

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



“Identificación de los productos de excreción y secreción del cisticerco de *Taenia crassiceps* que inducen células T reguladoras”

Tesis para optar el Título Profesional de
Licenciada en Biología

María Gracia Castañeda Torrico

Lima, Perú

2016



El presente trabajo se realizó en la Unidad Periférica para estudio de Neuroinflamación en patologías Neurológicas del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velazco (INNN), bajo el adiestramiento de la Dr. Laura Adalid.



DEDICATORIAS

***A Dios** por haber guiado mis pasos de manera correcta durante toda mi vida universitaria; pero sobre todo por haberme cuidado y protegido mientras me encontraba fuera de mi país, estoy segura que he podido llegar a donde estoy gracias a él.*

Sé que un par de líneas no son suficientes para demostrar el amor y admiración que siento por mis padres, por eso les ofrezco como regalo esta tesis que es más suya que mía.

***A mi papi** por inculcarme siempre que los estudios son la mejor herencia que un hijo puede recibir, gracias por ser mi ejemplo y por enseñarme que en la vida hay que pensar con la cabeza fría, teniendo en cuenta que cada decisión es vital para nuestro futuro.*

***A mi mami** por enseñarme a perseguir mis metas, por aguantarme y tener paciencia de santa, porque desde que tengo uso de razón siempre me dijiste, puedes si crees que puedes, de ti aprendí a nunca rendirme a pesar de lo complicado que parezcan las cosas, a valorarme y alzar mi voz para ser escuchada.*

***A mi hermano** porque a pesar de no ser muy afectuosa contigo hoy por hoy trato de salir adelante para poder ser un buen ejemplo para ti, eres y serás siempre mi hermanito pequeño.*

***A mi familia**, mis tíos y tías: Tita, Gladys, Luis, Marcela, Roger, Martín y Eduardo, que siempre se han preocupado por mí, por mi educación y bienestar, estoy convencida que son la mejor familia que Dios me pudo haber dado.*

AGRADECIMIENTOS

Son muchísimas las personas a las que debo agradecer, cada persona que paso por mi vida, directa o indirectamente contribuyo con su granito de arena.

A mi querido Andy, por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia del tiempo y de mi mal humor, gracias por ser como eres por hacerme pisar tierra y sonreír siempre, te quiero mucho.

A mis queridas amigas Xim, Chris, Mila, Lesly, Daniella, por todos los momentos compartidos en la universidad que son y serán inolvidables.

A mi amiga Vanezza por ser mi segunda mamá y siempre estar cuando más te necesito, te adoro y le agradezco a Dios haberte conocido.

A mí querido amigo Alejandro, por darme los mejores consejos, por apoyarme y brindarme tu sincera amistad.

A mis amigos Cineplaneticos, Carlos, Héctor, Pamela y Astrid por formar parte de mi aventura de película y convertirse en mis mejores amigos.

Me complace mencionar a la familia mexicana **Gutiérrez Juárez** por ser tan hospitalarios y brindarme su calor de hogar. Gracias Sra. Vicky, Lorena, Ana Laura y sobre todo Luis Alonso por ser mi mejor cómplice.

A Samuki por ser más que una compañera de trabajo y convertirte en una verdadera amiga a la quiero y valoro mucho.

A Jaqueline por ser una persona única, que se conoce una vez en la vida y que te enseña la importancia de la amistad.

A amigos y amigas que hice en **México** como Diana, Asiel, Dina, Edgar, Sr. Héctor, Sarai, Anel, Erin, Vanessa, Eduardo, Jorge, Isaac, Juan, Victoria, Alex y Arnold que hicieron mi estadía muy alegre y divertida.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi directora de Tesis y mentora, Dra. Laura Adalid, mi profundo y sincero agradecimiento, por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio e incorporarme a su equipo de trabajo en México, por apoyarme en cada momento; pero sobre todo por enseñarme que solo el trabajo hecho en tiempo y forma logra tener los mejores resultados. Viajar para realizar mi tesis con usted, fue la mejor decisión que he tomado, puesto que, es una excelente profesional con ética y valores que realmente admiro.

Agradezco a mis queridos profesores, mi padrino de promoción el **Dr. Hugo Gonzáles** que me enseñó desde como sentarme frente a un microscopio hasta regeneración en especímenes como planarias, al **Quim. Diestra Lara** al cual recuerdo con mucho cariño por ser exigente y el primer filtro de la carrera de Biología, al **Blgo. Alcides Guerra**, por ser mi asesor, por su tiempo y dedicación, además por realizar clases didácticas y siempre tratar de ofrecer lo mejor a sus alumnos y por último y no menos importante al **Dr. Víctor Morales** por alentarme a soñar en grande e inculcarme el espíritu de la investigación, QEPD mi querido profesor.

Agradezco infinitamente al **Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM**, México, sobre todo al Jefe de Departamento de Inmunología la **Dra. Edda Sciutto** y a la investigadora adscrita la **Dra. Gladis Frago** por permitirme realizar algunas etapas de la parte experimental en sus instalaciones.

Un agradecimiento especial a uno de los Jefes de grupo del departamento de Inmunología la **Dra. Clara Espitia** por permitirnos utilizar sus equipos para caracterizar mediante proteómica los productos (E/S) y a la **M. en C. Cristina Parada** por su ayuda técnica en la preparación de geles.

Agradezco a todas las personas que me brindaron su apoyo en la parte experimental como es el **M. en C. Carlos Castellanos** de la Unidad de Citofluorometría por su paciencia al brindarme ayuda técnica en citometría de Flujo para el análisis de las muestras, al **Blgo. Gonzalo Acero** por su ayuda técnica para el manejo del Liofilizador y a la **Dra. Marisela Hernández** por estar siempre pendiente y brindarnos su apoyo técnico en cada momento.

Agradezco de todo corazón al **Instituto de Neurología y Neurocirugía Manuel Velazco Suarez (INNN)** de México, por permitirme realizar la tesis en los laboratorios de la **Unidad Periférica para estudio de Neuroinflamación en patologías Neurológicas del IIB**. Así mismo agradezco al equipo de trabajo conformado por **M. en C. Asiel Arce, BQD. Diana Álvarez, QFB. Jaqueline Leyva, QFB. Edgar Ortiz** y la **IBT. Dina Recinos** por su apoyo constante e incondicional.

Tengo un agradecimiento especial dirigido a la **M. en C. Sandra Gómez** por todo el apoyo brindado durante la tesis, desde el manejo con los animales hasta las últimas recomendaciones y enseñanzas para afinar detalles vitales con respecto a la identificación de las posibles proteínas inductoras.

Agradezco al **Bioterio** del INNN por facilitarme los modelos biológicos (roedores), en especial al **M. en C. César Rodríguez**, jefe de dicho recinto por su colaboración rápida y efectiva.

AGRADECIMIENTO A APOYO FINANCIERO

El presente trabajo conto con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) organismo público descentralizado del gobierno federal mexicano, en el proyecto de Ciencia Básica titulado: “Caracterización de los mecanismos de activación y la funcionalidad de las células T reguladoras en el control de la neuroinflamación asociada a la neurocisticercosis” bajo el No. de proyecto: **167278**.



RESUMEN

La cisticercosis murina es causada por el metacéstodo de *Taenia crassiceps* y permite estudiar diferentes aspectos de la relación hospedero-parásito debido a la alta homología con los cisticercos de *Taenia solium*. Estudios previos señalan que el parásito ha desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmunológica, entre ellos la inducción de células T reguladoras (Tregs) al inicio y en la fase crónica de la infección. Sin embargo, aún se desconocen la o las moléculas del metacéstodo que son capaces de inducir células Tregs.

El objetivo de este trabajo fue identificar los productos de excreción-secreción (E/S) del cisticerco de *Taenia crassiceps* que inducen células T reguladoras. Para ello se recuperaron cisticercos de ratones hembra BALB/cAnN a diferentes tiempos de infección. Los cisticercos se cultivaron con DMEM durante 21 días. Cada tercer día se cambió el medio y se colectaron los sobrenadantes conteniendo los productos (E/S) del parásito. Éstos se dializaron, liofilizaron y resuspendieron para ser cuantificados por el método de Lowry. Se realizaron pruebas de inducción de células Treg inoculando por vía i.p. 0, 250, 500, 750 y 1000 µg de cada producto (E/S) por ratón. Cinco días post-inoculación, se sacrificaron a los ratones para evaluar el porcentaje de Treg por citometría de flujo. Se obtuvieron 4 productos (E/S): PES4, PESA, PES5 y PES6 y tres extractos totales de cisticercos. De los productos (E/S) solo el PES6 causó un aumento significativo en el porcentaje de células Treg en comparación con los ratones control en más de un experimento. Posteriormente, se procedió a caracterizar el PES6 (inductor) y el PES4 (no inductor) con geles bidimensionales (2D-PAGE) en tiras de gradiente inmovilizado de pH de 3-10. Los resultados mostraron que el PES No inductor (PES4) tiene un total de 34 y el PES inductor (PES6) tiene un total de 72 spots. El análisis comparativo mostró un total 13 spots diferenciales encontrados (rango de pH 6.6-8 y p.m. 73-223 kD) los cuales podrían ser responsables de la inducción de células Tregs.

Para concluir, los hallazgos obtenidos en este trabajo sugieren que el cisticerco de *Taenia crassiceps* es capaz de producir productos (E/S) que *in vivo* inducen a los Linfocitos T hacia un fenotipo regulador (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Esto podría considerarse una posible vía de escape del parásito a la respuesta inmune del hospedero.

Palabras clave: *Taenia crassiceps*, Producto de excreción-secreción, Treg

ABSTRACT

The cisticercosis murina is caused by the *Taenia crassiceps* metacestode and it allows to study different host-parasite relationship aspects, that is because of the high homology with cysticerci of *Taenia solium*. Previous studies indicate that the parasite has developed various mechanisms in order to evade the immune response, including the induction of regulatory T cells (Tregs) at the beginning and chronic phase of infection. However we do not know yet, the metacestode molecules which are able to induce Tregs cells.

