además, en el microambiente tímico, tanto la IL-2 como la IL-7 son citocinas necesarias para el desarrollo de Tregs (Sakaguchi *et al.*, 2010).

Estas células pueden también ser inducidas a partir de células T naive en la periferia mediante diferentes mecanismos, por ejemplo; la IL-2 facilita la diferenciación de células T CD4⁺ naive en células Tregs Foxp3⁺, pero inhibe su diferenciación hacia células de tipo Th17. En presencia de TGF- β y ácido retinoico, se favorece la diferenciación de linfocitos T naive a células T reguladoras, así como también la secreción de IL-10 y TGF- β por células Tr1 y la secreción de TGF- β por células denominadas Th3 (Sakaguchi *et al.*, 2008).

1.3 Respuesta inmune contra *T. crassiceps*

La cisticercosis causada por *T. crassiceps* tiene la capacidad de estimular el sistema inmune a través de diversas moléculas como lo son antígenos, proteínas, glicoproteínas y lípidos propios del parásito (Ruiz-Monroy *et al.*, 2013). Esta infección puede tender a la cronicidad y por ende llevar a la sobrevivencia del parásito por largos periodos, en los cuales están inmersos diversos mecanismos inmunitarios de tipo humoral y celular (Restrepo, B.I. *et al.*, 2001). Durante la infección causada por *T. crassiceps*, se induce una respuesta inmune aguda pro-inflamatoria o denominada respuesta de tipo Th1, que se caracteriza por presentar niveles elevados de IFN- γ , óxido nítrico (NO) e IgG2, esto durante las primeras 2 a 3 semanas de la infección (LI Terrazas, R. Bojalil, T. Govezensky y C. Larralde, 1998). Más adelante se da un cambio en la respuesta de tipo Th1 hacia una respuesta crónica o de tipo Th2, caracterizada principalmente por la secreción de citocinas antiinflamatorias

como la IL-6, IL-9, IL-10, IL-25, IL-33 y el factor de crecimiento β (TGF- β), pero las más importantes son la IL-4 y la IL-13. La secreción de dichas citocinas influye en el aumento de linfocitos TCD4⁺ diferenciados en subpoblaciones Th2 y con base en la literatura, de células T reguladoras (Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, 2013), sin embargo, hallazgos de nuestro laboratorio sugieren una reducción importante de las células T reguladoras en las fases crónicas en el sitio de infección (Hernández-Gómez, 2022). Esto también influye en el incremento de los niveles de IgG1 y el incremento de células plasmáticas productoras de IgE, lo que permite el reclutamiento de mastocitos, eosinófilos, basófilos y neutrófilos. Este cambio en la respuesta Th1 hacia una respuesta de tipo Th2, se ha asociado con la susceptibilidad a la infección y sobrevida del parásito (Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, 2013; D. Voehringer *et al.*, 2007).

1.3.1 Macrófagos alternativamente activados (AAMs ϕ)

Se han descrito dos fenotipos de macrófagos involucrados en procesos de inmunorregulación durante la cisticercosis experimental murina. El primero de ellos son los macrófagos activados clásicamente, que son activados a través de la estimulación del receptor tipo toll (TLR) mediante moléculas derivadas de bacterias, virus y protozoos; como son lipopolisacáridos (LPS's) y péptidoglicanos. También pueden ser activados con IFN- γ , el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la IL-1 β , que son citocinas secretadas durante respuestas pro inflamatorias (Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, 2013). Estos macrófagos clásicos presentan capacidades fagocíticas y microbicidas, además; expresan la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que es la principal enzima involucrada en la síntesis de NO, y también, pueden secretar citocinas pro inflamatorias como la IL-1 β , IL-12, IL-23 y TNF- α (Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, 2013).

Por otro lado, los macrófagos alternativamente activados o AAMs ϕ son una población de macrófagos descrita e investigada recientemente ya que juegan un papel importante en la inducción de la respuesta Th2 durante la cisticercosis experimental con *T. crassiceps* y durante infecciones por helmintos en general (Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, 2013). Este fenotipo de macrófagos es inducido por citocinas como la IL-4 e IL-13 a través de la estimulación del receptor IL-4-alfa (IL-4R α) (M. Stein, S. Keshav, N. Harris y S. Gordon, 1992), aunque también se ha visto que algunos antígenos de helmintos pueden inducir la activación de AAMs ϕ independientemente del estímulo con IL-4. Los AAMs ϕ se caracterizan por la secreción de citocinas como la IL-10, TGF- β y presentan niveles bajos de citocinas pro inflamatorias, también expresan Arginasa-1 (arg-1) que presenta mayor

afinidad que la iNOS por el sustrato común L-Arginina, Resistin-like molecule alpha (RELM- α), receptor de manosa de macrófagos (MMR), y el ligando de muerte programada-1 y 2 (PD-L1/2) (JL Reyes y LI Terrazas, 2007). Los AAMs ϕ tienen una baja capacidad para inducir respuestas proliferativas de antígeno en células T y están presentes en la mayoría de infecciones por helmintos y se ha demostrado en los últimos años que ésta población celular está involucrada en mecanismos de supresión mediados por la expresión de moléculas como el ligando de muerte programada-2 (PD-L2) (LI Terrazas, D. Montero, CA Terrazas, JL Reyes y M. Rodríguez-Sosa, 2005), que pueden suprimir la proliferación de células linfoides, esto se ha asociado con un aumento en las cargas parasitarias durante la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps* (Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, 2013).

1.4 Vía de señalización de la Interleucina-4 (IL-4)

La interleucina-4 es una citocina producida por células T cooperadoras de tipo Th2 en respuestas derivadas de la activación del TCR y se ha descrito que los eosinófilos activados pueden también producir IL-4 (Gessner A. *et al.*, 2005). Esta citocina participa en la diferenciación de células T cooperadoras hacia un perfil Th2, que producen citocinas como la IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, además también puede regular el cambio de clase de las inmunoglobulinas hacia el isotipo IgE en células plasmáticas. La transducción de señales activada por la IL-4 regula diferentes mecanismos como el crecimiento celular, la supervivencia y la expresión génica (Kelly-Welch *et al.*, 2005).

La IL-4 tiene la capacidad de estimular dos complejos de receptores; de tipo I y de tipo II. La unión de la IL-4 con IL-4R α induce la heterodimerización con la cadena gamma común (γ C), que forman el complejo de tipo I en células hematopoyéticas, mientras que la IL-13 α 1 forma el complejo de tipo II en células del linaje mieloide, como macrófagos, eosinófilos, entre otros tipos celulares. Esta dimerización activa las proteínas Janus Kinases (Jaks) que están asociadas con las colas citoplasmáticas de estos receptores. Jak1 y Jak3 son activadas por los receptores de tipo I, mientras que los receptores de tipo II activan a Jak1, Jak2 y Tyk2 (Kelly-Welch *et al.*, 2005).

Los residuos de tirosina en la cola citoplasmática de IL-4R α se fosforila y sirven como sitios de acoplamiento para diferentes moléculas de señalización. El residuo 2 de tirosina interactúa con el dominio SH2 del transductor de señal y factor de transcripción 6 (STAT6), una vez fosforilado, STAT6 se dimeriza, viaja al núcleo donde se une y promueve los genes que codifican para CD23 y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II (Nelms K. *et al.*, 1999). STAT6 puede actuar como un activador o supresor de la transcripción dependiendo del gen diana, y del estado de activación de la célula. En linfocitos primarios, STAT6 juega un papel importante en la proliferación y protección de la apoptosis (Wurster A.L, *et al.*, 2002).

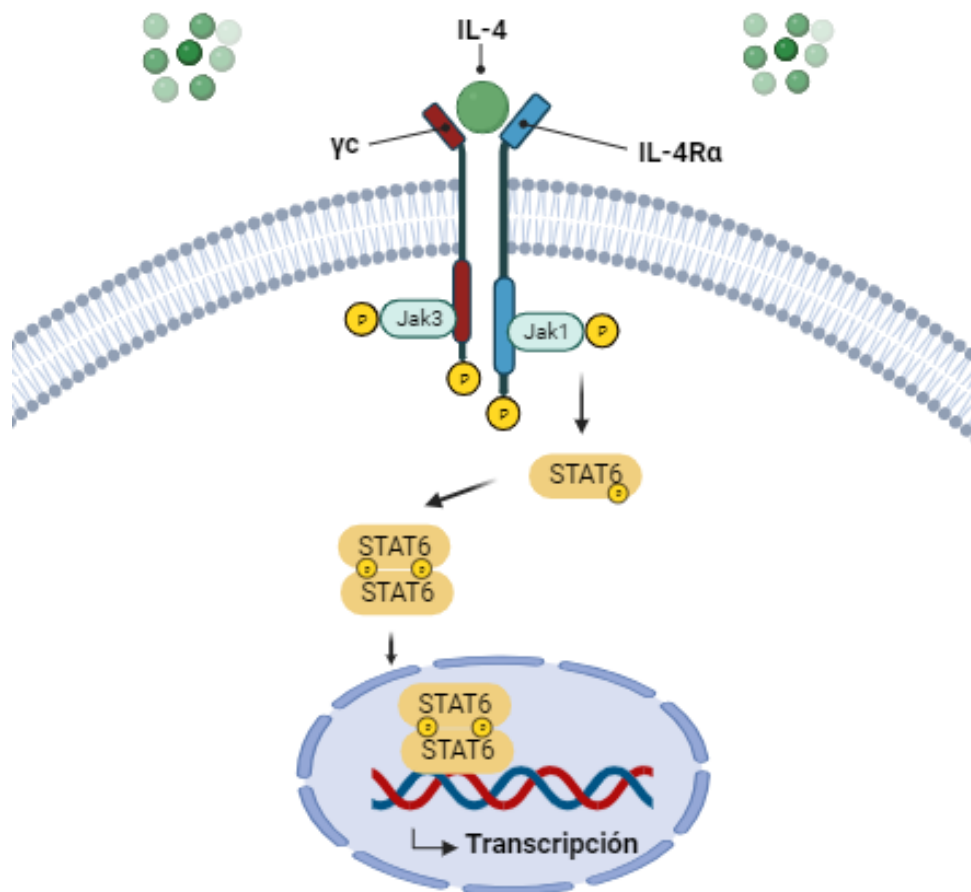


Figura 3. Vía de señalización de la interleucina-4. La unión de la IL-4 con el complejo de receptores IL-4R α y γ C promueve la fosforilación de las proteínas Jaks en las colas citoplasmáticas del receptor. Posteriormente se fosforila el factor de transcripción STAT6, se dimeriza y migra al núcleo donde promueve la expresión de genes asociados a la IL-4. Imagen original realizada en el editor BioRender™.

1.5 Generación de ratones KO específicos de IL-4R α mediante el sistema

Cre/loxP

Recientemente se han buscado diferentes métodos que ayuden a entender los mecanismos implicados en la diferenciación de macrófagos hacia un perfil clásico o alternativo así como también las moléculas relacionadas en su funcionamiento. Con base en lo descrito por Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, (2013), se sabe que los macrófagos activados alternativamente juegan un papel importante durante la infección con *T. crassiceps*, asimismo se conoce que esta población celular es inducida por citocinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-13 principalmente. El sistema Cre/loxP permite la generación de ratones deficientes de diversos receptores, moléculas de superficie y la delección de genes específicos en algunas poblaciones celulares, esto a partir de recombinación homóloga de células madre embrionarias y usando el sistema de recombinación Cre/loxP (Brombacher *et al.*, 2009). Para fines de la presente tesis, se generaron ratones Knock out específicos de IL-4R α (cadena-alfa del receptor de Interleucina-4) en macrófagos mediante el modelo Cre/LoxP (ver descripción en la Figura 4), con intención de lograr la caracterización del fenotipo y funcionalidad de esta población celular. Asimismo, los resultados obtenidos contribuyeron a un mejor entendimiento de los mecanismos inmunológicos dependientes de la Interleucina 4 y el papel de los macrófagos alternativamente activados durante la cisticercosis experimental murina.

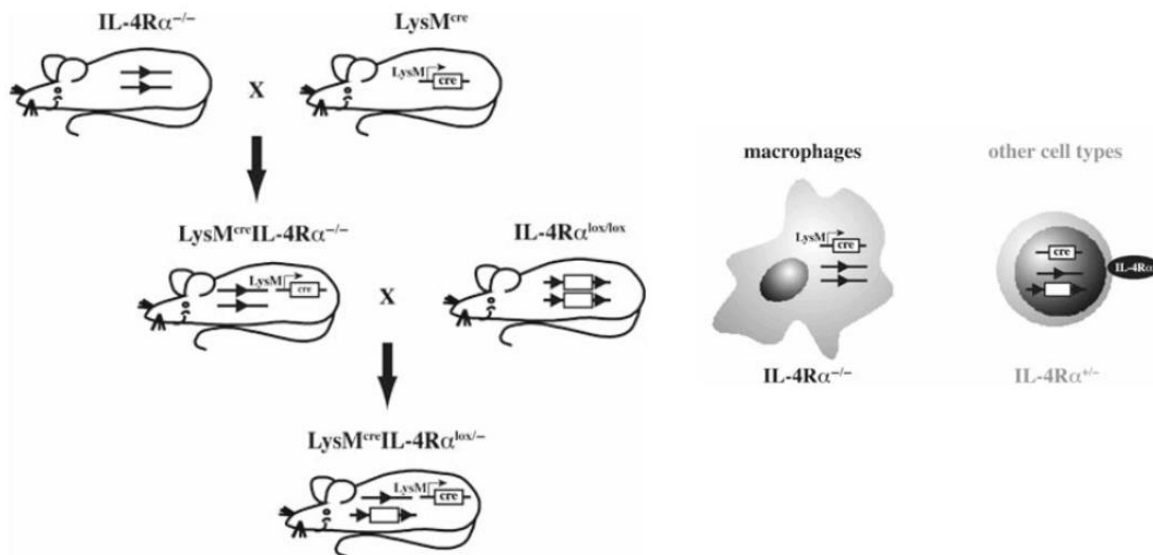


Figura 4. Principio de delección específica de IL-4R α en macrófagos. Los ratones $IL-4R\alpha^{lox/-}$ son generados mediante recombinación homóloga, en estos, los exones de $IL-4R\alpha$ son “flanqueados” por dos sitios loxP (triángulos) que son reconocidos por la recombinasa

Cre. Aquellos ratones que expresan específicamente la recombinasa Cre en macrófagos bajo el control del promotor de la lisozima M (ratones LysMcre) fueron entrecruzados con ratones IL-4R α ^{-/-} globales para evitar herencia no Mendeliana o actividad aberrante de Cre. Para facilitar la recombinación eficiente de Cre, los ratones LysM^{cre} IL-4R α ^{-/-} fueron cruzados con ratones IL-4R α ^{lox/lox} condicionales. Esto cuando la recombinasa Cre solamente es expresada en macrófagos de ratones hemicígotos LysM^{cre} IL-4R α ^{lox/-}. LoxP flanquea los exones del locus IL-4R α sobre un alelo y es eliminado solo en este tipo de células. Los ratones hemicígotos son utilizados debido a que se reduce el sustrato para la enzima e incrementa la eficiencia en la delección mediada por Cre en macrófagos. En otro tipo de linajes celulares (epiteliales y linfoides) la enzima es activa y todavía se expresa IL-4R α funcional. Figura tomada de Brombacher, (2009).

2 Antecedentes directos

Durante la cisticercosis por *T. crassiceps*, el IFN- γ juega un papel importante en la inducción de una respuesta pro inflamatoria o de tipo Th1 asociada a la protección, la ausencia de esta citocina se asocia con altas cargas parasitarias o bien, con la susceptibilidad a la infección. A su vez estos procesos promueven un microambiente supresor por la participación de células mieloides, en específico macrófagos; que expresan en su superficie marcadores de supresión como el ligando de muerte programada-2 (PD-L2). Esto sugiere que el aumento en la expresión de PD-L2 es dependiente del IFN- γ (Hernández-Gómez, 2022), asimismo; esta noción nos llevó a investigar cuál es el papel de la IL-4 en la inmunosupresión mediada por macrófagos, células T reguladoras, células mieloides (neutrófilos y monocitos), así como posiblemente la participación de linfocitos T. La idea no es quedarse únicamente con el estudio de la respuesta inmune en consecuencia a la infección por *T. crassiceps*, sino extrapolar éstos conocimientos al estudio de enfermedades crónicas degenerativas.

2.1 Justificación

Durante la cisticercosis causada por *T. crassiceps*, el parásito helminto tiene la capacidad de polarizar la respuesta inmune generada por el hospedero hacia una respuesta de tipo Th2, donde se ha resaltado la importancia de algunas poblaciones celulares como los macrófagos alternativamente activados y las células T reguladoras debido a sus capacidades supresoras, así como la participación de la IL-4 en los procesos anti-inflamatorios, sin embargo estos mecanismos no han sido del todo descritos. El estudio de la respuesta inmune a través de la descripción de células del linaje linfóide y mielóide en

ausencia del IL-4R, puede generar conocimiento acerca de los mecanismos de regulación e inmunosupresión presentes durante las infecciones por helmintos.

3 Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

La ausencia del IL-4R α evitará la inducción de una respuesta Th2 durante la infección crónica, debido a que no habrá una diferenciación tanto de macrófagos hacia un perfil M2 como de células linfoides con características supresoras. Esto favorecerá la persistencia de una respuesta inmune pro inflamatoria, llevando a la eliminación del parásito.

3.2 Objetivo general

Determinar si las células del linaje mieloide y linfóide expresan un fenotipo supresor durante la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps* en ausencia del receptor IL-4R α .

3.2.1 Objetivos particulares

- Cuantificar la carga parasitaria.
- Registrar el peso de los ratones durante el proceso de infección.
- Analizar el porcentaje total de células Ly6C^{hi}, Ly6C^{low} y Ly6G⁺.
- Analizar las células F4/80+ y su expresión de los marcadores de superficie IL-4R α , MHC-II y PD-L2.
- Analizar el porcentaje total de células CD4⁺, CD8⁺ y Tregs, así como su expresión de marcadores de activación y supresión: CD25, Tim-3 y PD-1.
- Cuantificar citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias por CBA

4 Materiales y métodos

4.1 Animales de bioterio

Se utilizaron ratones hembra BALB/c (Foxp3 Knock in/ IL-4R α Knock Out globales y Cre/loxP IL-4R α -/+), de 8 a 10 semanas y 18 g de peso. Las cruces se mantuvieron en reproducción en cajas de policarbonato con aserrín; bebederos y alimento estériles. Fueron marcados de las orejas para llevar su control e identificación así como también se registró su peso semanalmente durante la infección y hasta el día del sacrificio.

4.2 Genotipo

4.2.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizaron fragmentos de aproximadamente 5 mm de cola de los ratones, mismas se colocaron en tubos eppendorf previamente etiquetados. Se adicionaron 500 μ l de buffer para Proteinasa K (ver anexo), 60 μ l de Proteinasa K [1mg/ml (ThermoFisher)] y se dejaron reaccionar durante 4 a 6 horas para disgregar el tejido en un Thermoshaker (MRC Lab). Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12,500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se extrajo el precipitado y se colocó en tubos eppendorf en donde se añadieron 500 μ l de isopropanol frío por muestra. Se agitó por inmersión. Nuevamente se centrifugaron las muestras bajo los mismos parámetros ya mencionados, se decantaron las muestras retirando únicamente el sobrenadante, después se realizó un lavado con etanol al 80% (1 ml por muestra), se agitó por inmersión y se centrifugó nuevamente. Finalmente se decantaron las muestras para obtener la pastilla de DNA, se dejó secar por 30 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 75 μ l de H₂O de grado biología molecular. El proceso descrito anteriormente se realizó bajo condiciones de aislamiento en una campana de flujo.

4.2.2 Cuantificación de DNA

La concentración de ácidos nucleicos [ng/ μ l] se llevó a cabo mediante un NanoFotómetro NP80 Implen, utilizando H₂O de grado biología molecular como blanco y 1 μ l de cada muestra, esto con el fin de establecer la cantidad de DNA a emplearse para la reacción de PCR.

4.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El genotipo de los ratones se realizó mediante una PCR punto final.

Para el Master mix se utilizaron 6.5 μ l de Taq polimerasa (Master mix red A180301), 1 μ l de los primers (LoxPF/LoxPR, CreF/CreR e IL-4R α F/IL-4R α R según el genotipo de interés), 1.5 μ l de Magnesio, 14 μ l de H₂O de grado biología molecular y 1 μ l de DNA previamente extraído. Todo esto para un volumen final de 25 μ l por muestra. La reacción de PCR se llevó a cabo en el Termociclador bajo los siguientes parámetros:

	Gen	Secuencia (5'--- 3')	PM del producto (pb)
IL-4Rα KO	Neomicina Forward	GGC TGC TGA CCT QQA ATA ACC	471
	Neomicina Reverse	CCT TTG AGA ACT GCG GGC T	471
	IL-4R α Forward	TGA CCT ACA AGG AAC CCA GGC	600
	IL-4R α Reverse	CTC GGC GCA CTG ACC CAT CT	600
CreLoxP	loxP Forward	CCC TTC CTG GCC CTG AAT TT	188
	loxP Reverse	GTT TCC TCC TAC CGC TGA TT	188
	Cre Forward	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC	700
	Cre Reverse	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG	700

Tabla 1. Primers utilizados en la determinación de los diferentes genotipos.

	Temperatura	Tiempo
IL-4Rα KO/ Cre/loxP	95 °C	120 s
	95 °C	30 s
	58/60°C	30 s
	72°C	30 s
	72°C	300 s
	4 °C	∞
	35/40 ciclos	

Tabla 2. Parámetros de temperatura y tiempo utilizados en el Termociclador para la reacción de PCR. Para los genotipos IL-4R α KO y LoxP la T_m utilizada fue de 58°C por 35 ciclos, mientras que en el caso del genotipo Cre fue de 60°C y 40 ciclos.

4.2.4 Gel de electroforesis

El gel de agarosa se preparó con 0.9 g de agarosa 1.5%, 60 ml de TBE al 1x y 1.5 μ l de Bromuro de Etidio (BrEt). Se colocó en la cámara de electroforesis con TBE al 1x y se cargaron las muestras utilizando 2 μ l de buffer de carga y 8 μ l de la muestra con DNA. Se corrió a 100 voltios durante 40 minutos.

4.3 Infección de ratones con *T. crassiceps*

Para la infección de los ratones se cargaron jeringas para tuberculina (BD®) con diez parásitos; una para cada ratón y se inyectaron por la vía intraperitoneal.

4.3.1 Sacrificio de ratones

Una vez transcurridas diez semanas de la infección, se seleccionaron los ratones infectados y los ratones del grupo control para sacrificio. Los ratones se anestesiaron con sevoflurano y se les realizó dislocación cervical.

4.3.2 Recuento de parásitos

Previo al sacrificio de los ratones infectados, se obtuvo el número de parásitos, para lo cual se inyectaron 5 ml de solución salina de forma intraperitoneal, se agitó el peritoneo y se recuperó el mismo volumen. Posteriormente, se tomó 1 ml en una caja Petri, para realizar el registro de la carga parasitaria. Por último, se realizaron los cálculos para obtener el número total de parásitos en el volumen total.

4.4 Citometría de flujo

4.4.1 Obtención de células del peritoneo

Se inyectaron 9 ml de solución salina en el peritoneo de los ratones, mismos que se extrajeron posteriormente y se colocaron en tubos falcon de 15 ml. Posteriormente se nivelaron los tubos utilizando solución salina y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de solución salina. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

4.4.2 Recuento de células del peritoneo

Se realizó el conteo de células vivas en un contador de células automatizado Countess II FL (ThermoFisher). Se realizaron los cálculos correspondientes para obtener un volumen de solución salina con un millón de células.

4.4.3 Tinciones de inmunofluorescencia

Se tomaron un millón de células vivas de cada muestra para las diferentes tinciones, se elaboraron tres paneles; tinción de células mieloides, macrófagos y células linfoides. Para células mieloides se utilizaron los anticuerpos anti-F480, anti-IL-4R α , anti-CD11b, anti-Ly6C y anti- Ly6G. En el caso de macrófagos, las células se trataron con anticuerpo anti-CD16/32 durante media hora a 4°C en oscuridad, y posteriormente con anti-F4/80, anti-CCR2, anti-

PD-L2 y anti-MHC II. Las células linfoides se tiñeron con anti-CD4, anti-CD8, anti-Tim-3, anti- PD-1, y anti-CD25 (Tabla 3). Todas las células se incubaron a 4°C por 30 minutos, posteriormente las muestras fueron analizadas mediante el citómetro de flujo Attune NxT (ThermoFisher).

Tinción	Anticuerpo	Fluorocromo	Clona	Marca
Células linfoides	CD4	BV421	GK1.5	Biologend
	CD8	BV605	53-6.7	Biologend
	PD-1	PE	J43.1	TONBO biosciences
	Tim-3	APC	RMT3-23	TONBO biosciences
	CD25	BV711	PC61	Biologend
	CD3	PerCP	145-2C11	Biologend
Macrófagos	CD16/32	---		
	F4/80	APC	BM8	Biologend
	PDL2	PE	TY25	Biologend
	MHC-II	APC Fire	MS/114.15.2	Biologend
Células mieloides	F4/80	APC	BM8	Biologend
	CD11b	PECy5	M1/70	Biologend
	Ly6C	FITC	HK1.4	Biologend
	Ly6G	APC Cy7	1A8	Biologend
	IL-4R α	PE	I014F8	Biologend

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en las diferentes inmunofluorescencia de células de peritoneo.

4.4.4 Obtención de células de bazo

En una caja Petri estéril se maceró el bazo y se añadió solución salina para su obtención, dicha solución se colocó en tubos falcon de 15 ml y se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 5 minutos. Posterior a esto se decantó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 5 ml de solución salina. Las muestras se manipularon estrictamente en la campana de flujo, manteniendo una temperatura de 4 °C.

4.4.5 Cultivo de células de bazo

Se preparó una placa de 96 pozos con anti-CD3 a una concentración de 5 μ g/ml por pozo y se dejó toda la noche a 4°C en oscuridad. Después, se retiró la solución restante en cada pozo. En la placa se sembraron 2×10^5 células de bazo obtenidas previamente, y se colocaron con 200 μ l de medio RPMI suplementado, esto se hizo por muestra y en

duplicado. La placa con las células bajo estimulación se dejó en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, la placa se almaceno a -70°C para su posterior uso en la técnica de CBA.

4.4.6 Cytometric bead array (CBA)

Es una técnica que permite la cuantificación de proteínas de pequeño tamaño como las citocinas. En este ensayo utilizamos perlas de diferentes tamaños, las que se pueden caracterizar por su capacidad de dispersión de la luz y fluorescencia. Cada perla cuenta con una intensidad de fluorescencia única, que sirve para capturar una citocina en específico, éstas se acoplan mediante un anticuerpo de detección con emisión específica en longitud de onda que, en una mezcla permite cuantificar las concentraciones de diferentes citocinas simultáneamente. La fluorescencia de cada perla es proporcional a la concentración de la citocina. La emisión de la fluorescencia de cada perla es proporcional a la concentración del analito. Se utiliza una curva de calibración para determinar la concentración de cada citocina o proteína en la muestra mediante un software de análisis de CBA.