The aim of this study was to identify the excretion-secretion (E/S) products of *Taenia crassiceps* cysticerci which induce regulatory T cells. For this purpose, we have recovered cisticercosis from BALB/cAnN female mice in different infection stages. Cysticerci were cultured with DMEM for 21 days. Each third day the medium was changed and the supernatants, which contained the products (E/S), were collected. These supernatants were dialyzed, lyophilized and resuspended in order to be quantified using the Lowry method. Treg cells induction tests were performed using i.p. inoculating of 0, 250, 500, 750 and 1000 µg of each (E/S) product per mouse. After five days post-inoculation, the mice were sacrificed in order to evaluate the percentage of Treg using flow cytometry. We obtained four (E/S) products: PES4, PESA, PES5 and PES6, also we obtained three total extracts of cysticerci. Among all the (E/S) products, only PES6 caused a significant increase in the percentage of Treg cells, compared with control mice in more than one experiment. Subsequently, we proceeded to characterize the PES6 (inductor) and PES4 (non inductor) with two-dimensional gels (2D-PAGE) in strips of immobilized pH gradient of 3-10. The results have showed that the non inductor PES (PES4) had a total of 34 spots; in the other hand the inductor PES (PES6) had a total of 72. The comparative analysis showed a total of 13 differential spots found (pH range 6.6-8 and p.m. 73-223 kD) which could be responsible for the Tregs induction.

To summarize, the findings of this study suggest that the *Taenia crassiceps* cysticerci is capable of producing (E/S) which *in vivo* induce T lymphocytes towards a regulatory phenotype (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺). This could be considered as a possible escape route of the parasite to the host immune response.

Keywords: *Taenia crassiceps*, Treg, excretory-secretory product

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
CONTENIDO	III
INDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS	VIII
INDICE DE GRÁFICAS	IX
INDICE DE ABREVIATURAS	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Cisticercosis humana	3
2.1.1 Cisticercosis experimental.....	4
2.1.2 Ciclo Biológico de <i>Taenia crassiceps</i>	6
2.2 Respuesta Inmune del hospedero ante una Infección con <i>Taenia crassiceps</i>	8
2.3 Evasión de la respuesta Inmune	12
2.4 Productos de Excreción y Secreción como mecanismo de evasión Inmunológica.....	12
2.5 Utilización de células T reguladoras como mecanismo de evasión Inmunológica.....	15
2.6 Células T reguladoras (Treg).....	17
2.7 Proteómica como herramienta para la caracterización de proteínas de Excreción y Secreción	19

III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Obtención de animales de experimentación.....	22
3.2 Estrategia Experimental General.....	22
3.3 Obtención de parásitos.....	24
3.4 Obtención de los productos (E/S).....	24
3.5 Diálisis	25
3.6 Liofilización	26
3.7 Obtención del extracto total del cisticerco	26
3.8 Cuantificación de proteínas	27
3.9 Prueba de inducción de células T reguladoras.....	28
3.10 Adquisición de muestras y análisis por citometría de flujo	30
3.11 Caracterización de las proteínas de los productos (E/S) que inducen células T reguladoras	31
3.12 Protocolos para Caracterización Proteómica	33
3.12.1 Desalación con Columna NAP 5.....	33
3.12.2 Cuantificación con el Kit 2D-Quant.....	34
3.12.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	35
3.12.4 Kit 2D Clean Up.....	36
3.12.5 Precipitación con TCA-DOC-Acetona.....	36
3.12.6 Rehidratación de tiras IPG.....	37
3.12.7 Isoelectroenfoque.....	37
3.12.8 Electroforesis en geles de policrilamida bidimensionales (2D-PAGE).....	39
3.12.9 Análisis proteómico de los productos (E/S).....	39

3.13	Análisis estadístico	40
IV.	RESULTADOS	41
4.1	Evaluación de los productos (E/S) del cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> para la inducción de células Treg	41
4.1.1	Productos de excreción-secreción N° 4 (PES4).....	41
4.1.2	Productos de excreción-secreción A (PESA).....	42
4.1.3	Productos de excreción-secreción N° 5 (PES5).....	43
4.1.4	Productos de excreción-secreción N°6 (PES6).....	45
4.1.5	Extracto Total del cisticerco.....	47
4.2	Caracterización de las proteínas de los productos (E/S) que inducen células T reguladoras.	50
V.	DISCUSIÓN	57
VI.	CONCLUSIONES	62
VII.	RECOMENDACIONES	63
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
IX.	ANEXOS	77
Anexo 1.	Cuantificación por método de Lowry	77
Anexo 2.	Análisis del Fenotipo de las Treg por citometría de Flujo.....	78
Anexo 3.	Preparación de Geles	79
Anexo 4.	Gráfica Técnica de <i>Immobiline Drystrip</i> Visualization of pH gradients	80
Anexo 5.	Spots Totales del producto (E/S) N°4	81
Anexo 6.	Spots Totales del producto (E/S) N°6	82

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig.1. Áreas endémicas de <i>Taenia solium</i> a nivel mundial, 2015 (Imagen adaptada del Organismo Mundial de la Salud (OMS))	4
Fig.2. Cisticercosis experimental	5
Fig.3. Ciclo Biológico de <i>Taenia crassiceps</i>	7
Fig.4. Respuesta Inmune del hospedero ante una infección con cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	11
Fig.5. Gráfica de barras de las células Treg en peritoneo de ratón a los 5, 30, 90 y 130 días de infección con cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> ($P < 0.05$) (Imagen donada por Adalid y cols., 2014).....	16
Fig.6. Expresión fenotípica de las células Treg (Imagen autor, 2016).....	19
Fig.7. Representación esquemática del 2D-PAGE. (Imagen modificada de Bjorn, 2014)	20
Fig.8. Flujograma de la Estrategia Experimental General	23
Fig.9. Ratones infectados con cisticercosis de <i>Taenia crassiceps</i> , cepa ORF (Imagen autor, 2016).....	24
Fig.10. Diálisis de los productos (E/S) (Imagen autor, 2016)	25
Fig.11. Liofilización de los productos (E/S) (Imagen autor, 2016)	26
Fig.12. Inyección Intraperitoneal en el ratón.....	28
Fig.13. Estrategia experimental para la caracterización de proteínas de los productos (E/S)	32
Fig.14. Equipos utilizados para el Isoelectroenfoco	38
Fig.15. Perfil electroforético del PES6 luego de la desalación con columnas NAP5 en Gel de Policrilamida (SDS-PAGE) 12% Teñido con azul de Coomassie.....	51
Fig.16. Electroforesis 2D-PAGE del PES6 luego de limpiarlas con el Kit 2D-Clean Up. Gel de pH 3-10 y 15% de acrilamida teñido con azul de Coomassie.....	51

Fig.17. Electroforesis 2D-PAGE del PES6 luego de limpiarlas con TCA-DOC-Acetona. Gel de pH3-10 y 15% de acrilamida teñido con azul de Coomassie	52
Fig.18. Electroforesis 2D-PAGE del PES6 luego de limpiarlas con el Kit 2D-Clean Up. Gel de pH 3-10 y 15% de acrilamida teñido con azul de Coomassie	52
Fig.19. Electroforesis 2D-PAGE del PES4 (NO INDUCTOR). Gel de pH 3-10 y 15% de acrilamida teñidos con azul de Azul Coomassie. Un Total de 34 spots.	53
Fig.20. Electroforesis 2D-PAGE del PES6 (INDUCTOR). Gel de pH 3-10 y 15% acrilamida teñido con azul de Coomassie. Un Total de 72 spots.	54
Fig.21. Análisis comparativo de geles para obtener los spots conservados y diferenciales de los productos (E/S)	55

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Tiempo de Infección de los cultivos <i>in vivo</i> con cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	25
Tabla 2 Preparación de la curva estándar de albumina de suero bovino	34
Tabla 3 Programación de IPGphor	38
Tabla 4 Resumen de las pruebas de Inducción de células Treg con los productos (E/S)	49
Tabla 5 Resumen de las pruebas de Inducción de células Treg con los extractos totales de los cisticercos.....	50

INDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráf. 1 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> por PES 4	41
Gráf. 2 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> por PESA	42
Gráf. 3 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> por PES5 Exp.1	43
Gráf. 4 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> por PES5 Exp.2	43
Gráf. 5 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> por PES5 Exp.3	44
Gráf. 6 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> por PES6 Exp.1	45
Gráf. 7 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> por PES6 Exp.2	45
Gráf. 8 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> por PES6 Exp.3	46
Gráf. 9 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> por PES6 Exp.4	46
Gráf. 10 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> utilizando el extracto CAC.....	47
Gráf. 11 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> utilizando el extracto CIC.....	48
Gráf. 12 Inducción de células Treg <i>in vivo</i> utilizando el extracto CFC....	48
Gráf. 13 Análisis de los Spots diferenciales de los productos (E/S)	56

INDICE DE ABREVIATURAS

Arg-1	Arginasa 1
APS	Persulfato de Amonio
BALB/cAnN	Cepa de <i>Mus musculus</i>
C1q	Subunidad de la proteína C1 del complemento
CAC	Cisticercos antes de Iniciar el cultivo con medio RPMI
Ca²⁺	Ion Calcio
CD	Cluster de diferenciación
CFC	Cisticercos al finalizar el cultivo
CIC	Cisticercos al inicio del cultivo con medio DMEM
CO²	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígeno
DMEM	Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
DOC	Desoxicolato de sodio
DO	Densidad óptica
E(n)	Fracción de elución
E/S	Excreción-Secreción
Exp.	Experimento
Fig.	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FoxP3	Factor de Transcripción Forkhead box P3
FSC	Tamaño
HSP	Proteína de choque térmico
iCD	Célula dendrítica inmadura
IEF	Isoelectroenfoque
IFN-γ	Interferón gama
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IL-	Interleucina
IL-1β	Interleucina-1beta
IL-4Rα	Receptor alfa de Interleucina-4
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
IPG	Tiras para electroforesis de Isoelectroenfoque
iTreg	Célula T reguladora inducida
kDa	Kilo Dalton
MAA ϕ	Macrófagos alternativamente activados

MAC	Macrófagos clásicos activados
MDSC	Células supresoras de origen mieloide
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Milli-Q	Agua purificada sistema Millipore Milli-Q
MMR	Receptor de manosa de macrófagos
NC	Neurocisticercosis
Nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
nTreg	Célula T reguladora natural
OMS	Organización Mundial para la Salud
PBS	Solución salina de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PerCp	Complejo proteico peridina-clorofila
PES	Productos de Excreción-Secreción
pH	Potencial hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
RELMα	Molécula parecida a la resistina alfa
RPMI 1640	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SN	Sobrenadante
SNC	Sistema Nervioso Central
SSC	Granularidad
TA	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloro acético
TCR	Receptor de células T
TEMED	N, N, N, N'-tetrametilen-diamina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocitos T helper de tipo 1
Th2	Linfocitos T helper de tipo 2
Th3	Células T reguladoras de tipo 3
Tr1	Células T reguladoras de tipo 1
Treg	Células T reguladoras
2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

I. INTRODUCCIÓN

Una de las parasitosis con mayor prevalencia en áreas urbanas como rurales a nivel mundial es la cisticercosis. Esta enfermedad desatendida y asociada con la pobreza es causada por la instalación del metacéstodo de *Taenia solium* y es considerada de vital importancia cuando su localización es el sistema nervioso central. La neurocisticercosis se considera una importante causa de morbilidad neurológica en el Perú. Entre las regiones comprometidas, se encuentran toda la Sierra, Costa Norte y Selva Alta, dentro de las cuales destacan departamentos como Ayacucho y Tumbes.