La placa se descongeló a temperatura ambiente, y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, posterior a esto; se recuperaron 50 ml del sobrenadante de cada pozo y se colocaron en microtubos de fondo redondo. Se colocó el Stock de perlas estándar en un tubo de 15 ml. Se utilizaron ocho tubos para citometría con 300 µl de diluyente de ensayo y se realizaron las siguientes diluciones utilizando el stock de perlas; 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y, un tubo conteniendo únicamente el diluyente de ensayo como control negativo. Posteriormente se realizó un mix de perlas, donde se agregaron 10 µl de cada perla de captura por cada muestra y se mezclaron en el vórtex. Se agregaron 10 µl de la solución por cada tipo de perla en cada muestra seguido de 50 µl de los anticuerpos de detección. Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación y en oscuridad. Pasado este tiempo se agregó 1 ml de solución de lavado a cada muestra y se centrifugaron a 200 g durante 5 min, se decantaron las muestras y el pellet se resuspendió en 300 µl de solución de lavado para su adquisición en el citómetro de flujo, con base en los ajustes propuestos por el mismo kit.

4.5 Análisis de muestras

4.5.1 Programas utilizados

El revelado de los geles de electroforesis se llevó a cabo mediante el sistema Gel Doc™ Ez imager (BIO-RAD) y se visualizó el amplificado utilizando el software ImageLab™. Las muestras obtenidas por inmunofluorescencia y por CBA, fueron adquiridas en el citómetro de flujo Attune NxT bajo el software Attune y posteriormente fueron reanalizadas mediante el programa FlowJo v10. Los estadísticos y gráficos fueron obtenidos mediante el programa GraphPad Prism versión 7.

4.5.2 Análisis estadístico

Los datos estadísticos se obtuvieron mediante ANOVA de un factor, y posteriormente con una prueba de comparación múltiple de Tukey, esto con una confiabilidad del 95% y tomando el valor de p: * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

5 Resultados

5.1 Carga parasitaria

Al transcurrir las diez semanas de infección se obtuvieron y contaron los metacístodos de *T. crassiceps*. Existe una diferencia significativa en el número de metacístodos en los ratones IL-4R α KO con respecto a los ratones WT y Cre/loxP (Fig. 5A), siendo los ratones IL-4R α KO los que presentaron la mayor carga parasitaria así como también un mayor porcentaje de peso a lo largo y al final de la infección (Fig. 5B). Estos datos sugieren que los ratones deficientes de IL-4R α son más susceptibles a la infección con *T. crassiceps* que los ratones WT y Cre/loxP.

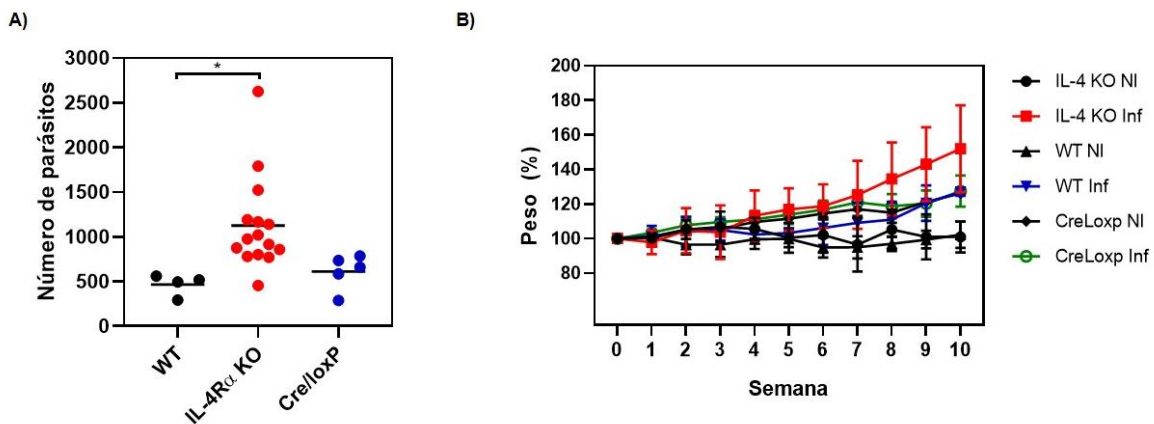


Figura 5. Existe una mayor carga parasitaria e incremento en el porcentaje de peso en ratones IL-4R α KO al final de la infección con *T. crassiceps*. A) Gráfica de datos totales de carga parasitaria. B) Gráfica de datos totales de porcentaje de peso. Se registró

semanalmente el peso de los ratones, el peso del día cero se tomó como el 100% y con base en eso se obtuvieron el resto de los datos de porcentaje. Datos recopilados de 6 experimentos independientes. * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

5.2 Análisis de células mieloides

Siguiendo con los objetivos se determinó la participación de poblaciones celulares del linaje mieloides durante la cisticercosis experimental con *T. crassiceps*. Para dicho análisis se seleccionaron los singlets, posteriormente se analizaron las células de mayor tamaño y granularidad, y finalmente se determinaron marcadores específicos para las poblaciones de monocitos clásicos o proinflamatorios; $CD11b^+Ly6C^{hi}$ y monocitos no clásicos; $CD11b^+Ly6C^{low}$, así como los marcadores para células granulocíticas o neutrófilos $CD11b^+Ly6G^+$. Además, se analizó la población de macrófagos ($CD11b^+F4/80^+$) y su porcentaje de expresión del $IL-4R\alpha^+$ (Fig. 6).

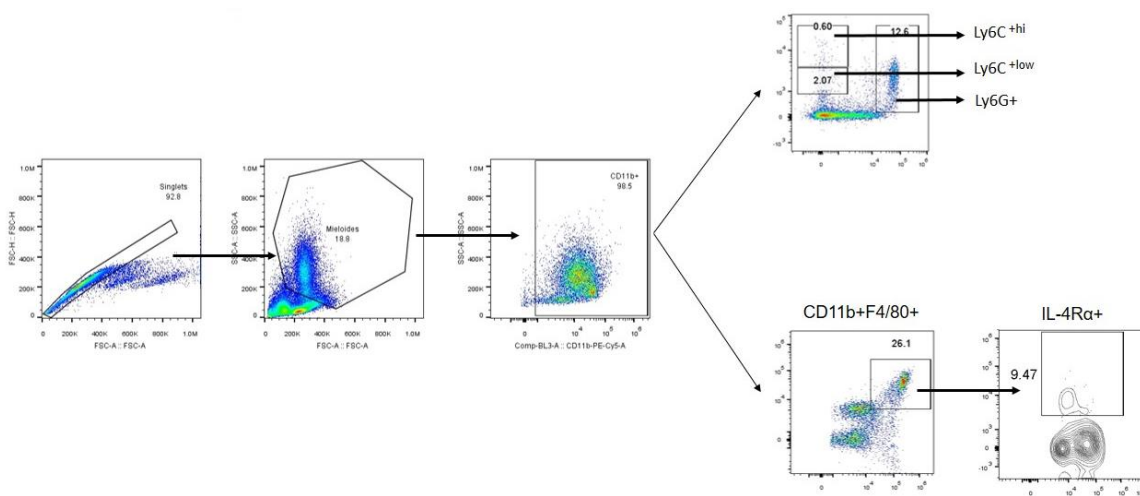


Figura 6. Estrategia de análisis de células mieloides mediante citometría de flujo. Dot-plots representativos de células $CD11b^+Ly6C^{hi}$, $CD11b^+Ly6C^{low}$, $CD11b^+Ly6G^+$ y $CD11b^+F4/80^+IL-4R\alpha^+$.

Se observó un porcentaje de células granulocíticas significativamente mayor en los ratones infectados con respecto a sus controles (Fig. 7B). La presencia de monocitos clásicos $CD11b^+Ly6C^{hi}$ fue significativamente mayor en el grupo de ratones $IL-4R\alpha$ KO infectados, y una tendencia al aumento en el porcentaje de monocitos no clásicos en ambos grupos experimentales, mientras que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de ambas poblaciones celulares en ratones WT (Fig. 7B). Esto sugiere que hay una participación importante de poblaciones celulares como neutrófilos, monocitos clásicos y no clásicos en

el sitio de infección en ausencia del IL-4R α durante la cisticercosis experimental con *T. crassiceps*.

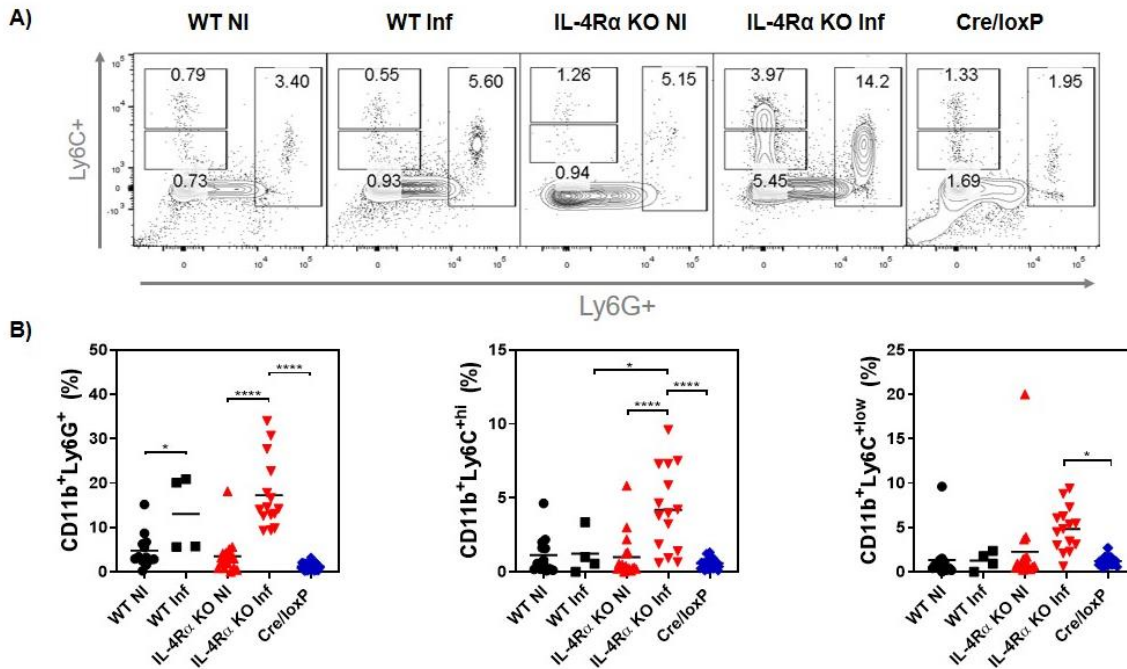


Figura 7. Existe un aumento en el porcentaje de granulocitos, monocitos clásicos y no clásicos en ausencia del IL-4R α durante la infección con *T. crassiceps*. A) Dot-plots representativos del porcentaje total de células CD11b⁺Ly6C⁺ hi, CD11b⁺Ly6C^{low} y CD11b⁺Ly6G⁺. B) Gráficos de datos totales recopilados de 6 experimentos independientes. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

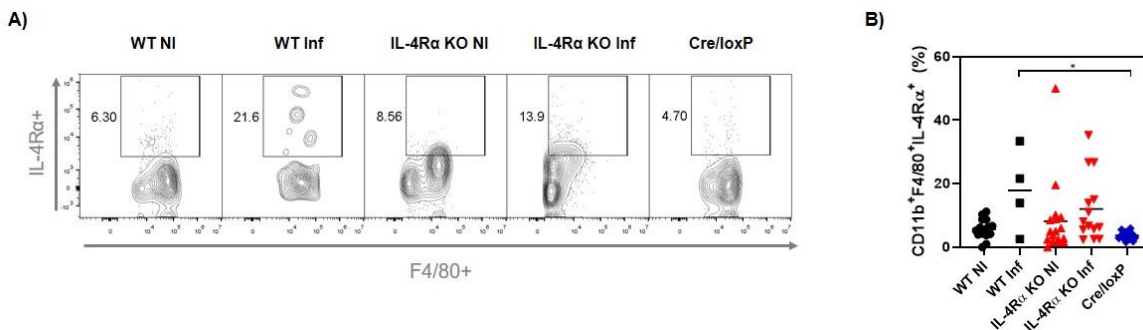


Figura 8. No existen diferencias en el porcentaje de expresión de IL-4R α en macrófagos durante la infección con *T. crassiceps*. A) Contour-plots representativos de células F4/80⁺ y su porcentaje de expresión de IL-4R α ⁺. B) Gráfico de datos totales recopilados de 6 experimentos independientes. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de IL-4R α en células F4/80 $^{+}$ entre los diferentes grupos experimentales aunque se observa una tendencia al incremento en la expresión de dicho marcador en ratones WT (Fig. 8B). Lo anterior podría sugerir que la infección con *T. crassiceps* promueve la expresión de la cadena-alfa del receptor de interleucina -4 en macrófagos al menos en ratones WT y confirma que el resto de nuestros modelos murinos es deficiente del IL-4R α .

Como se describió previamente en el apartado de introducción, los macrófagos son un tipo celular que ha sido recientemente estudiado debido a su participación en respuestas inmunitarias de tipo Th2 durante la infección por *T. crassiceps* y otros parásitos helmintos (Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, 2013). Para el análisis de dicha población primeramente se descartaron dobles y se analizó la región correspondiente a macrófagos; células de gran tamaño y granularidad, finalmente se utilizaron los marcadores F4/80, PD-L2 y MHC-II (Fig. 9).

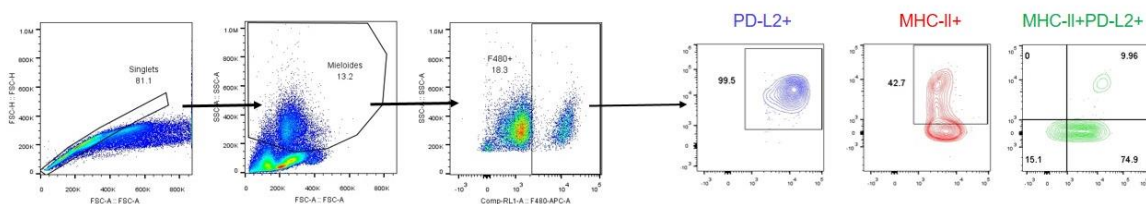


Figura 9. Estrategia de análisis de la población de macrófagos mediante citometría de flujo. Dot-plots representativos del porcentaje de expresión del ligando PD-L2 y MHC-II en células F4/80 $^{+}$.

Se presentó un aumento significativo en el porcentaje de expresión del ligando PD-L2 en macrófagos, en ratones WT y IL-4R α KO infectados, esto con respecto al grupo control, siendo mayor el porcentaje de expresión de dicho marcador en ratones WT con respecto a los ratones IL-4R α KO infectados. La expresión del ligando PD-L2 podría sugerir que se trata de una población de macrófagos alternativamente activados o M2. Por otra parte no se observaron diferencias en el porcentaje de expresión del marcador MHC-II entre los diferentes grupos experimentales durante la infección con *T. crassiceps* (Fig. 10B).

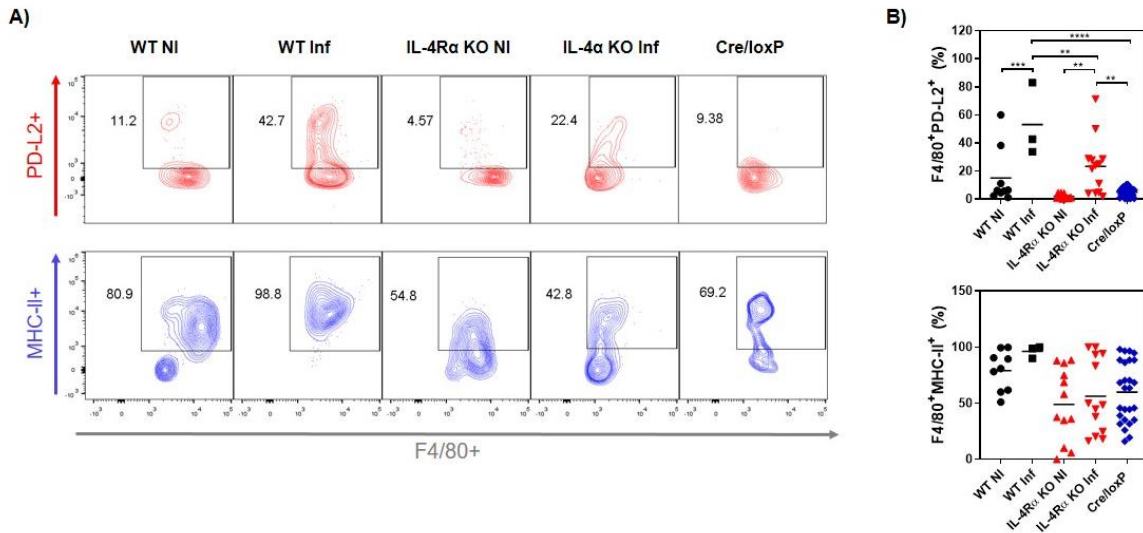


Figura 10. Los macrófagos presentan un fenotipo supresor en ausencia del IL-4R α durante la infección con *T. crassiceps*. A) Contour-plots representativos del porcentaje de expresión de PD-L2 y MHC-II en células F4/80⁺. B) Gráficos de datos totales de 6 experimentos independientes. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Más adelante se midió simultáneamente el porcentaje de expresión de PD-L2 y MHC-II en células F4/80⁺, encontrando un aumento significativo en la expresión de ambos marcadores en ratones WT e IL-4R α KO, durante la infección con *T. crassiceps*. (Fig. 11B). Lo anterior sugiere que podría tratarse de una población de macrófagos alternativamente activados con un perfil supresor, según lo reportado por LI Terrazas, D. Montero, CA Terrazas, JL Reyes y M. Rodríguez-Sosa, (2005) y JL Reyes y LI Terrazas, (2007).

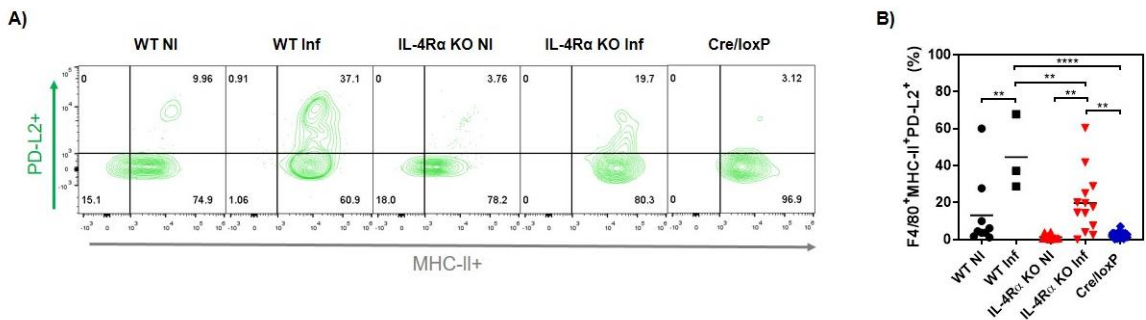


Figura 11. Los macrófagos presentan un fenotipo supresor o M2 en ausencia del IL-4R α durante la infección con *T. crassiceps*. A) Contour-plots representativos del porcentaje de expresión de PD-L2 y MHC-II en células F4/80⁺. B) Gráfico de datos totales de 6 experimentos independientes. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

5.3 Análisis de células linfoides

Con base en la literatura, se sabe que algunos tipos celulares juegan un papel importante en la susceptibilidad y resistencia a infecciones parasitarias. Con el objetivo de caracterizar estas células, se comenzó analizando a poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de muestras de peritoneo. Para dicho análisis de células linfoides se seleccionaron los singlets, posteriormente se delimitó la población de linfocitos; células de tamaño pequeño y poca granularidad. Después se identificaron las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ para finalmente medir el porcentaje de expresión de los marcadores de superficie Tim-3, PD-1 y CD25 en ambas poblaciones celulares, esto se realizó en los diferentes grupos y para todas las muestras (Fig. 12).

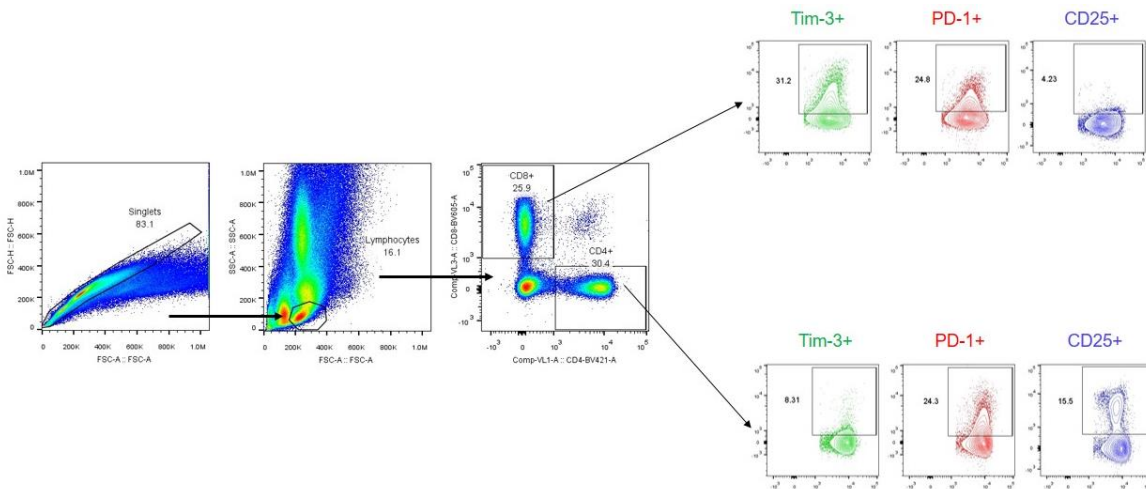


Figura 12. Estrategia de análisis de células linfoides mediante citometría de flujo. Dot-plots representativos de las poblaciones CD4⁺, CD8⁺ y su porcentaje de expresión de los marcadores Tim-3, PD-1 y CD25.

En ratones WT se presentó una tendencia a la disminución en el porcentaje total de células CD4⁺ durante la infección con *T. crassiceps*, además; en ratones sanos el porcentaje basal de estas células fue significativamente menor en ratones IL-4R α KO generados mediante el sistema Cre/loxP con respecto al grupo WT e IL-4R α KO (Fig. 13B). Por otra parte, el porcentaje de células CD8⁺ totales fue significativamente mayor en los diferentes grupos de ratones infectados con respecto a sus controles (Fig. 13B). Lo anterior sugiere una importante participación de esta población celular durante la infección con *T. crassiceps*.

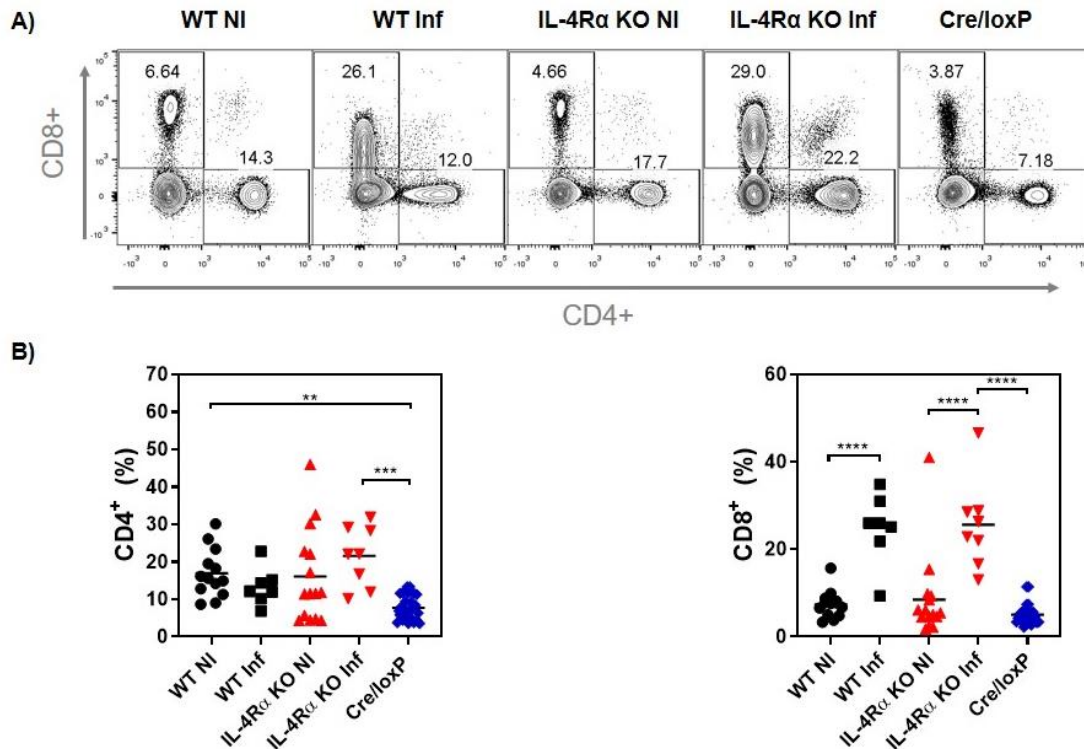


Figura 13. Existe un aumento en el porcentaje total de células CD8⁺ en ausencia del IL-4R α durante la infección con *T. crassiceps*. A) Contour-plots representativos del porcentaje total de células CD4⁺ y CD8⁺. B) Gráficos de datos totales de 6 experimentos independientes. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Una vez analizados los diferentes marcadores de superficie en linfocitos T CD4⁺, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de expresión de Tim-3 en los diferentes grupos experimentales. En cuanto al ligando PD-1, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de dicha molécula entre los diferentes grupos experimentales durante la infección con *T. crassiceps*. La expresión de CD25 fue significativamente mayor en los ratones WT infectados, además; se presentó una tendencia a la disminución en el porcentaje de expresión de dicho marcador en el grupo IL-4R α KO durante la infección con *T. crassiceps*. Lo anterior sugiere que estas células T CD4⁺ CD25⁺ podrían expresar también el factor de transcripción Foxp3, lo cual se puede asociar con la presencia de células T reguladoras activadas (Sakaguchi *et al.*, 2010) (Fig. 14B).