La cisticercosis murina se presenta como una alternativa experimental, para investigar la relación hospedero-parásito debido a que metacéstodo de *Taenia crassiceps* comparte características similares con *Taenia solium*.

El éxito del parásito se basa en la variedad de estrategias que posee para lograr evadir la respuesta inmune del hospedero, generando así su establecimiento y supervivencia durante un largo periodo de tiempo. Dentro de los mecanismos de escape que utiliza el metacéstodo del género *Taenia* en el presente estudio se resaltarán: la inducción de células T reguladoras y la liberación de productos de Excreción-Secreción (E/S) con capacidad inmunomoduladora.

Las células T reguladoras son las encargadas de modular la respuesta inmune del hospedero, conservando así la homeostasis del mismo. Por otro lado, estudios recientes confirman que el cisticerco de *Taenia crassiceps* tiene la capacidad de inducir células T reguladoras *in vitro* que son las encargadas de generar un ambiente ideal para el establecimiento del parásito. Sin embargo actualmente se desconoce si el metacéstodo de *Taenia crassiceps* libera moléculas en los productos (E/S) capaces de

inducir células T reguladoras o si bien son las moléculas constitutivas del metacéstodo son las que poseen esta función.

Teniendo en cuenta que los productos (E/S) son obtenidos durante los procesos biológicos vitales y que participan e interaccionan activamente en la inducción y modulación de la respuesta inmune del hospedero, es de vital importancia el poder identificar y caracterizar las moléculas responsables de la inducción de las células Treg; ya que esto permitirá ahondar en los mecanismos biológicos de evasión que utiliza el cisticerco ante el hospedero. Además este conocimiento podría ayudar a concebir una molécula con características anti-inflamatorias que sea capaz de contener los mecanismos patogénicos del parásito. Por lo cual el presente estudio plantea identificar los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia crassiceps* que inducen células T reguladoras.

II. ANTECEDENTES

2.1 Cisticercosis humana

La cisticercosis humana es una enfermedad parasitaria causada por el establecimiento del metacéstodo de *Taenia solium* en tejidos como el músculo esquelético, tejido celular subcutáneo y músculo cardíaco. Sin embargo la localización de la larva que genera mayores complicaciones, letalidad y secuelas, es en el sistema nervioso central (SNC), tomando el nombre de Neurocisticercosis (NC) siendo la principal causa de epilepsia adquirida a nivel mundial (1,2).

Esta parasitosis afecta a millones de personas en países en vías de desarrollo, y es endémica en Latinoamérica, Asia y África. En el mundo más del 80% de los 50 millones de personas afectadas por esta parasitosis viven en países de medianos y bajos ingresos (3,4) (Fig.1.). La proliferación y transmisión del parásito son favorecidas por: métodos primitivos de crianza de cerdos, pobreza, falta de higiene y saneamiento, así como la falta de control en la calidad de la carne destinada al consumo humano (5,6).

Las migraciones hacia regiones no endémicas han ido elevando su frecuencia; antes inusual en países europeos, Estados Unidos y Canadá, entre otros (7).

Aproximadamente 2.5 millones de personas en el mundo son portadoras de *Taenia solium* y, al menos, 20 millones presentan cisticercosis (8).

Se estiman 50.000 muertes por NC al año. En Latinoamérica se ha descrito que la Neurocisticercosis está presente en 18 países, con alrededor de 350.000 individuos afectados (9,10).

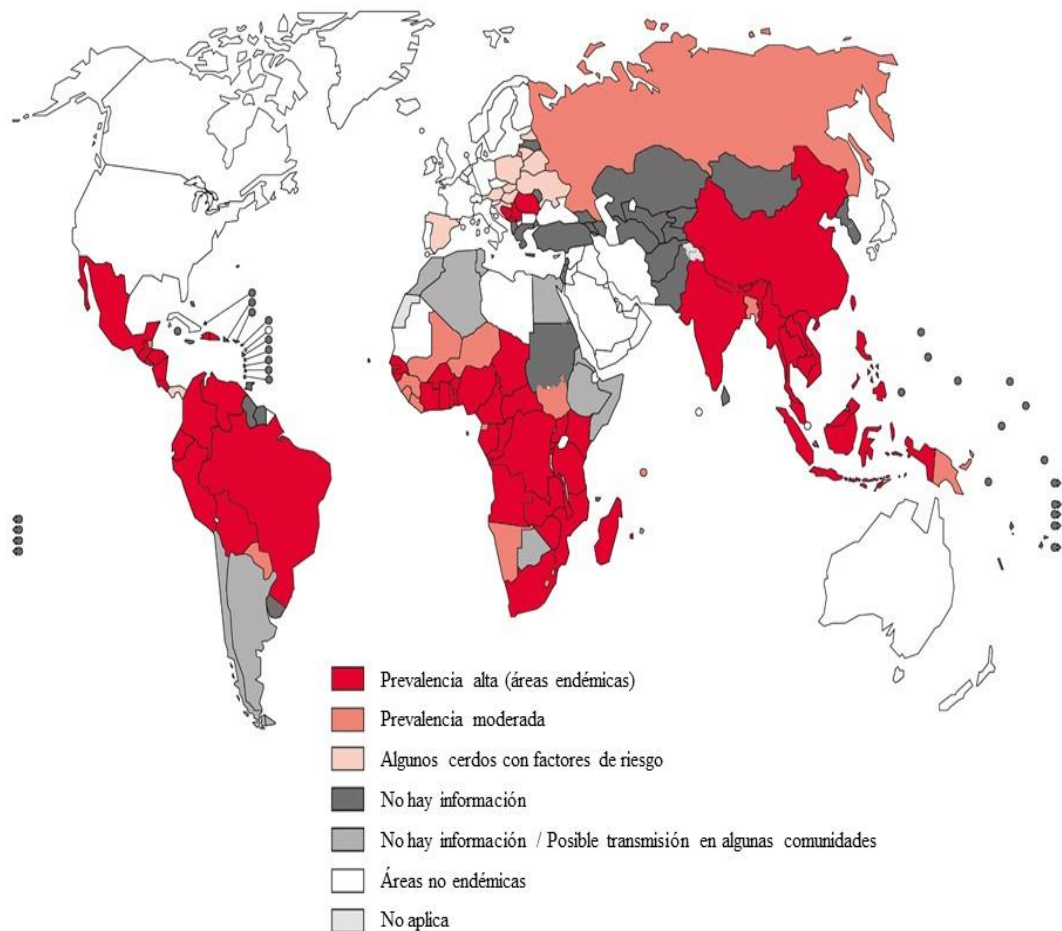


Fig.1. Áreas endémicas de *Taenia solium* a nivel mundial, 2015 (Imagen adaptada del Organismo Mundial de la Salud (OMS)).

El principal factor de riesgo para adquirir la cisticercosis es tener un portador de *Taenia solium* en el hogar o cerca del mismo; ya que una persona puede liberar unos 250.000 huevos por día. (3) En Perú, las regiones comprometidas se encuentran en toda la Sierra, Costa Norte y Selva Alta (11).

2.1.1 Cisticercosis experimental

La cisticercosis murina experimental es causada por la inoculación intraperitoneal del metacéstodo de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF a ratones hembras con fondo genético BALB, siendo la cepa BALB/cAnN la más susceptible a la infección (12, 13,14).

Este modelo se propone como una alternativa experimental; ya que el metacéstodo de *Taenia crassiceps* comparte características similares con *Taenia solium* como la composición antigénica, anatomía y morfología, ciclos de vida, relación hospedero-parásito y respuesta inmune (15, 16,17). Además ambos metacéstodos estimulan al sistema inmune con una gran cantidad de antígenos complejos de origen protéico, glicoprotéico y lipídico (18,19).

Los metacéstodos o cisticercos de *Taenia crassiceps* se reproducen asexualmente por gemación siendo recuperados y mantenidos por pases sucesivos (20). Se han aislado diferentes cepas de *Taenia crassiceps* (ORF, WFU, HYG, KBS) a partir de cisticercos de ratones silvestres (12, 21).

La más empleada, quizás por su rápida capacidad de reproducción en la cavidad peritoneal de los ratones, ha sido la cepa ORF, la cual perdió la capacidad de transformarse en *Taenia* porque no tienen escólex invaginado (12,14)(Fig.2.).



Fig.2. Cisticercosis experimental

A) Utilización de roedores B) Inoculación intraperitoneal de cisticercos de *Taenia crassiceps*. C) Reproducción por gemación (Imagen autor, 2016).

Este modelo experimental es caracterizado por su fácil manejo en condiciones controladas de laboratorio, tanto *in vivo* como *in vitro*; tiene un rápido establecimiento y proliferación de la enfermedad, y se asemeja a la enfermedad natural (14, 15, 22,23). Lo cual nos permite entender y definir los factores biológicos que afectan la susceptibilidad y resistencia a esta enfermedad. Así como factores genéticos, inmunológicos, y hormonales que se han relacionado con la resistencia (20).

2.1.2 Ciclo Biológico de *Taenia crassiceps*

Taenia crassiceps (Zeder, 1800) es un platelminto de la clase céstoda, del orden *cyclophyllidea* de la familia *Taeniidae* a la cual pertenecen varias especies.

Este gusano plano y segmentado en su fase adulta está conformado por tres partes: por un órgano fijador llamado escólex, un cuello angosto y un cuerpo elongado que consiste en varios cientos de proglótidos. La unión lineal de las proglótidos forma una larga cadena o estróbila que constituye el cuerpo, cada proglótido es a la vez unidad de alimentación y reproducción ya que éste gusano es hermafrodita (12,23).

Su sistema de alimentación es rudimentario, carece de órganos de especialización, absorbiendo los nutrientes a través del tegumento de las proglótidos por ósmosis y pinocitosis. A lo largo de la estróbila se diferencian: proglótidos grávidos, maduros e inmaduros (23, 24,25).

La fase larvaria cisticerco o metacéstodo, también denominado *Cysticercus longicollis* (Rudolphi 1819) se caracteriza por ser de forma oval y translucido con un diámetro de 4-5 mm (26).

Su ciclo de vida comienza cuando su hospedero definitivo (en su mayoría son zorros y perros, entre otros carnívoros) porta al gusano adulto en el lumen del intestino delgado, expulsan al medio ambiente excremento que contiene proglótidos grávidos los cuales son ingeridos por roedores

salvajes (hospedero intermediario)(12). Una vez ingeridos los huevos pierden su cubierta y se liberan las oncósferas, las cuales atraviesan la pared intestinal y entran al flujo sanguíneo alcanzando a los músculos, tejido subcutáneo, pleural y cavidad peritoneal donde se diferencia a la etapa larval o cisticerco y puede proliferar por gemación asexual (27).

El ciclo termina cuando los cánidos se alimentan de roedores infectados, desarrollarse nuevamente el parásito adulto en el hospedero definitivo (12) (Fig.3.).

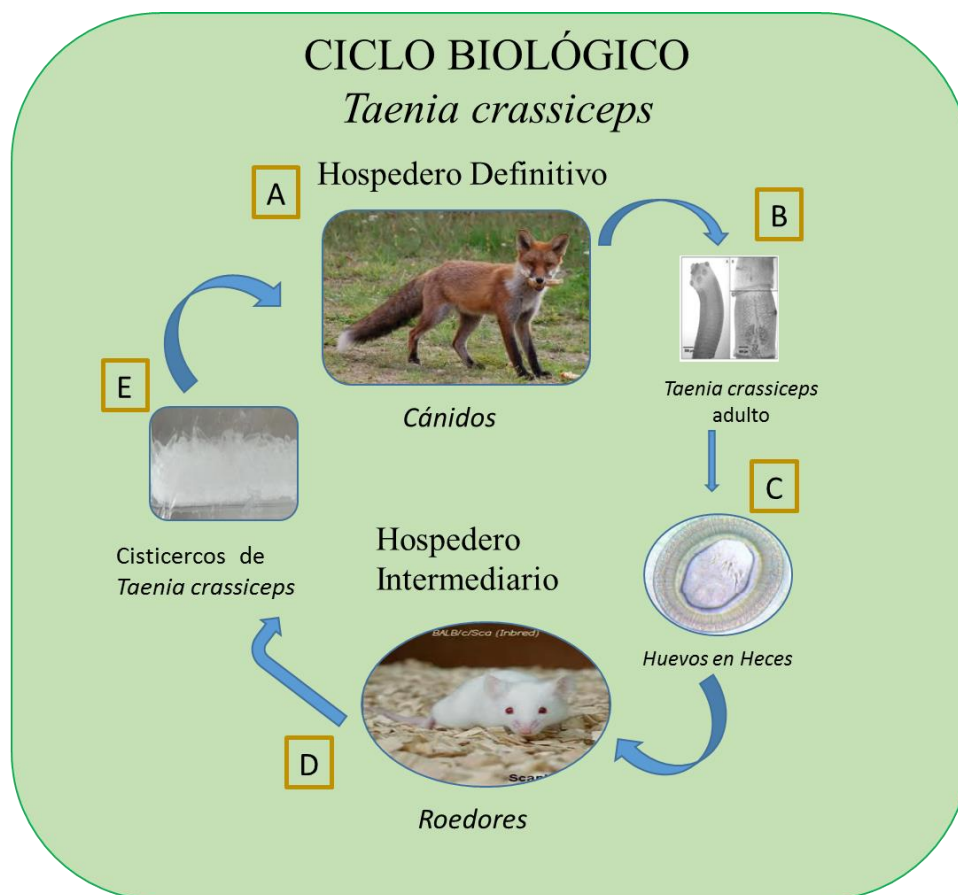


Fig. 3. Ciclo Biológico de *Taenia crassiceps*

A) Hospedero definitivo; B) Parásito adulto en el intestino del hospedero; C) Huevos liberados en las heces; D) Hospedero Intermediario; E) Proliferación del metacéstodo en el hospedero intermediario y cuando el carnívoro lo ingiere inicia nuevamente el ciclo. (Imagen autor, 2016).

2.2 Respuesta Inmune del hospedero ante una Infección con *Taenia crassiceps*

Una de las principales funciones del sistema inmunológico, es proteger al organismo mediante una supervisión constante. Millones de células del sistema inmunológico son capaces de detectar estructuras potencialmente patógenas, propias o ajenas (3,28).

A diferencia de las infecciones breves y agudas que producen las bacterias y virus, las infecciones por protozoarios o helmintos son prolongadas y crónicas, ya que cada parásito puede persistir en el hospedero durante periodos largos.

Los helmintos presentan características que dificultan al hospedero controlarlos inmunológicamente (29). Sus características más llamativas son: persistencia a largo plazo dentro del hospedero, la capacidad para provocar una inmunidad protectora y los ciclos de desarrollo complejos que a menudo involucra antígenos específicos en la etapa (30).

La eficacia de la respuesta inmunológica adaptativa recae en la proliferación clonal selectiva linfocitaria, su posterior diferenciación a células efectoras tipo Th1 o Th2, con la subsiguiente producción de citocinas; y a células plasmáticas con la consecuente producción de inmunoglobulinas específicas contra los antígenos del parásito (3,29).

Diversos estudios realizados a la respuesta inmunológica montada por *Taenia crassiceps* y sus antígenos en ratones BALB/c demuestran que la infección en la 1^{era} y 2^{da} semana tiene la capacidad para inducir respuestas primarias correspondientes a la fase aguda con un perfil de citocinas Th1 el cual se polariza hacia el tipo Th2 a partir de la 4ta semana y conforme avanza la infección las respuestas se vuelven crónicas (31).

La resistencia a este parásito se ha asociado con la participación de citocinas de perfil Th1, altos niveles de Interferón Gamma, IL-2 y Óxido Nítrico (NO), Macrófagos clásicos activados (MAC) y anticuerpos IgG2a (23,31).

En fases más tardías, el perfil de citocinas Th2 provoca un incremento en la carga del parásito, que va acompañado de la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 y IL-13 y anticuerpos IgE, IgG2b, IgG1. También se ha observado un aumento de células tales como eosinófilos, basófilos, mastocitos y células dendríticas inmaduras en la sangre y en el sitio de infección.

Estos cambios en la secreción de citocinas se acompañan, con la inducción de los macrófagos alternativamente activados (MAA ϕ), células supresoras de origen mieloide (MDSC) y las células T reguladoras (Treg) (31, 32, 33).

Los factores de transcripción STAT4 y STAT6 también están involucrados en la modulación de la respuesta inmune en los ratones infectados con *Taenia crassiceps*. Rodríguez y cols. (2002) demostraron que ratones deficientes en la funcionalidad del gen (STAT6 $-/-$) infectados con *Taenia crassiceps* son capaces de controlar la infección al montar una fuerte respuesta Th1.

Esto quedó confirmado cuando se infectaron ratones STAT4 $(-/-)$, los cuales fueron altamente susceptibles con una clara deficiencia de la respuesta Th1. Estas observaciones sugieren que el perfil Th1 es crítico para el desarrollo de una inmunidad protectora que restringe la replicación del parásito (34, 35).

La polarización inmunológica hacia un perfil Th2 en conjunto con la inducción de MAA ϕ que muestran una elevada expresión de Arg1 (arginasa-1), Ym-1, RELM- α (Molécula similar a la resistina alfa), MMR (Receptor de manosa de macrófagos), TREM-2 e IL-4R α (Receptor alfa de

interlucina 4) generan un aumento en la carga parasitaria durante la cisticercosis murina experimental causada por *Taenia crassiceps* (34,36).

Estudios recientes sugieren que el parásito induce una respuesta Th2 con el fin de mantenerse y sobrevivir en el hospedero (31,37) (Fig.4.).