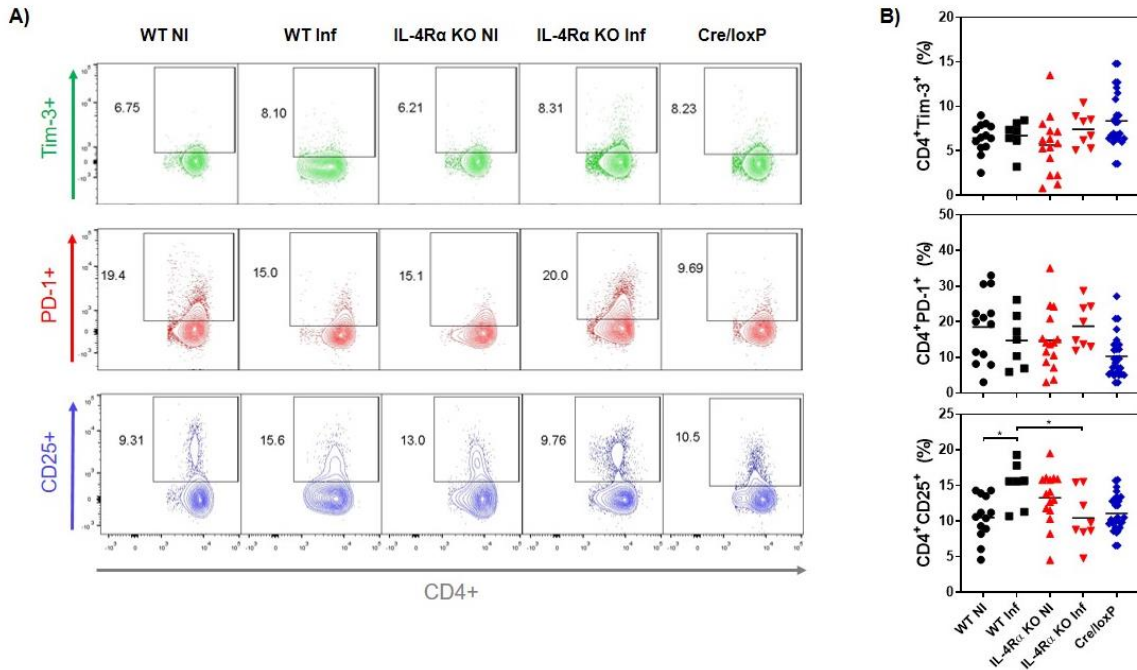


Figura 14. Durante la infección con *T. crassiceps* existe un incremento en el porcentaje de expresión de CD25 en células CD4⁺ de ratones WT infectados. A) Contour-plots representativos del porcentaje de expresión de los marcadores de superficie Tim-3, PD-1 y CD25 en células CD4⁺. B) Gráficos de datos totales de 6 experimentos independientes. * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

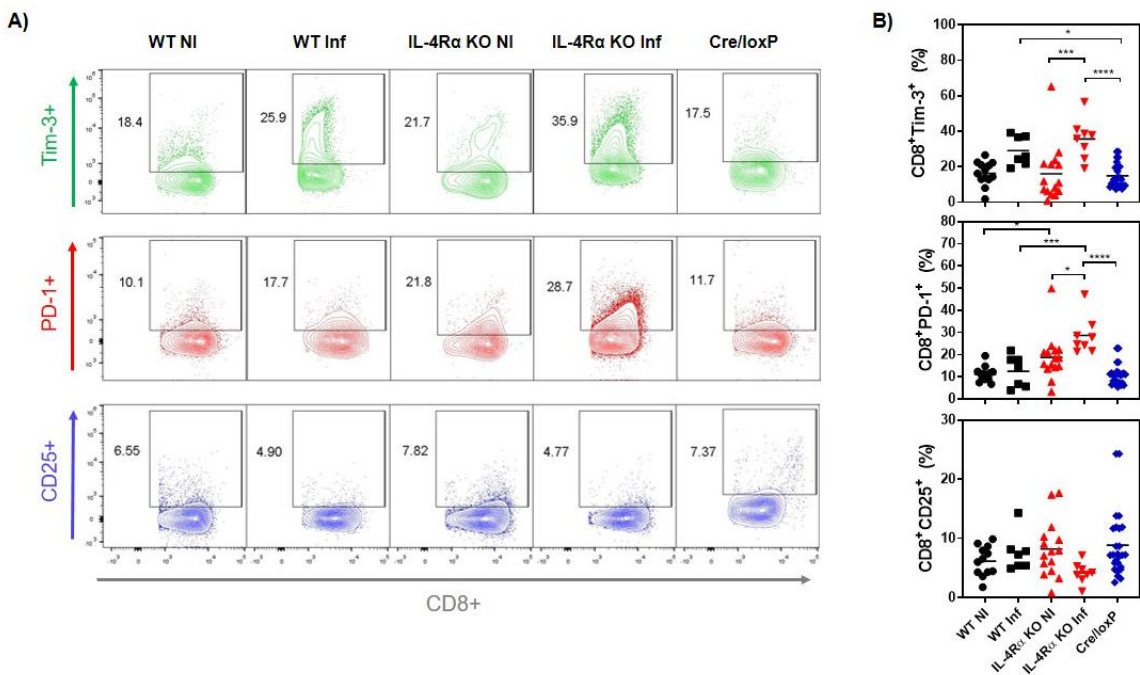


Figura 15. El porcentaje de expresión de Tim-3 y PD-1 en células CD8⁺ les confiere un fenotipo supresor o anérgico en ausencia del IL-4Rα durante la infección con *T.*

crassiceps. A) Contour-plots representativos del porcentaje de expresión de los marcadores de superficie Tim-3, PD-1 y CD25 en células CD8⁺. B) Gráficos de datos totales de 6 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

La estrategia de análisis realizada para linfocitos T CD4⁺, se realizó para la población T CD8⁺. Se observó un incremento significativo en el porcentaje de expresión de Tim-3 en ratones IL-4R α KO infectados con respecto a sus controles y una tendencia al incremento en los ratones WT durante la infección con *T. crassiceps*. Por otra parte el porcentaje de expresión del ligando PD-1 fue significativamente mayor en ratones IL-4R α KO infectados con respecto a los controles, mientras que no hubo diferencias significativas de dicho porcentaje en el resto de los grupos experimentales. En ratones sanos, el porcentaje de expresión basal de PD-1 fue significativamente mayor en el grupo IL-4R α KO con respecto a los ratones WT. En cuanto al marcador CD25 no hubo diferencias significativas en el porcentaje de expresión entre los diferentes grupos experimentales (Fig. 15B). Lo anterior sugiere que la población de linfocitos CD8⁺ podría tener un perfil supresor, o podría existir un fenómeno de anergia sobre estas células durante la cisticercosis experimental con *T. crassiceps*.

5.4 Análisis de células T reguladoras

Con base en la literatura, se sabe que las células Tregs juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune durante las infecciones parasitarias, por lo cual caracterizamos a estas células mediante el análisis de la molécula CD4⁺ y la expresión de la proteína verde fluorescente asociada al factor de transcripción Foxp3. Una vez identificada esta población se midió su porcentaje total en los diferentes grupos experimentales (Fig. 16), observándose una disminución significativa en el porcentaje total de Tregs en ratones WT infectados, mientras que no hubo diferencias significativas de dicho porcentaje en ratones IL-4R α KO (Fig. 17B). Un hallazgo importante fue el porcentaje basal de células Tregs en ratones sanos IL-4R α KO, que fue significativamente mayor al de los ratones WT y mayor a lo reportado por Sakaguchi en 2007, que menciona que el porcentaje de células Tregs en el timo y en la periferia es de entre 5-10%. Lo anterior sugiere que la IL-4 y su señalización forman parte importante de la regulación de las células Tregs naturales (Fig. 17A y 17B).

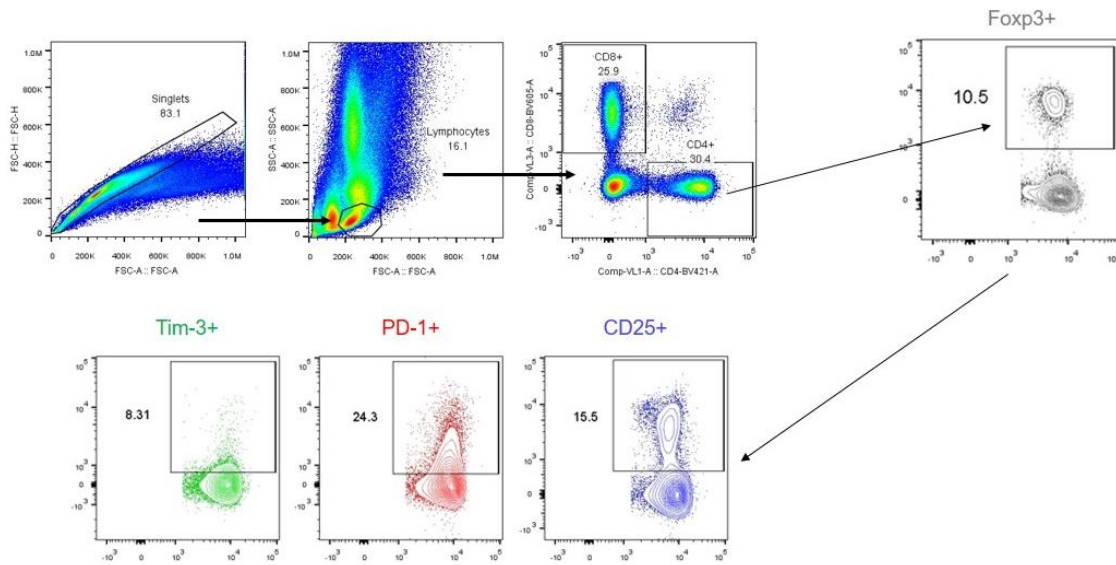


Figura 16. Estrategia de análisis de células T reguladoras mediante citometría de flujo. Dot-plots representativos de células T reguladoras CD4⁺Foxp3⁺, su porcentaje expresión de los ligandos Tim-3, PD-1, y la molécula CD25.

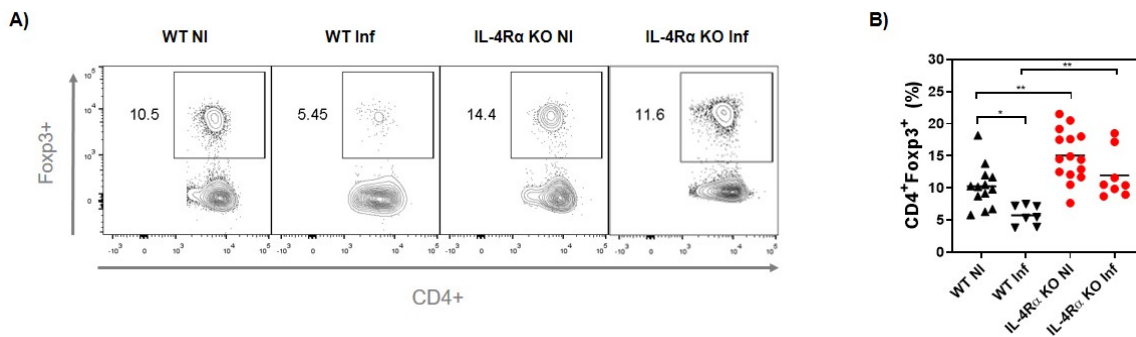


Figura 17. El porcentaje de células Tregs no disminuye en ausencia del IL-4R α durante la infección con *T. crassiceps*. A) Contour-plots representativos del porcentaje total de células Tregs. B) Gráfico de datos totales de 4 experimentos independientes. * $p<0.5$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ y **** $p<0.0001$; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

Posteriormente se analizaron los ligandos de supresión Tim-3 y PD-1, la molécula CD25 y su porcentaje de expresión en Tregs. El porcentaje de expresión de Tim-3 fue significativamente mayor en ratones WT infectados con respecto a sus controles, mientras que se observó una tendencia al aumento en el porcentaje de expresión de dicha molécula en ratones IL-4R α KO durante la infección con *T. crassiceps*. En cuanto al porcentaje de expresión del ligando PD-1; no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. Asimismo no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de

expresión de CD25 pero sí una tendencia al aumento de dicho marcador en ratones infectados de ambas cepas estudiadas (Fig. 18B). Dichos hallazgos podrían sugerir que a pesar de que no disminuyen las células Tregs tampoco expresan un fenotipo supresor durante la infección con *T. crassiceps*.

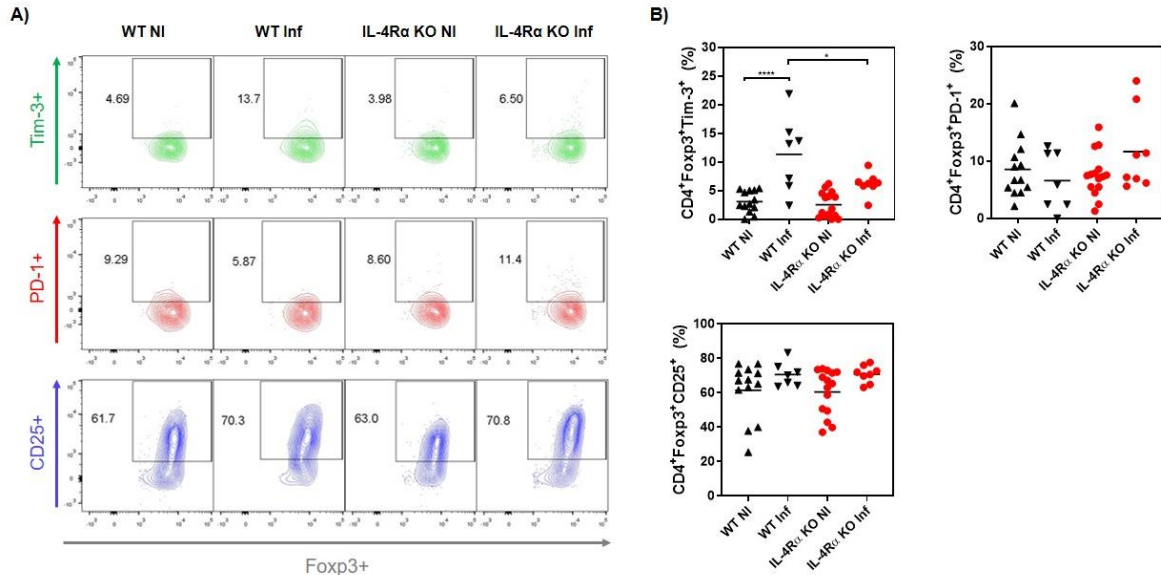


Figura 18. Las células Tregs no expresan un fenotipo más supresor en ausencia del IL-4Rα durante la infección con *T. crassiceps*. A) Contour-plots representativos del porcentaje de expresión de Tim-3, PD-1 y CD25 en células CD4⁺Foxp3⁺. B) Gráficos de datos totales recopilados de 4 experimentos independientes. *p<0.5, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

5.5 Cuantificación de citocinas por CBA

A las diez semanas posteriores a la infección con *T. crassiceps* se obtuvieron los bazo de los ratones, de acuerdo con el apartado de materiales y métodos. Se obtuvieron las células de bazo, se estimularon con anti-CD3 durante 72 horas y se cuantificaron citocinas por la técnica CBA. Con respecto a las citocinas proinflamatorias, observamos un decremento no significativo de la producción de IFN-γ (Fig. 19A) en ratones IL-4Rα KO infectados y un incremento en la producción de IL-2 y TNF-α (Fig. 19B y 19C) lo que sugiere el desarrollo de un microambiente proinflamatorio en ausencia del IL-4Rα durante la infección con *T. crassiceps*. Con respecto a la citocina antiinflamatoria IL-4 observamos un incremento en su producción en el grupo IL-4Rα KO infectado (Fig. 19D), lo que sugiere que la producción de IL-4 se mantiene intacta aun en ausencia de su receptor. Con respecto a la citocina inmunosupresora IL-10 no observamos diferencias entre los diferentes grupos experimentales (Fig. 19E). Se evaluó también la IL-6 y la IL-17 (datos no mostrados) no

observando diferencias significativas en la producción de ambas citocinas. Estos datos sugieren que en ausencia del IL-4R α se promueve un microambiente proinflamatorio en el bazo durante la infección con *T. crassiceps*.