INICIO DE LA INFECCIÓN

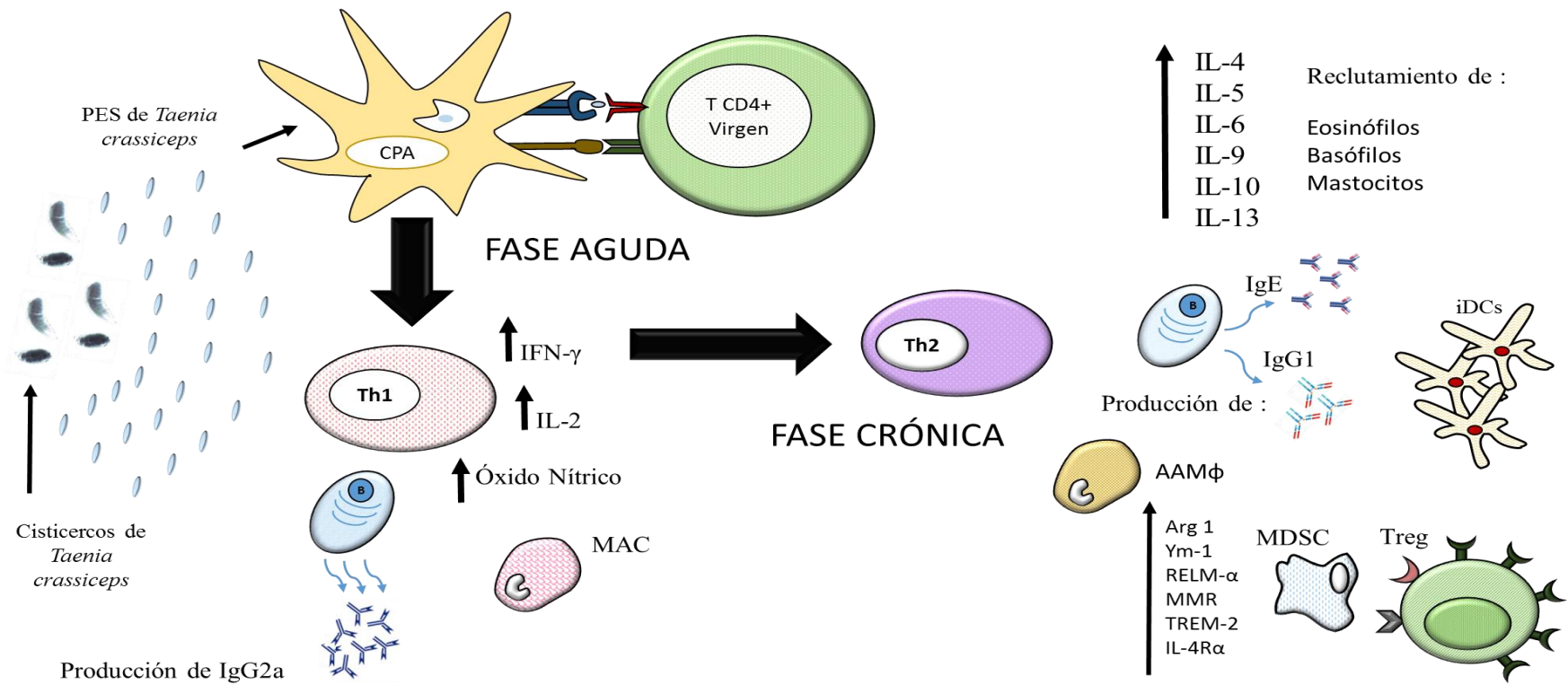


Fig. 4. Respuesta Inmune del hospedero ante una infección con cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Se ejemplifican las moléculas implicadas (PES: Productos de excreción-secreción; CPA: Célula presentadora de antígeno; IFN-γ: Interferón gamma; B: Linfocitos B; MAC: Macrófagos clásicos activados; AAMφ: Macrófagos alternativamente activados; MDSC: células supresoras de origen mieloide; iDCs: Células dendríticas inmaduras; Treg: Linfocitos T reguladores (Imagen autor, 2016).

2.3 Evasión de la respuesta Inmune

Aun cuando el hospedero elabora una variedad de dispositivos de protección en contra del parásito, éste es capaz de sobrevivir por largo tiempo utilizando mecanismos de evasión que ha desarrollado a lo largo de su existencia (38).

Diversos estudios demostraron que los helmintos tienen capacidades inmunomoduladoras que les permite persistir en el hospedero y pueden dar lugar a interacciones con los mecanismos inflamatorios e inmunológicos implicados (39, 40, 41, 42, 43).

Los metacéstodos del género *Taenia* presentan alrededor de ellos una reacción inflamatoria abundante que les permite sobrevivir durante largos periodos en su hospedero, probablemente porque los parásitos pueden estar regulando la respuesta inmune por medio de mecanismos de evasión (44, 45), entre los que se han propuesto: Recubrimiento con moléculas del hospedero (46); inhibición de la proliferación de Linfocitos T (47); Cambio de perfil Th1-Th2 (31, 48); Liberación de moléculas solubles con capacidad inmunomoduladora (49, 50, 51) y Presencia de células Treg (33).

2.4 Productos de Excreción y Secreción como mecanismo de evasión inmunológica

Los productos de excreción-secreción (E/S) son liberados por los parásitos, ya sea como proteínas de desecho (excreción) o moléculas funcionales (secreción) que sirven como factores de crecimiento que promueven un ambiente favorable para la supervivencia del parásito mediante la modulación de la respuesta inmune (52, 53, 54).

Dichos productos están involucrados en procesos biológicos vitales, como los procesos de oxidación-reducción, adhesión, migración y comunicación celular, diferenciación, proliferación, morfogénesis, defensa, factores de

virulencia, y en las respuestas inmunes (55,56). Sin embargo el papel más importante de estos productos (E/S) es permitir la comprensión de la relación hospedero-parásito.

El metacéstodo de *Taenia* posiblemente libera moléculas solubles con capacidad inmunomoduladora como un mecanismo de evasión a la respuesta inmunitaria montada por el hospedero.

A lo largo del tiempo se han descrito algunas de estas moléculas solubles que interaccionan con el sistema inmune del hospedero. Dentro de las cuales se encuentra el antígeno B que es una paramiosina liberada por los cisticercos de *Taenia solium* que tiene la propiedad de unirse al C1q a través de sus dominios de tipo colágena, lo que resulta en una inhibición de la cascada del complemento. Además es capaz de inhibir la producción de mediadores complementarios de inflamación, es decir que posiblemente desempeña un papel inmunomodulador de la respuesta del hospedero (57,58).

El factor metacéstodo es una molécula de ARN-péptido que tiene la capacidad de inhibir la proliferación celular inducida por mitógenos y suprimir la producción de citocinas proinflamatorias. La citocinas intervienen en la comunicación celular, por lo tanto la supresión de su producción se puede considerar como un importante mecanismo de modulación de la respuesta del hospedero, asegurando la supervivencia del parásito en un ambiente hostil (59, 60).

La Anexina B1 producida por los metacéstodos de *Taenia solium* es miembro de una familia multigénica de proteínas que se caracterizan por su capacidad de unión reversible a fosfolípidos aniónicos de una manera dependiente de Ca^{2+} . Esta proteína se une a la superficie extracelular de los eosinófilos humanos y produce un flujo de calcio hacia la célula, que causa apoptosis, lo cual puede constituir una estrategia novedosa de los metacéstodos para prevenir el ataque inmune del hospedero (61, 62).

Se ha demostrado que los productos (E/S) contienen enzimas proteolíticas como las cisteínoproteasas que son importantes por su papel crítico en el ciclo de vida y patogenicidad de varios parásitos. Esta diversidad funcional está dada por su adaptación a diversos sustratos y su estabilidad en diferentes ambientes biológicos, además que estas proteasas cumplen roles claves en la inmunoinvasión parasitaria (51).

Molinari y cols. (2000) demostraron que estas enzimas pueden disminuir *in vitro* la expresión de CD4⁺ lo cual puede interferir con la generación de la respuesta inmune del hospedero y por lo tanto aumentar la supervivencia del parásito (63).

Una de estas enzimas proteolíticas es la catepsina L, importante para la penetración, infección y virulencia de varios parásitos (64) (65) (66). Esta enzima secretada por el metacéstodo de *Taenia solium* tiene la capacidad para degradar anticuerpos IgG del hospedero evadiendo así la respuesta inmunológica (51).

Al comparar la actividad peptidasa de productos (E/S) de la oncósfera de *Taenia solium* y *Taenia saginata*, con actividad serinopeptidasas (homólogas a quimiotripsina, tripsina, elastasa), cisteíno peptidasas (homólogas a catepsina L, catepsina B y calpaína) y aminopeptidasas (homóloga a peptidasa B), se han observado diferentes patrones de actividad catalítica. Las diferencias entre los perfiles de actividad de las peptidasas entre ambos parásitos, explicarían el rol modulador de las enzimas proteolíticas en la especificidad del hospedero que posiblemente ocurre durante la penetración de la mucosa intestinal (67).

Baig y cols. (2005) presentaron la caracterización preliminar de proteasas secretadas-excretadas por el cisticerco de *Taenia crassiceps* que incluía una metalo-aminopeptidasa y una endopeptidasa. Estas enzimas proteolíticas tienen la capacidad de degradar IL-2 e IgG, respectivamente, *in vitro*. La degradación de IL-2 se ve asociado a la polarización de Th1 a Th2 en cisticercosis murina, mientras que la degradación de IgG puede

permitir la evasión a la respuesta inmunitaria. Estos datos sugieren un papel clave de las proteasas secretadas por los parásitos en las interacciones hospedero-parásito (68).

Los productos (E/S) también presentan antígenos solubles glicosilados que comparten parte de su estructura de N-glicanos con los observados en antígenos de *Schistosoma* (69). Su principal función es reclutar una población de células supresoras de origen mieloide (CSDM) modulando así la respuesta proliferativa de las células T *in vitro*, para favorecer la polarización de Th1 a Th2 y la inducción de MAA ϕ (70).

Recientes estudios reflejan la capacidad potencial de los productos (E/S) del cisticerco de *Taenia crassiceps* para modular las respuestas inflamatorias, a través de diferentes mecanismos como la modulación de la maduración de células dendríticas para optimizar la polarización de Th1 a Th2 y la inhibición de la activación de STAT1 en respuesta a IFN- γ (71, 72, 73).

2.5 Utilización de células T reguladoras como mecanismo de evasión Inmunológica

Se han reportado numerosos mecanismos a través de los cuales las Tregs median el control de la inflamación de diversas parasitosis (33) como en Esquistosomiasis y Leishmaniasis, debido a que estas células controlan la inmunopatología a través de la producción de la IL-10 (74, 75, 76, 77).

Los parásitos utilizan diferentes vías para evadir la respuesta inmunológica del hospedero, la inducción de células Treg genera una novedosa oportunidad para modular la respuesta inmunoinflamatoria (78, 79).

Estudios recientes demuestran que la inducción de células T reguladoras parece estar relacionado, con promover un ambiente más permisivo para el establecimiento del parásito lo cual asegura su supervivencia en el hospedero (33, 78).

Durante la cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps*, se ha demostrado que el parásito es capaz de inducir células Tregs *in vitro* (33).

Estudios *in vivo* han demostrado que en la infección por *Taenia crassiceps* en ratones BALB/c las células Treg se incrementan al inicio y en la fase crónica de la enfermedad (Fig.5.). Lo que sugiere que cisticerco induce células Treg para favorecer su instalación y supervivencia (80).

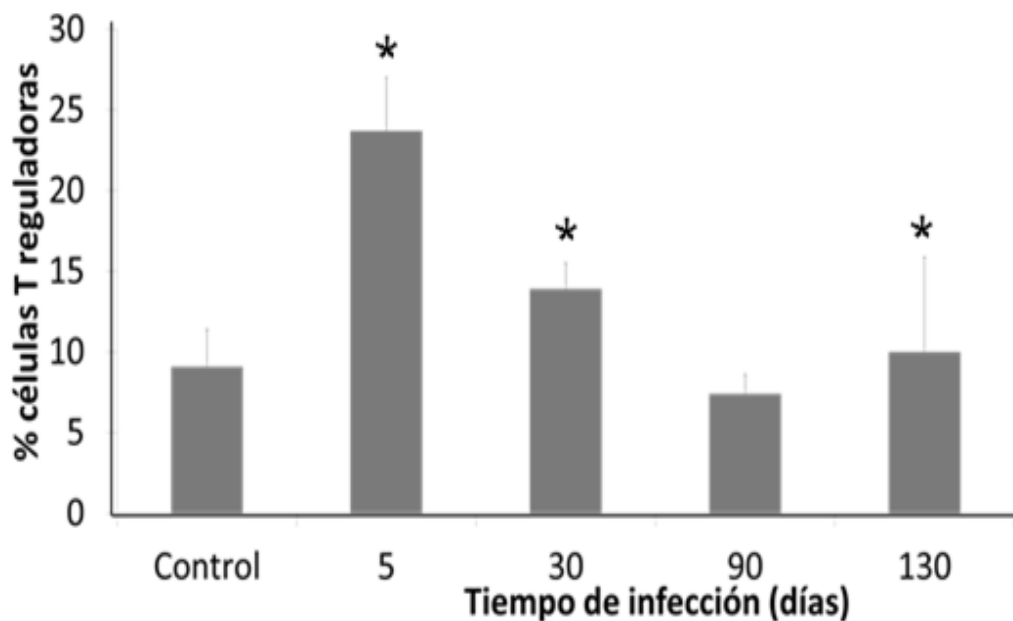


Fig.5. Gráfica de barras de las células Treg en peritoneo de ratón a los 5, 30, 90 y 130 días de infección con cisticercos de *Taenia crassiceps* ($P < 0.05$) (Imagen donada por Adalid y cols., 2014).

Estos hallazgos tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que los cisticercos de *Taenia crassiceps* podrían estar regulando la respuesta inmune a través de células Tregs.

2.6 Células T reguladoras (Treg)

Los primeros estudios realizados a células T reguladoras (Treg), antes llamadas células T supresoras, demostraron que son una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ que modulan activamente las respuestas inmunes patológicas y fisiológicas, y, por lo tanto, contribuyen al mantenimiento de la autotolerancia inmunológica y homeostasis inmune (81, 82).

Los dos principales tipos de linfocitos Treg son las células T reguladoras naturales (nTreg) y las células T reguladoras inducidas (iTreg) (83,84).

Las células Treg naturales se originan durante el proceso normal de maduración de los linfocitos T en el timo. En 1995 el estudio de Sakaguchi y cols. demostró que las nTreg constituyen aproximadamente, entre el 5% al 10% de las células T CD4⁺ de sangre periférica en ratones adultos sanos (85, 86, 87, 88).

Las células Treg inducidas que son generadas durante la respuesta inmune en la periferia a partir de células T vírgenes, las iTreg se generan durante el curso de una respuesta inmunológica (83).

En modelos *in vitro* se ha demostrado que para inducir la diferenciación de los linfocitos T a linfocitos Treg se requiere la activación de una serie de cascadas de señalización y la expresión del factor de transcripción FoxP3 (89, 90).

La primera señalización se da cuando la célula presentadora de antígeno (CPA) comienza a presentar los péptidos del antígeno que están vinculados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II, permitiendo la activación a los linfocitos T CD4⁺ que expresan TcRs específicos a ese complejo péptido/MHC II. De hecho, la densidad de TCR en la superficie celular y su afinidad para el antígeno juegan un papel clave en la inducción de Treg. (91) Una vez recibida la primera señal TcR/CD3, el linfocito T debe activar una segunda vía bioquímica independiente, conocida como la segunda vía de señalización que involucra la interacción

entre el receptor CD28 en la superficie de los linfocitos T CD4⁺ y las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en las CPAs (92,93).

Luego de activadas ambas vías de señalización dentro del linfocito T, la célula se permite iniciar el proceso de proliferación al liberar un potente factor de crecimiento celular llamado interleucina-2 (IL-2). La maduración de los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ en presencia de citocinas reguladoras como IL-10, TGF- β e IL-35 favorece la generación, función y mantenimiento de células Treg (94, 95, 96). Lo más probable, es que el fenotipo regulador de un linfocito T depende de las moléculas expresadas en la superficie celular, su interacción con las moléculas del medio ambiente, y la señalización intracelular (96).

Por otro lado, las principales vías de inducción de Treg se establecen a partir del contacto de las células T con células dendríticas (maduras (CD) y semimaduras (iCD) en conjunto con un microambiente supresor donde predominan citocinas antiinflamatorias (Interleucina 10 (IL-10); Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β) e Interleucina 35 (IL-35) y glucocorticoides (78).

Existen otros estirpes celulares de Treg como, las células Tr1 las cuales secretan grandes cantidades IL-10 y las Th3 caracterizadas por la secreción de TGF- β (89, 97).

En el modelo experimental murino tanto las nTreg como las iTreg están caracterizadas por el fenotipo CD4⁺, CD25⁺ y FoxP3⁺ (78) (Fig.6.).

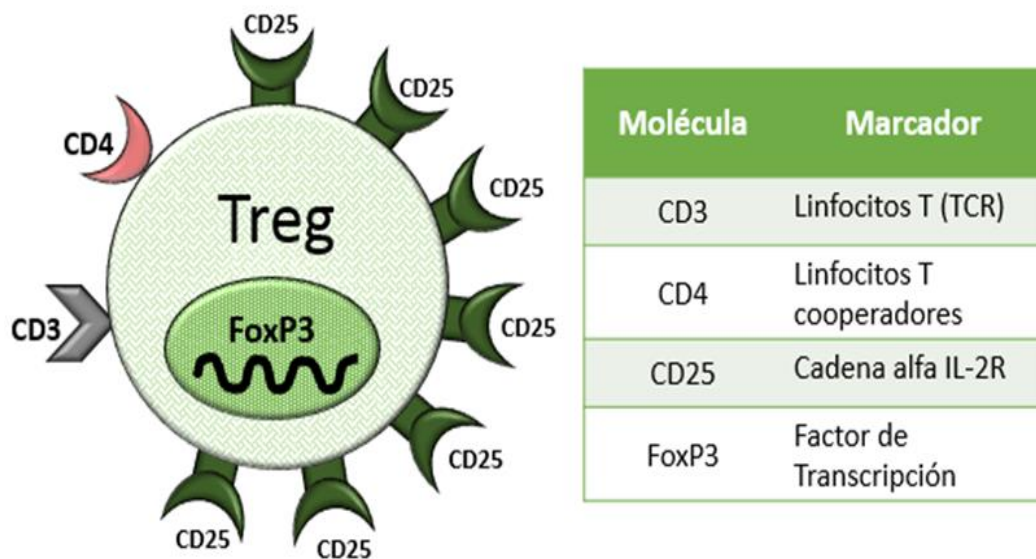


Fig.6. Expresión fenotípica de las células Treg (Imagen autor, 2016).

2.7 Proteómica como herramienta para la caracterización de proteínas de Excreción y Secreción

En la actualidad la proteómica es una disciplina que funge como herramienta para la caracterización e identificación de proteínas excretadas-secretadas que están involucradas en la virulencia, mantenimiento y supervivencia de helmintos parásitos dentro de los cuales se encuentra *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Fasciola* y *Taenia solium* (98, 99, 100, 101, 102).

Uno de los métodos más comunes de separación de proteínas es la electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que separa las proteínas basándose en su tamaño (masa molecular), lo que le permite determinar su peso molecular. En el SDS-PAGE se utilizan agentes desnaturantes de proteínas, que pueden ser: detergentes (p.e. SDS), caótopos (p.e. urea) y agentes reductores (2- mercaptoetanol, DTT). Cuando las proteínas se solubilizan en presencia del detergente aniónico

dodecil sulfato sódico (SDS), éste se une a las proteínas, rompiendo interacciones hidrofóbicas y desnaturalizándolas. Para la visualización de las proteínas se utilizan diferentes métodos de tinción, siendo el más habitual el azul de Coomassie. Esta técnica electroforética permite la separación de proteínas de 10-300 kDa (103).

Casi al mismo tiempo, salió a relucir otra técnica de separación, llamada Isoeléctroenfoco (IEF) que es un tipo particular de electroforesis en la que los compuestos anfóteros se separan según su punto isoeléctrico (pI; pH al cual la carga neta de la proteína es nula) en un gradiente continuo de pH. Esta técnica permite separar las 4.000-5.000 proteínas de una célula (104, 105).

Unos años más tarde, las dos técnicas se combinaron llamándose electroforesis en geles de policrilamida bidimensionales (2D-PAGE). La alta resolución de esta técnica recae en que, las dos separaciones se basan en parámetros independientes. La innovación clave para la 2D-PAGE fue el desarrollo de geles con un gradiente de pH inmovilizado (IPG) (106,107, 108, 109) (Fig.7.).