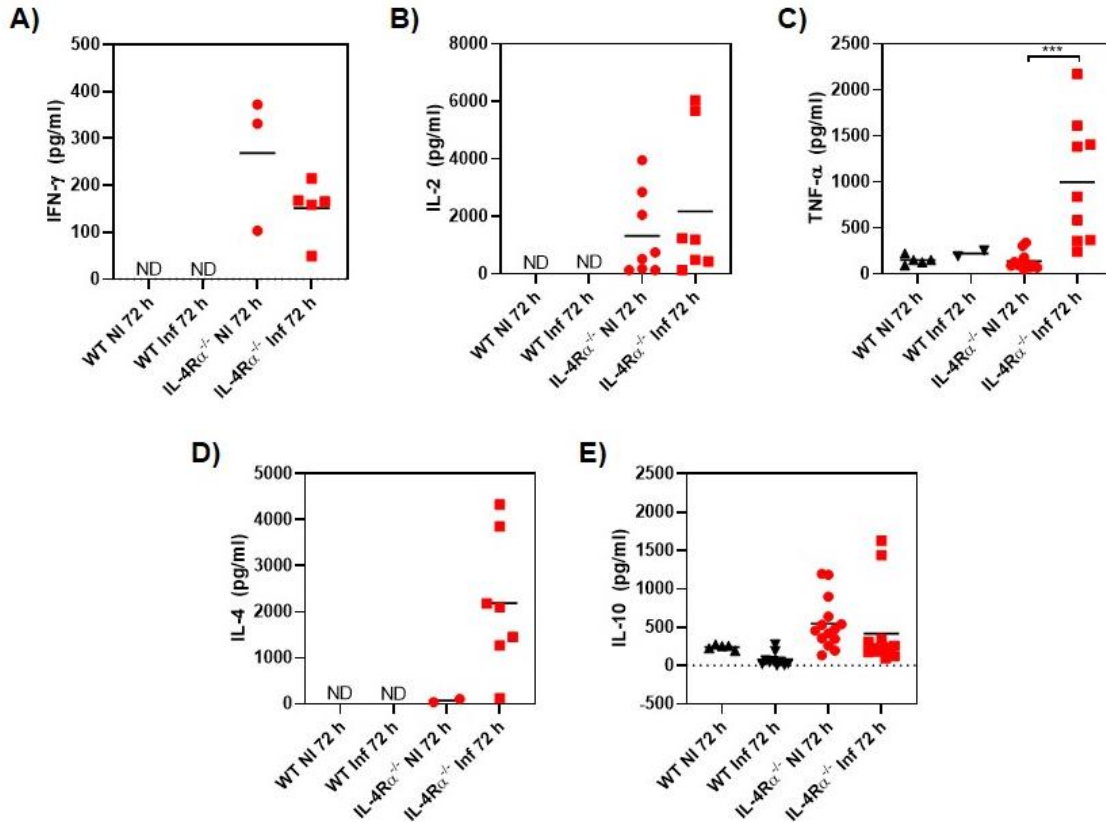


Figura 19. Existe un incremento en la producción de TNF- α e IL-4 en ausencia del IL-4Ra durante la infección con *T. crassiceps*. A, B, C, D, y E) Gráficos de datos totales de la producción de IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4 e IL-10 respectivamente. * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$; pruebas ANOVA de una vía y prueba de Tukey.

6 Discusión y conclusiones

Los parásitos helmintos han desarrollado diferentes mecanismos de evasión y modulación de la respuesta inmune, lo cual favorece su supervivencia y la capacidad de completar su ciclo de vida (Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI, 2013; Becerra-Díaz *et al.*, 2011)). La evolución de las enfermedades parasitarias ha sido asociada con la regulación de las respuestas inmunitarias de tipo Th1 y Th2. (Terrazas *et al.*, 1998). Diversos estudios han demostrado que una respuesta inmunitaria de tipo Th1 se asocia con la protección del hospedero durante la infección con *T. crassiceps*, mientras que el cambio o polarización hacia una respuesta de tipo Th2 caracterizada por la secreción de citocinas

antiinflamatorias como las IL-4 y la IL-13 principalmente, se ha asociado con la susceptibilidad a la infección y con un incremento notable de la carga parasitaria (Terrazas *et al.*, 1999). Los datos obtenidos en nuestros experimentos, mostraron que los ratones deficientes de IL-4 fueron susceptibles a la infección y presentaron una alta carga parasitaria con respecto a ratones de tipo salvaje (Fig. 5), lo cual es similar a lo reportado por Terrazas *et al.*, 1999, que demostraron en un tratamiento con anti-IL-4 no se induce una reducción en la carga parasitaria. Esto sugiere que existe un mecanismo inmunomodulador independiente de la IL-4 que induce una respuesta de tipo Th2, favoreciendo la permanencia y sobrevivencia del parásito dentro del hospedero. Con base en estos hallazgos decidimos estudiar los principales tipos celulares involucrados durante la cisticercosis experimental, así como también algunas moléculas de activación y supresión características de estas células para determinar su participación durante este proceso.

Comenzamos analizando las células del linaje mielóide (Fig. 6), más específicamente analizando el porcentaje total de células CD11b⁺Ly6G⁺; el primer marcador es una integrina expresada en la superficie de macrófagos y células granulocíticas que participa en las funciones de adhesión, migración y quimiotaxis durante la inflamación (McFarland *et al.*, 1992; Schmid *et al.*, 2018), mientras que Ly6G es un marcador de superficie específico de neutrófilos y que ayuda a diferenciarlos de otros tipos de leucocitos (Lee *et al.*, 2013). En nuestros datos observamos un incremento significativo en el porcentaje total de neutrófilos en los diferentes grupos experimentales durante la infección con *T. crassiceps*, siendo notablemente mayor en ratones IL-4R α KO (Fig. 7). Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Chen *et al.* (2012) donde se menciona que en modelo murino de infección con *Nippostrongylus brasiliensis* deficiente de IL-4R α , existe un incremento en la infiltración de neutrófilos en el sitio de infección, asociado con un peor pronóstico de la enfermedad. Seki *et al.* (2012), reportaron que la infiltración excesiva de neutrófilos podría estar relacionada con la producción de IL-17, esto en un modelo con ratones doble KO (deficientes de IL-4 e IL-13), durante la etapa crónica de la infección con *Schistosoma japonica*, por otra parte, en este mismo modelo los ratones WT presentaron una disminución significativa en el infiltrado de neutrófilos sugiriendo la importancia de la IL-4 y la IL-13 en la supresión del reclutamiento excesivo de estas células. Según Egholm *et al.* (2019) las vías de señalización de la IL-4 y la IL-13 son inhibidores de las funciones efectoras de neutrófilos, por ejemplo; en presencia de la IL-4 disminuyen los niveles de expresión de CXCR2 sobre estas células impidiendo la unión con su ligando CXCL2, limitando la quimiotaxis. Además la señalización de la IL-4/IL-13 antagonizan los efectos del factor

estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Esto en conjunto podría sugerir que las citocinas IL-4 e IL-13 así como su receptor común IL-4R α , juegan un papel importante en la regulación de los mecanismos efectores sobre los neutrófilos en las respuestas Th2 durante la infección con *T. crassiceps*. Una vez realizada la cuantificación de citocinas, a las diez semanas posteriores a la infección; se observó un incremento significativo en la producción de TNF- α en los ratones IL-4R α KO infectados (Fig. 19C). El TNF- α es una citocina que tiene efectos pleiotrópicos sobre diferentes tipos celulares y que juega un papel importante en la regulación de los procesos inflamatorios. Al unirse con su ligando TNFR1 el TNF- α en su forma soluble es capaz de inducir inflamación en tejidos, así como también está involucrado en procesos de supervivencia y proliferación celular (Zelová *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2021). Por otra parte se sabe que el TNF- α favorece el incremento de la permeabilidad vascular e induce la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, como por ejemplo la Selectina-E; que participa en la fijación selectiva de las diversas moléculas de adhesión de los neutrófilos, además el TNF- α puede activar a éstas células y promover su actividad fagocítica (Kindt *et al.*, 2007). Con base en lo anterior, nuestros datos sugieren que el TNF- α podría estar involucrado en la activación e infiltración de neutrófilos en el sitio de infección durante la cisticercosis experimental murina y en ausencia del IL-4R α , lo cual fue descrito en la figura (Fig. 7). Sin embargo desconocemos el efecto posterior sobre poblaciones de células linfoides debido a que no encontramos un incremento en la producción de INF- γ (Fig. 19A). Posiblemente el TNF- α funcione para reclutar células mieloides que tendrán un fenotipo antiinflamatorio, aunque hace falta investigar más al respecto.

Continuando con el análisis del linaje mieloide, otra de las poblaciones celulares estudiadas fueron las células monocíticas, las cuales para fines del presente trabajo y con base en la literatura dividimos en dos subpoblaciones tomando en cuenta la expresión de la proteína Ly6C; CD11b⁺Ly6C^{hi} o monocitos inflamatorios, y monocitos CD11b⁺Ly6C^{low} (Auffray, C. *et al.*, 2009) (Fig. 7), esto con el objetivo de conocer el papel de los monocitos y su posible diferenciación hacia macrófagos clásicos o alternativamente activados durante la cisticercosis experimental murina. En cuanto a los monocitos con baja expresión de Ly6C no observamos diferencias significativas del porcentaje total en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la infección. Por otra parte, observamos un incremento significativo en el porcentaje total de monocitos Ly6C^{hi} en ratones IL-4R α KO a las 10 semanas posteriores a la infección con *T. crassiceps*. Terrazas, C. *et al.*, (2017) reportaron que durante la infección con *T. crassiceps* existe un reclutamiento de monocitos Ly6C^{hi} en

la cavidad peritoneal dependiente de CCR2 (Ly6C^{hi}CCR2⁺CX₃CR1^{lo}), que con el curso de la infección presentan una desregulación en la expresión de Ly6C, CCR2 y favorecen la expresión de CX₃CR1; promoviendo un cambio en su fenotipo (Ly6C^{lo}CCR2⁻CX₃CR1^{hi}) y más adelante su diferenciación hacia AAMs ϕ que expresan MR, PD-L2 y que además presentan funciones supresoras. Asimismo mencionan que la proliferación de los AAMs ϕ es dependiente del estímulo con IL-4, pero que el microambiente generado por el helminto también puede jugar un papel importante. Becerra-Díaz y colaboradores reportaron que en la etapa crónica de la infección con *T. crassiceps* existe un reclutamiento de monocitos inflamatorios con un fenotipo CD11b⁺CCR2⁺Ly6C^{hi}PD-L1⁺ dependiente del factor de transcripción STAT1, y mencionan que esta población de monocitos presenta capacidades supresoras que favorecen el establecimiento del parásito y que pueden dar origen a macrófagos M2. En este mismo trabajo reportaron un incremento significativo en los niveles de IL-13 e IL-10 en suero, lo que podría sugerir que estas citocinas juegan un papel importante en el desarrollo de macrófagos M2 y la susceptibilidad a la infección. Además nuestros datos sugieren que existe un reclutamiento importante de monocitos proinflamatorios independientemente del estímulo y señalización de la IL-4/IL-4R α , lo que nos llevó a la tarea de buscar si esta población de monocitos estaba asociada con el posible origen de AAMs ϕ en ausencia del IL-4R α durante la infección con *T. crassiceps*.