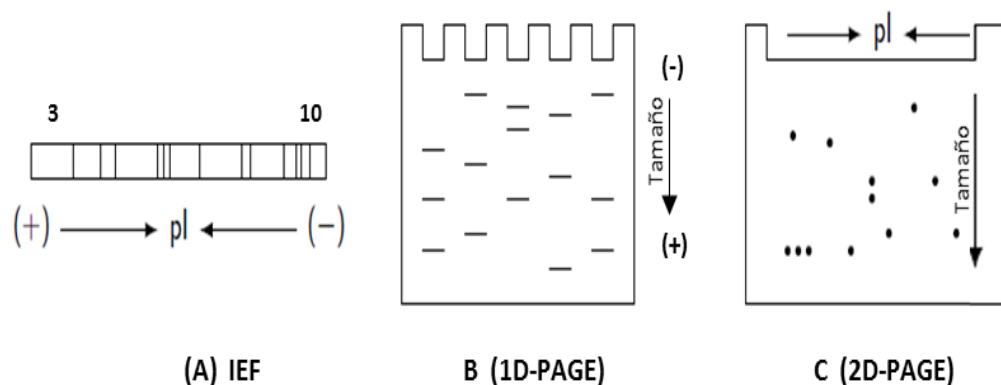


Fig.7. Representación esquemática del 2D-PAGE. (Imagen modificada de Bjorn, 2014).

El gradiente de pH inmovilizado elimina los problemas de inestabilidad del gradiente y baja capacidad de carga que iban asociados a los gradientes

de pH preparados con anfolitos acarreadores. En los geles IPG, el gradiente es generado por las llamadas “inmobilinas” y está copolimerizado con la matriz de acrilamida del gel. Concluida la primera dimensión, la tira se carga sobre un gel desnaturante de poliacrilamida donde las proteínas se separan de acuerdo con su masa molecular. Así se obtiene un mapa bidimensional de manchas proteicas que podrá ser visualizado mediante distintas técnicas de tinción (azul de Coomassie, tinción con plata o Sypro Ruby). Los geles teñidos se escanean y digitalizan usando diferentes programas informáticos (ImageMaster, PD Quest) y se obtiene un mapa del conjunto de proteínas de una muestra en un gel (110,111).

Este sistema ha permitido mejorar la resolución y reproducibilidad de los geles así como aumentar la cantidad de proteína que puede ser cargada, generando una visualización simultánea de cientos de proteínas en un único gel (112).

Además, la técnica 2D-PAGE puede detectar isoformas de la proteína y modificaciones postraduccionales. Estas características han hecho 2D-PAGE una opción muy popular para la investigación proteómica (111,113, 114).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de animales de experimentación

Los ratones fueron adquiridos en el Bioterio de tipo Mixto convencional del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velazco Suárez.

Selección de animales:

Especie:	<i>Mus musculus</i>
Cepa:	Balb/cAnN
Sexo:	Hembras
Edad de los animales:	3-4 semanas de edad
Periodo de a climatización:	7 días antes del inicio del experimento.
Alimentación:	El alimento usado fue una dieta de mantenimiento básico de ratones. El alimento y agua estuvieron disponibles <i>ad libitum</i> .

3.2 Estrategia Experimental General

El presente trabajo desarrollo la parte experimental en 7 etapas (Fig.8.):

- 1) Obtención de parásitos
- 2) Cultivos
- 3) Obtención de los productos (E/S) y extractos totales de los cisticercos de *Taenia crassiceps*
- 4) Cuantificación de proteínas
- 5) Prueba de Inducción de las células T reguladoras *in vivo*
- 6) Adquisición y Análisis del Fenotipo celular de las Treg
- 7) Caracterización de las proteínas de los productos (E/S)

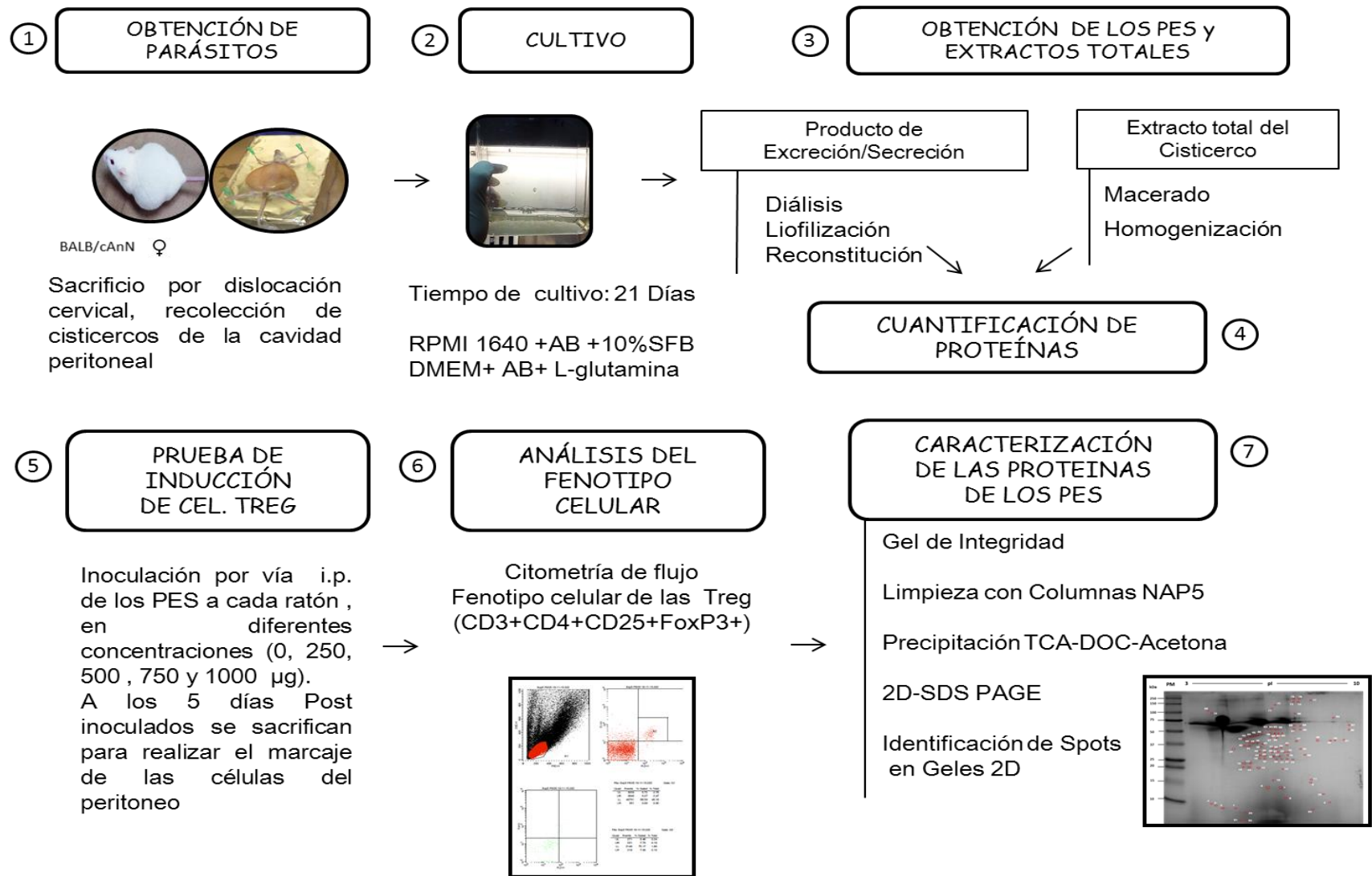


Fig.8. Flujograma de la Estrategia Experimental General

3.3 Obtención de parásitos

Se emplearon cisticercos de *Taenia crassiceps*, cepa ORF, los cuales fueron mantenidos por pases sucesivos intraperitoneales de ratón a ratón. Para recuperar los cisticercos se sacrificaron a los ratones por dislocación cervical en diferentes tiempos de infección (Fig.9.).



Fig.9. Ratones infectados con cisticercosis de *Taenia crassiceps*, cepa ORF (Imagen autor, 2016).

3.4 Obtención de los productos (E/S)

Se realizaron cultivos independientes de cisticercos *in vitro* durante 21 días. Los cisticercos recuperados fueron lavados con solución salina Fisiológica al 0.9% NaCl y cultivados en frascos de 15 ml durante 3 días con 112 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y antibiótico Gibco *Pen-Strep*. Cada 24 horas el medio fue renovado. El sobrenadante de los primeros tres días fue desechado para eliminar los productos del metabolismo del hospedero. Posteriormente, al 4to día se cambió a medio DMEM suplementado con *L-glutamina* y antibiótico Gibco *Pen Strep* agregando 60 ml de medio por frasco. Cada tercer día se cambió el medio y se colectaron los sobrenadantes conteniendo los productos (E/S)

del parásito hasta el día 21. Los frascos de cultivo se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Se suministró 1 pastilla de inhibidor de proteasas Complete ULTRA tablets por cada 100 ml de sobrenadante recolectado para prevenir la degradación de las proteínas.

En la tabla 1 se podrá encontrar la denominación y el tiempo post-infección de los cultivos que se realizaron durante la tesis.

ID	Tiempo de infección
PES A	200 días
PES 4 (*)	245 días
PES 5	198 días
PES 6	194 días

Tabla 1. Tiempo de Infección de los cultivos *in vivo* con cisticercos de *Taenia crassiceps*.

(*) El cultivo denominado PES 4, fue trabajado desde la prueba de Inducción.

3.5 Diálisis

El sobrenadante recolectado contiene las proteínas de excreción-secreción (E/S) por lo cual se dializó con agua milli-Q en una membrana Spectra/Por con número de poro 3.5 kDa. La diálisis se realizó a 4 °C durante 7 días en agitación constante (Fig.10.).

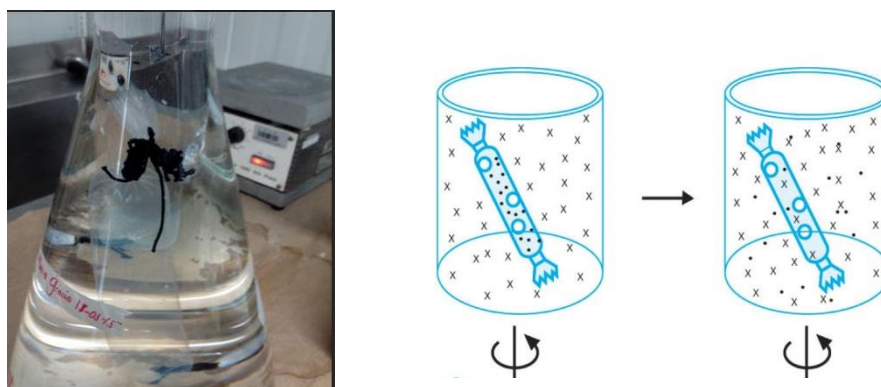


Fig.10. Diálisis de los productos (E/S) (Imagen autor, 2016).