Con base en lo anterior analizamos el perfil de los macrófagos (Fig. 9), se midió el porcentaje de expresión de PD-L2 y MHC-II en células F4/80⁺ para confirmar la presencia de macrófagos alternativamente activados, y posteriormente analizar el porcentaje de expresión del IL-4R α con la finalidad de conocer si la presencia de estas células era o no dependiente de la IL-4. PD-L1 y PD-L2 son proteínas pertenecientes a la familia B7, ambas se unen al receptor de muerte programada 1 (PD-1) que es expresado en células T activadas, interacciones entre PD-1 y sus ligandos pueden modular y suprimir las respuestas proliferativas de células T. (Latchman *et al.*, 2004; LI Terrazas *et al.*, 2005). En nuestros datos observamos un incremento significativo en el porcentaje de expresión de la molécula PD-L2 en macrófagos de ratones WT e IL-4R α KO durante la infección con *T. crassiceps*. Simultáneamente analizamos el porcentaje de expresión del IL-4R α (Fig. 10), pero no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, únicamente se observó una tendencia al incremento en el porcentaje de expresión de dicho marcador en ratones WT infectados, lo cual sugiere que la expresión de PD-L2 en macrófagos podría ser dependiente de la IL-4, al menos en ratones WT lo cual coincide con lo reportado por Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002, donde se menciona que la IL-4 activa la vía

de señalización de STAT-6 promoviendo una respuestas inmunitaria de tipo Th2 y favoreciendo la susceptibilidad a la infección por *T. crassiceps* a través de la expresión de moléculas supresoras. Sin embargo continuamos con el análisis del MHC-II para una mejor descripción del fenómeno en los ratones deficientes del IL-4R α .

Evaluamos el porcentaje de expresión del MHC-II en macrófagos (Fig. 10), sin embargo no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de dicha molécula entre los diferentes grupos experimentales durante la infección con *T. crassiceps*. Esto nos llevó a la tarea de analizar la co-expresión de PD-L2 y MHC-II en macrófagos y definir mejor su fenotipo, observando un incremento significativo en el porcentaje de células F4/80⁺PD-L2⁺MHC-II⁺ en ratones WT e IL-4R α KO infectados (Fig. 11). Los datos anteriores sugieren fuertemente la presencia de una población de macrófagos alternativamente activados con un fenotipo supresor en ratones WT e IL-4R α KO durante la infección, ya que se ha descrito que los AAMs ϕ se caracterizan, además de otras moléculas; por la sobreexpresión de PD-L1/2 y MHC-II en etapas avanzadas de la infección experimental con *T. crassiceps* (LI Terrazas *et al.*, 2005; Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S., 2009). La sobreexpresión de PD-L2 y MHC-II en macrófagos de ratones IL-4R α KO indica que dicho mecanismo no es dependiente de la vía de señalización de la IL-4, al menos en este modelo, sugiriendo que podría existir una vía de señalización alterna por la cual se induce la diferenciación de estos macrófagos hacia un perfil alternativo y consecuentemente la expresión de moléculas de superficie características de estas células. Medina-Andrade *et al.*, 2021, reportaron que en un modelo murino deficiente IL-4R α , hay una sobreexpresión de Arg-1 y Relm- α 1 que media la expresión de IL-13R α 2 (receptor monomérico de la IL-13 de tipo 2), sugiriendo una vía de activación de STAT-6 mediada por la unión de la IL-13 con su receptor IL-13R α 2 (Fichtner-Feigl *et al.*, 2006). Lo anterior podría sugerir que existe una vía de señalización que promueve el desarrollo de una respuesta de tipo Th2 independientemente del estímulo derivado de la IL-4 y su receptor, y que permite la diferenciación de monocitos hacia una población de AAMs ϕ con un fenotipo supresor. Además los hallazgos obtenidos al cuantificar citocinas, le dan sustento a lo planteado anteriormente, ya que observamos un incremento en la producción de IL-4 en ausencia del IL-4R α durante la infección con *T. crassiceps* (Fig. 19D): la producción de la citocina se mantiene, pero la señalación a través de su receptor es deficiente. Por lo tanto se sugiere que debe existir una vía de señalización alterna que compense la necesidad de activación, por lo tanto el receptor de IL-13 podría jugar un papel primordial dentro de este contexto.

La nula expresión de PD-L2 y MHC-II en macrófagos, así como la alta carga parasitaria en ratones IL-4R α KO podría indicar que existe un mecanismo capaz de favorecer el establecimiento y sobrevivencia del parásito, posiblemente mediado por otra población celular e independientemente de la presencia de AAMs ϕ y la señalización de la IL-4. Por lo cual decidimos analizar el perfil de algunas poblaciones de células del linaje linfocitario que pudieran estar involucradas en dicho fenómeno.

Las respuestas inmunológicas dependientes de células T juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades parasitarias y particularmente durante la cisticercosis experimental murina con *T. crassiceps* (Bojalil, 1993; Terrazas *et al.*, 1998), por lo que analizamos dos subconjuntos de células T; CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ (Fig. 12). Uno de los hallazgos más importantes de esta investigación fue el incremento significativo en el porcentaje total de células CD8 $^{+}$ en los diferentes grupos experimentales durante la infección con *T. crassiceps*, mientras que no hubo diferencias significativas en el porcentaje total de células CD4 $^{+}$ en los diferentes grupos experimentales durante la infección (Fig. 13). Se tiene muy poca información acerca del papel de las células T CD8 $^{+}$ durante la cisticercosis experimental murina, Toenjes S.A. *et al.*, (1999) reportaron que existe un incremento en porcentaje total de células TCD8 $^{+}$ en etapas crónicas de la infección con *T. crassiceps* en un modelo murino bajo el estímulo normal de la IL-4 y en presencia de una respuesta de tipo Th2, sin embargo nuestros datos sugieren que existe una participación importante de esta población celular durante la infección por *T. crassiceps*, en ausencia de la señalización del IL-4R α . Por otra parte, diversos autores han demostrado que en etapas crónicas de la infección con *T. crassiceps*, existe una disminución en la proliferación de células TCD4 $^{+}$ asociada a la incapacidad de los macrófagos para inducir respuestas proliferativas (L.I. Terrazas *et al.*, 1998; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002), además se ha demostrado que los macrófagos alternativamente activados tienen la capacidad de suprimir la proliferación de células T a través del contacto celular (L.I. Terrazas *et al.*, 2005), además; la ausencia o disminución de células T CD4 $^{+}$ se ha asociado comúnmente con la susceptibilidad a la infección en términos de la carga parasitaria (López-Briones *et al.*, 2003).

Con base en lo anterior; analizamos el porcentaje de expresión del marcador de activación CD25 y los marcadores de supresión Tim-3 y PD-1 en las poblaciones de linfocitos CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ para una mejor caracterización fenotípica. En el caso de las células T CD4 $^{+}$ (Fig. 14) no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de Tim-3 en los diferentes grupos experimentales durante la infección. En cuanto al porcentaje de expresión

del marcador PD-1 se observó una tendencia al incremento de dicho marcador en los ratones IL-4R α KO infectados, mientras que en el resto de los grupos experimentales no hubo diferencias significativas. Se observó un incremento en el porcentaje de expresión de CD25 en los ratones WT infectados, mientras que no se observaron diferencias significativas en el resto de los grupos experimentales. Se ha reportado que la unión del receptor PD-1 con su ligando PD-L2 expresado por AAMs ϕ , puede suprimir las respuesta proliferativas de células T durante la infección con *T. crassiceps* (Latchman *et al.*, 2004; LI Terrazas *et al.*, 2005; Reyes J.L. *et al.*, 2009), en presencia de la IL-4, sin embargo nuestros datos podrían sugerir que existe una inhibición de la proliferación de células T CD4⁺ asociada con la expresión de PD-1, en ausencia del IL-4R α (Ratones IL-4R α KO) durante la infección y que este mecanismo esta posiblemente relacionado con la expresión de PD-L2 por AAMs ϕ . Como se mencionó en el apartado de introducción, CD25 forma parte del receptor de alta afinidad de la IL-2; citocina involucrada en el desarrollo y función de células T. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la IL-2 juega un papel importante en la proliferación y diferenciación de células T y que una vez activadas estas células expresan CD25 (Sakaguchi *et al.*, 2006, Sakaguchi *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere que la expresión de CD25 en linfocitos T CD4⁺ de ratones WT está asociado con un perfil de activación de estas células durante la infección con *T. crassiceps*.

Por otra parte, se observó un incremento el porcentaje de expresión del marcador Tim-3 y PD-1 en células CD8⁺ de ratones IL-4R α KO infectados, cabe mencionar que el porcentaje de expresión basal de PD-1 en ratones IL-4R α KO fue significativamente mayor con respecto a los demás grupos experimentales, mientras que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de CD25 en los diferentes grupos experimentales durante la infección con *T. crassiceps* (Fig. 15). La inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 (Tim-3) es una glicoproteína de superficie que juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune. Tim-3 tiene al menos tres ligandos, siendo galectina-9 (Gal-9) el principal, una vez unidos Tim-3/Gal-9 pueden inducir apoptosis de células T (Tang *et al.*, 2019). Recientemente se ha descrito que Tim-3 juega un papel importante en la inmunidad contra parásitos debido a la supresión y atenuación de las funciones de células CD4⁺ y CD8⁺, Sakuishi *et al.*, (2010); Bailly C, (2023) mencionan que durante la schistosomiasis y la toxoplasmosis, la co-expresión de Tim-3 y PD-1 se asocian con un perfil de agotamiento en las células CD8⁺. Con base en lo anterior, nuestros datos sugieren fuertemente que la expresión de Tim-3 y PD-1, así como la nula expresión de CD25 podrían estar asociados con un perfil de agotamiento en células CD8⁺ durante la

infección con *T. crassiceps* y en ausencia del IL-4R α , sin embargo se podrían llevar a cabo experimentos más específicos para determinar el fenotipo de éstas células.

Otra población celular de células analizadas fueron las células T reguladoras, mismas que para fines de esta investigación definimos como CD4⁺Foxp3⁺ (Fig. 16). Observamos una disminución significativa en el porcentaje total de células Tregs en ratones WT durante la infección con *T. crassiceps*, mientras que no hubo una disminución en el porcentaje total de dichas células en los ratones IL-4R α KO infectados (Fig. 17), esto podría sugerir que existe un mecanismo dependiente del IL-4R α posiblemente involucrado en el mantenimiento de las células Tregs durante la cisticercosis experimental murina. Un hallazgo importante fue el hecho de que basalmente, en los ratones IL-4R α KO no infectados observamos un porcentaje total de células Tregs (aproximadamente 15% de las células CD4⁺ totales) significativamente mayor a los ratones WT no infectados (Fig. 17), ya que con base en la literatura el porcentaje basal de células Tregs es de aproximadamente 10% (Sakaguchi *et al.*, 2007), por lo que podríamos sugerir que en ausencia del IL-4R α existe un mecanismo involucrado en el desarrollo de células Tregs con fines de mantener la homeóstasis. Los datos obtenidos con respecto a la producción de citocinas en bazo (Fig. 19B), sugieren que la IL-2 podría estar involucrada en el mantenimiento de este número elevado de células Tregs en ausencia del IL-4R α , aunque falta investigar más al respecto. Posteriormente, para una mejor caracterización de las Tregs, analizamos el porcentaje de expresión del marcador de activación CD25 y las moléculas de supresión Tim-3 y PD-1 en células Tregs, observando un incremento el porcentaje de expresión de la molécula Tim-3 únicamente en ratones WT infectados (Fig. 18). Como se mencionó previamente en este mismo apartado, Tim-3 es una molécula que al unirse con su ligando (Gal-9) puede afectar las funciones de las células T, incluidas las células Tregs, además la expresión de Tim-3 en Tregs se ha asociado con un fenotipo supresor de esta población celular (Tang *et al.*, 2019). Con base en lo anterior se podría decir que, las células CD4⁺Tim-3⁺Foxp3⁺ de ratones WT podrían presentar un fenotipo supresor o de agotamiento durante la cisticercosis murina por *T. crassiceps*, mecanismo que podría ser dependiente del IL-4R α . Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de CD25 y PD-1 en los diferentes grupos de ratones infectados (Fig. 18), lo cual podría sugerir que la mayoría de estas células no muestran un perfil de activación y en el caso de los ratones IL-4R α KO sugiere que, aunque estas células Tregs no disminuyen, tampoco expresan un fenotipo asociado con mayor supresión en ausencia del IL-4R α . El estudio y

caracterización de las Tregs es un campo en el cual se debe profundizar para un mejor entendimiento de esta población durante la infección con *T. crassiceps*.

Con base en estos datos concluimos que, el IL-4R α juega un papel importante en el incremento de neutrófilos durante etapas crónicas de la infección con *T. crassiceps*, además; bajo este mismo contexto están presentes un gran número de monocitos Ly6C^{hi}, mismo que posiblemente podrían diferenciarse hacia macrófagos alternativamente activados que expresan PD-L2, sin embargo, cabe mencionar que este fenómeno es independiente del IL-4R α durante la infección, sugiriendo que existen otros mecanismos involucrados en la generación de AAMs ϕ con un fenotipo supresor como por ejemplo la señalización de la IL-13. Así mismo los porcentajes de células CD4⁺ y su expresión de PD-1 sugieren una inhibición de la respuesta proliferativa mediada por la unión de PD-1 con su ligando PD-L2, mientras que por otra parte parece ser que las células CD8⁺ expresan un perfil de agotamiento en ausencia del IL-4R α debido a la alta expresión de los marcadores Tim-3 y PD-1, esto podría reflejarse en las altas cargas parasitarias. Finalmente, de manera basal existe un aumento de las células Tregs en ratones IL-4R α KO, lo que sugiere que el IL-4R α está involucrado en el control de las células Tregs. Sin embargo, aún falta profundizar más al respecto para un mejor entendimiento de la respuesta inmune durante las infecciones parasitarias, así como investigar más a cerca de la microambiente durante la infección con *T. crassiceps*.

7 Anexo

Soluciones Utilizadas

Buffer de lisis para Proteinasa K

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

Solución TBE 1x

Para 1 L: 10.8 g de TRIZMA base, 55 g de ácido bórico y 4 ml de EDTA 0.5 M.

Medio de cultivo RPMI suplementado

Medio de cultivo RPMI, Suero fetal bovino (FCS) 10% v/v, L-glutamina 2mM, Aminoácidos no esenciales (NEAA) 1x, Piruvato de sodio 100 mM, Penicilina-estreptomicina 100x y β -mercaptoetanol 55mM.

8 Referencias

1. Abbas, A., Litchman, A., & Pilail, S. (2011) *Inmunología Celular y Molecular*. 7th ed: Elsevier.
2. Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology*, 27, 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
3. Bailly C. (2023). Contribution of the TIM-3/Gal-9 immune checkpoint to tropical parasitic diseases. *Acta tropica*, 238, 106792. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106792>
4. Becerra-Díaz, M., Ledesma-Soto, Y., Olgúin, J. E., Sánchez-Barrera, A., Mendoza-Rodríguez, M. G., Reyes, S., Satoskar, A. R., & Terrazas, L. I. (2021). STAT1-Dependent Recruitment of Ly6C^{hi}CCR2⁺ Inflammatory Monocytes and M2 Macrophages in a Helminth Infection. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(10), 1287. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101287>
5. Becerra-Díaz, M., Valderrama-Carvajal, H., & Terrazas, L. I. (2011). Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family members in helminth infections. *International journal of biological sciences*, 7(9), 1371–1381. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1371>
6. Bojalil R, Terrazas L, Govezensky T, Sciutto E, Larralde, C (1993) Thymus-related cellular immune mechanisms in sex associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 79:384–389
7. Brombacher, F., Arendse, B., Peterson, R., Hölscher, A., & Hölscher, C. (2009). Analyzing classical and alternative macrophage activation in macrophage/neutrophil-specific IL-4 receptor-alpha-deficient mice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 531, 225–252. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7_15
8. Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Roza, C., Bowdridge, S., Millman, A., Van Rooijen, N., Urban, J. F., Jr, Wynn, T. A., & Gause, W. C. (2012). An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nature medicine*, 18(2), 260–266. <https://doi.org/10.1038/nm.2628>
9. Dontje W, Schotte R, Cupedo T, Nagasawa M, Scheeren F, Gimeno R, Spits H, Blom B. Delta-like 1-induced Notch1 signaling regulates the human plasmacytoid dendritic cells versus T-cell lineage decisions through control of GATA3 and Spi-B. *Blood* 2006; 107: 24
10. Dorais, F. J., & Esch, G. W. (1969). Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental Parasitology*, 25, 395–398.
11. Egholm, C., Heeb, L. E. M., Impellizzieri, D., & Boyman, O. (2019). The Regulatory Effects of Interleukin-4 Receptor Signaling on Neutrophils in Type 2 Immune Responses. *Frontiers in immunology*, 10, 2507. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02507>
12. Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K., & Kitani, A. (2006). IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nature medicine*, 12(1), 99–106. <https://doi.org/10.1038/nm1332>
13. Freeman, R. S. (1962). Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40, 969–990
14. Gessner, A., Mohrs, K., & Mohrs, M. (2005). Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(2), 1063–1072. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.1063>

15. Gotthardt D, Trifinopoulos J, Sexl V, Putz EM. JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation. *Front Immunol.* 2019 Nov 12; 10:2590. doi: 10.3389/fimmu.2019.02590. PMID: 31781102; PMCID: PMC6861185.
16. Guerrero-García, S. (2019). Efecto de los productos Excretados/Secretados de *Taenia crassiceps* sobre la población de células Tregs durante el desarrollo de Cáncer de Colon Asociado a Colitis. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
17. Heldwein, K., Biedermann, H. G., Hamperl, W. D., Bretzel, G., Löscher, T., Laregina, D., Frosch, M., Büttner, D. W., & Tappe, D. (2006). Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(1), 108–111.
18. Hernández-Gómez, V. (2022). Supresión inmunológica mediada por la ausencia del IFN durante la infección con *Taenia crassiceps*. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
19. Hofmannova L, Mikes L, Jedlickova L, Pokorny J, Svobodova V. Casos inusuales de cisticercosis de *Taenia crassiceps* en animales infectados de forma natural en la República Checa. *Veterinario Med-Checo.* 2018; 63(2):73-80. doi: 10.17221/82/2017-VETMED.
20. Jagannathan-Bogdan, M., & Zon, L. I. (2013). Hematopoiesis. *Development (Cambridge, England)*, 140(12), 2463–2467. <https://doi.org/10.1242/dev.083147>
21. Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
22. John F, McAdara J, Yaron Y, Sakaguchi M, John F, Gasson J. Characterization of HOX Gene Expresión During Myelopoiesis: Role of HOX A5 in Lineage Comminment and Maturation. *Blood* 1999; 93: 3391-3400
23. Kelly-Welch, A., Hanson, E. M., & Keegan, A. D. (2005). Interleukin-4 (IL-4) pathway. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2005(293), cm9. <https://doi.org/10.1126/stke.2932005cm9>
24. Kenneth L. Culbreth, Gerald W. Esch, Raymond E. Kuhn. (1972) "Growth and Development of Larval *Taenia crassiceps* (Cestoda)-III. The relationship Between Larval Biomass and the Uptake and Incorporation of C-Leucine. *Experimental Parasitology.* 2 (32), 272-281. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(72\)90034-3](https://doi.org/10.1016/0014-4894(72)90034-3)
25. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Inmunología de Kuby* (6ta edición) McGraw-Hill.
26. Latchman, Y.E., Liang, S.C., Wu, Y., Chernova, T., Sobel, R.A., Klemm, M., Kuchroo, V.K., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2004. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *PNAS* 101, 10691–10696
27. Lee, P. Y., Wang, J. X., Parisini, E., Dascher, C. C., & Nigrovic, P. A. (2013). Ly6 family proteins in neutrophil biology. *Journal of leukocyte biology*, 94(4), 585–594. <https://doi.org/10.1189/jlb.0113014>
28. Loos-Frank, B. (2000). An up-date of Verster's (1969) Taxonomic revision of the genus *Taenia Linnaeus* (Cestoda) in table format. *Systematic Parasitology* 45, 155–183.
29. López-Briones, S., Lamoyi, E., Fragoso, G., Soloski, M. J., & Sciutto, E. (2003). *Taenia crassiceps* cysticercosis: immune response in susceptible and resistant BALB/c mouse substrains. *Parasitology research*, 90(3), 236–242. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0848-z>
30. Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*, 27, 451–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>.

31. Mayani, Héctor., Flores-Figueroa, Eugenia., Pelayo, Rosana., Montesinos, Juan José., Flores-Guzmán, Patricia. & Chávez-González, Antonieta. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología* 2. P: 95-107.
32. McFarland, H. I., Nahill, S. R., Maciaszek, J. W., & Welsh, R. M. (1992). CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 149(4), 1326–1333.
33. Medeiros, N.I., Gomes, J.A.S. (2019). Cytometric Bead Array (CBA) for Measuring Cytokine Levels in Chagas Disease Patients. In: Gómez, K., Buscaglia, C. (eds) *T. cruzi* Infection. *Methods in Molecular Biology*, vol 1955. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_23
34. Medina-Andrade, I., Olguín, J. E., Guerrero-García, S., Espinosa, J. A., Garduño-Javier, E., Hernández-Gómez, V., Vaca-Paniagua, F., Rodríguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2021). Recruitment of M1 Macrophages May Not Be Critical for Protection against Colitis-Associated Tumorigenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11204. <https://doi.org/10.3390/ijms222011204>
35. Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., & Paul, W. E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual review of immunology*, 17, 701–738. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.701>
36. Olguín J.E. y Terrazas L.I. (2021). Regulation of the Immune response in Cysticercosis: Lessons From an Old Acquainted Infection, Jorge Morales-Montor, Abraham Landa y Luis Ignacio Terrazas, IntechOpen, and DOI: 10.5772 / intechopen.100137. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/78778#B8>
37. Pentcheva-Hoang, T., Egen, J. G., Wojnoonski, K., & Allison, J. P. (2004). B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*, 21(3), 401–413. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.017>
38. Peón, AN, Espinoza-Jiménez, A. y Terrazas, LI (2013). Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and Its Antigens. *BioMed Research International*, 2013, 498583. <https://doi.org/10.1155/2013/498583>
39. Restrepo BI, Aguilar MI, Melby PC, Teale JM. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 366-70.
40. Reyes, J. L., & Terrazas, L. I. (2007). The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite immunology*, 29(12), 609–619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00973.x>
41. Reyes, J. L., Terrazas, C. A., Vera-Arias, L., & Terrazas, L. I. (2009). Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(6), 1115–1127. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.05.011>
42. Rodríguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., & Terrazas, L. I. (2002). Cutting edge: Th2 response induced via STAT6 signaling mediates susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(7), 3135–3139. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3135>.
43. Rodríguez-Sosa, M., Satoskar, A. R., Calderón, R., Gomez-Garcia, L., Saavedra, R., Bojalil, R., & Terrazas, L. I. (2002). Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infection and immunity*, 70(7), 3656–3664. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3656-3664.2002>

44. Rojas P, Garrido A, Garrido F, Perretta M (1985) Acción de un inhibidor sérico en la regulación de la hematopoyesis: Efecto *in vitro* sobre la síntesis de RNA en la médula ósea de rata. Arch. Biol. Med. (Chile) Vol 18: 57-62
45. Ruiz-Monroy M.N., López-Roblero A., Nájera-Ocampo M., Camacho-Vázquez C., Arce-Sillas A., Casanova-Hernández D., Palafox-Fonseca H., Melo-Salas M., Fragoso G., Sciotto-Conde E., Adalid-Peralta L. 2013. Participación de las células T reguladoras en la cisticercosis experimental murina por taenia crassiceps. Arch Neurocién (Mex). Vol. 18. pp. 33-37.
46. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol 2010; 10:490-500.
47. Sakaguchi S. (2000). Células T reguladoras: controladores clave de la autotolerancia inmunológica. *Celda*, 101 (5), 455–458. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80856-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80856-9).
48. Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., & Nomura, T. (2006). Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews*, 212, 8–27. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x>
49. Sakaguchi, S., Wing, K., & Miyara, M. (2007). Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European journal of immunology*, 37 Suppl 1, S116–S123. <https://doi.org/10.1002/eji.200737593>
50. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>
51. Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., & Anderson, A. C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of experimental medicine*, 207(10), 2187–2194. <https://doi.org/10.1084/jem.20100643>
52. Schmid, M. C., Khan, S. Q., Kaneda, M. M., Pathria, P., Shepard, R., Louis, T. L., Anand, S., Woo, G., Leem, C., Faridi, M. H., Geraghty, T., Rajagopalan, A., Gupta, S., Ahmed, M., Vazquez-Padron, R. I., Cheresch, D. A., Gupta, V., & Varner, J. A. (2018). Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nature communications*, 9(1), 5379. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07387-4>
53. Seki, T., Kumagai, T., Kwansa-Bentum, B., Furushima-Shimogawara, R., Anyan, W. K., Miyazawa, Y., Iwakura, Y., & Ohta, N. (2012). Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infection and immunity*, 80(1), 159–168. <https://doi.org/10.1128/IAI.05581-11>
54. Smith JK, Parrish M, Esch GW, Kuhn RE. Growth and development of larval Taenia crassiceps (Cestoda)-II. RNA and DNA synthesis in the ORF and KBS strains determined by autoradiography. Int J Parasitol 1972; 2:383-9.
55. Sobhani N, Tardiel-Cyril DR, Davtyan A, Generali D, Roudi R, Li Y. CTLA-4 in Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. Cancers (Basel). 2021 Mar 22; 13(6):1440. doi: 10.3390/cancers13061440. PMID: 33809974; PMCID: PMC8005092.
56. Stein, M., Keshav, S., Harris, N., & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine*, 176(1), 287–292. <https://doi.org/10.1084/jem.176.1.287>
57. Tang, R., Rangachari, M., & Kuchroo, V. K. (2019). Tim-3: A co-receptor with diverse roles in T cell exhaustion and tolerance. *Seminars in immunology*, 42, 101302. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101302>

58. Terrazas, C., de Dios Ruiz-Rosado, J., Amici, S. *et al.* Helminth-induced Ly6C^{hi} monocyte-derived alternatively activated macrophages suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci Rep* **7**, 40814 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep40814>
59. Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T., & Larralde, C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of parasitology*, *84*(1), 74–81.
60. Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T., & Larralde, C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of parasitology*, *84*(1), 74–81.
61. Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C. A., Reyes, J. L., & Rodríguez-Sosa, M. (2005). Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *International journal for parasitology*, *35*(13), 1349–1358. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.06.003>
62. Terrazas, L., Cruz, M., Rodríguez-Sosa, M. *et al.* Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* **85**, 135–141 (1999). <https://doi.org/10.1007/s004360050522>.
63. Toenjes, S. A., Spolski, R. J., Mooney, K. A., & Kuhn, R. E. (1999). The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology*, *118* (Pt 6), 623–633. <https://doi.org/10.1017/s0031182099004370>
64. Voehringer, D., van Rooijen, N., & Locksley, R. M. (2007). Eosinophils develop in distinct stages and are recruited to peripheral sites by alternatively activated macrophages. *Journal of leukocyte biology*, *81*(6), 1434–1444. <https://doi.org/10.1189/jlb.1106686>
65. Willms, K., & Zurabian, R. (2010). *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*, *137*(3), 335–346. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991442>
66. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5899), 271–275. <https://doi.org/10.1126/science.1160062>
67. World Health Organization: WHO. (2022). Taeniasis/cysticercosis. *www.who.int*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>
68. Wurster, A. L., Rodgers, V. L., White, M. F., Rothstein, T. L., & Grusby, M. J. (2002). Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *The Journal of biological chemistry*, *277*(30), 27169–27175. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201207200>
69. Zelová, H., & Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, *62*(7), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>