3.6 Liofilización

Las proteínas de excreción-secreción (E/S) parasitarias se concentraron por liofilización con el sistema seco de congelación de Labconco Freezezone 4.5. El liofilizado se reconstituyó en agua destilada libre de RNAsas y DNAsas UltraPure® en proporción 1:10000 (Fig.11.).

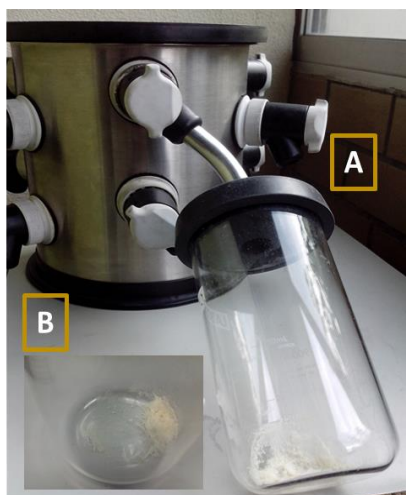


Fig.11. Liofilización de los productos (E/S) (Imagen autor, 2016).

A: Vaso Liofilizador con el producto (E/S) y B: Producto (E/S)

3.7 Obtención del extracto total del cisticerco

Los cisticercos fueron recolectados en tres tiempos: 60 ml antes de Iniciar el cultivo con RPMI 1640; 30 ml al Inicio del cultivo con DMEM y 60 ml al finalizar el cultivo. Se almacenaron en frío; el primer día a -20°C y luego a -80°C .

- Homogenización y Ultracentrifugación del Extracto total del cisticerco: Se colocaron 2ml de cisticercos de cada tiempo de recolección en diferentes tubos de ensayo y se utilizó el POLYTRON® 2500 E para homogenizarlos. Se trabajaron en hielo y luego se procedió a ultracentrifugarlos. Se recuperó el

sobrenadante (SN) que contenía las proteínas de los extractos totales.

3.8 Cuantificación de proteínas

Se cuantificó la concentración de proteínas de los productos (E/S) y del extracto total del cisticerco por el método de Lowry (115). Esta técnica se basa en la reducción de una mezcla de ácidos que forman el reactivo cromógeno de Folin-Ciocalteu por la oxidación de los aminoácidos aromáticos de las proteínas. Se utiliza cobre como catalizador de la reacción ya que este último forma un quelato con la estructura peptídica que facilita la transferencia de electrones a la mezcla cromogénica de ácidos, produciendo una o más especies reducidas las cuales tienen un característico color azul con una $\lambda_{\text{máx}}$ 745-750 nm y una λ_{min} a 405 nm.

Se utilizaron los siguientes reactivos y soluciones:

- Reactivo 1: Tartrato de sodio-potásico al 2%
- Reactivo 2: Sulfato cúprico (CuSO_4) al 1%
- Reactivo 3: Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) al 2% en Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1N
- Reactivo 4: Folin-Ciocalteu
- Solución A: Se mezclaron 0.5 ml del reactivo 1 y 2, respectivamente y se agregaron 49 ml del reactivo 3.
- Solución B: Se mezcló un volumen del reactivo 4 con un volumen de Agua milli-Q. (v/v).

Se utilizaron 2 curvas estándar de albumina de 1 mg/ml y de 0.1 mg/ml para poder obtener la concentración de la muestra.

Para la cuantificación se agregaron 3 ml de la Solución A en la muestra y se dejó incubando durante 10 minutos a Temperatura ambiente (TA).

Posteriormente se agregaron 0.3 ml de la solución B y se incubó durante 30 minutos a TA.

Al finalizar la incubación se procedió a leer las absorbancias a una densidad óptica de 620nm en el espectrofotómetro para celdas (Anexo 1).

3.9 Prueba de inducción de células T reguladoras

Se realizó la inoculación intraperitoneal de los productos (E/S) a diferentes concentraciones (0, 250, 500, 750 y 1000 μg) por cada ratón. Para conseguir la inoculación, primero se inmovilizara al ratón utilizando los dedos pulgar e índice para sostener un pliegue de piel en la región del cuello, tensando apenas lo suficiente para que el animal no gire su cabeza, mientras que los otros dedos aprisionan la cola y la parte posterior del ratón contra la mano, luego se inclinará al animal hacia un costado para que la masa visceral se desplace ligeramente, reduciendo la posibilidad de que la punción lesione algún órgano (116) (Fig.12.). Se utilizaron 4 ratones por cada condición y se marcaron de manera específica para poder diferenciar las dosis.

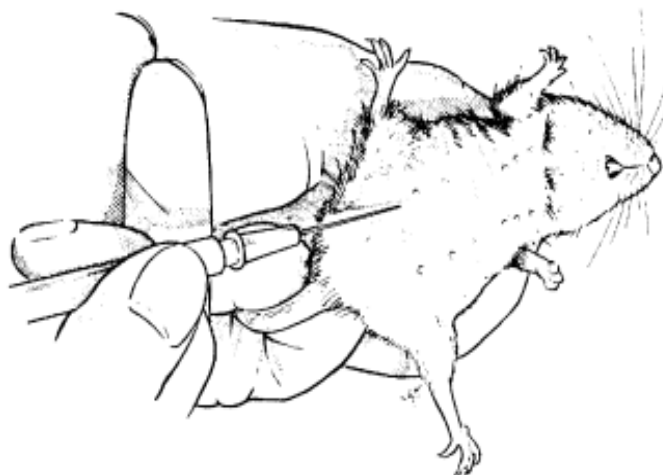


Fig.12 Inyección Intraperitoneal en el ratón (NOM-062-ZOO-1999)

Cinco días post-inoculación se sacrificaron a los ratones por dislocación cervical a partir de lo cual se procedió al marcaje de las células T reguladoras del peritoneo de la siguiente manera:

- Marcaje Extracelular:

Se realizaron lavados con solución salina Fisiológica al 0.9% NaCl al peritoneo por cada ratón, luego se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min, para así poder realizar el conteo celular en la cámara de Neubauer con una dilución 1/5 con azul de Tripano 1x. Por cada uno de los marcajes se emplearon 1×10^6 células/ml de células peritoneales para cada condición.

Se añadieron 20 μ l del anticuerpo CD16/CD32 dejándolo incubar durante 25 min a 4°C para así poder bloquear los sitios de unión inespecífica extracelular, posteriormente se adicionaron los anticuerpos para marcaje extracelular:

- FITC anti-mouse CD3e
- PerCp-Cy5.5 Rat Anti-mouse CD4
- APC Rat anti-mouse CD25
- Isotipo (FITC Hamster IgG1, κ Isotype control; Percp-cy5.5 rat IgG2a, κ ; APC IgG1, Mouse)

Todos los anticuerpos monoclonales se incubaron durante 25 min a 4°C. Terminado el tiempo de incubación se realizó un lavado con Buffer PBS suplementado con SFB10% y se centrifugó a 1700 rpm durante 10 minutos. Las células que solo llevaban marcaje extracelular fueron fijadas con 200 μ L de paraformaldehído al 2% y almacenadas a 4°C hasta su lectura en el citómetro.

- Marcaje Intracelular

Se utilizó la técnica de Permeabilización adicionando 300 µl de solución de Fijación/Permeabilización, dejándolo incubar a 4°C durante 14-16 hrs. Posteriormente se realizó un lavado con el Buffer de Perm/Wash y se centrifugó a 1700 rpm durante 10 minutos. Luego se añadió 20 µl del anticuerpo de bloqueo CD16/CD32 dejándolo incubar a 4°C durante 25 min. Transcurrida esta incubación se añadieron los anticuerpos de marcaje Intracelular:

- PE Anti-mouse/Rat FoxP3
- Isotipo (PE Rat IgG2a,κ)

Se dejaron incubando a 4°C durante 25 min y por último se lavaron con el Buffer de Perm/Wash y fijaron con 200 µl de paraformaldehído al 2%.

3.10 Adquisición de muestras y análisis por citometría de flujo

La adquisición de muestras se realizó en el citómetro FACScalibur. Este citómetro permite el análisis de dos parámetros de dispersión (dispersión lateral o Granularidad (SSC) y dispersión frontal o Tamaño (FSC)) y cuatro detectores de fluorescencia (FL1 (FITC), FL2 (PE), FL3 (PerCp) y FL4 (APC)) con dos láseres.

Para obtener la región o Gate de Linfocitos T se adquirieron 50 mil eventos (células contadas por segundo) en los tubos de células solas, células permeabilizadas y tratamientos (0, 250, 500,750 y 1000 µg) y 25 mil eventos para los tubos de compensación de fluorocromos (FITC, PE, PerCp y APC) e Isotipos de cada uno de los tratamientos (control y dosis).

Una vez adquiridos los datos se trabajaron con el programa Cytometer Cell Quest Analyses (Becton Dickinson). Para el análisis de las células Treg se definió una región de linfocitos T (R1) basándose en el tamaño y la

granularidad. Posteriormente utilizando R1 se creó una imagen en dos dimensiones de citometría de flujo (Dot Plot) basándose en la expresión de los dobles positivos con respecto a FITC CD3⁺ y PerCp CD4⁺ se creó una segunda región (R2) proveniente del R1. Finalmente a partir de R1 y R2 se realizó un cuádruple marcaje, definiendo las células Treg como dobles positivas en la expresión de APC CD25⁺ y PE FoxP3⁺.

El fenotipo celular de Treg (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) fue evaluado de manera porcentual (Anexo 2).

3.11 Caracterización de las proteínas de los productos (E/S) que inducen células T reguladoras

Se realizó un gel de Integridad (SDS-PAGE) con el fin de ver el estado de nuestras proteínas. Al visualizar impurezas, se decidió probar tres técnicas diferentes de desalación de muestra con el objetivo de obtener la mayor cantidad de proteína pura con menor cantidad de muestra (Fig.13.).

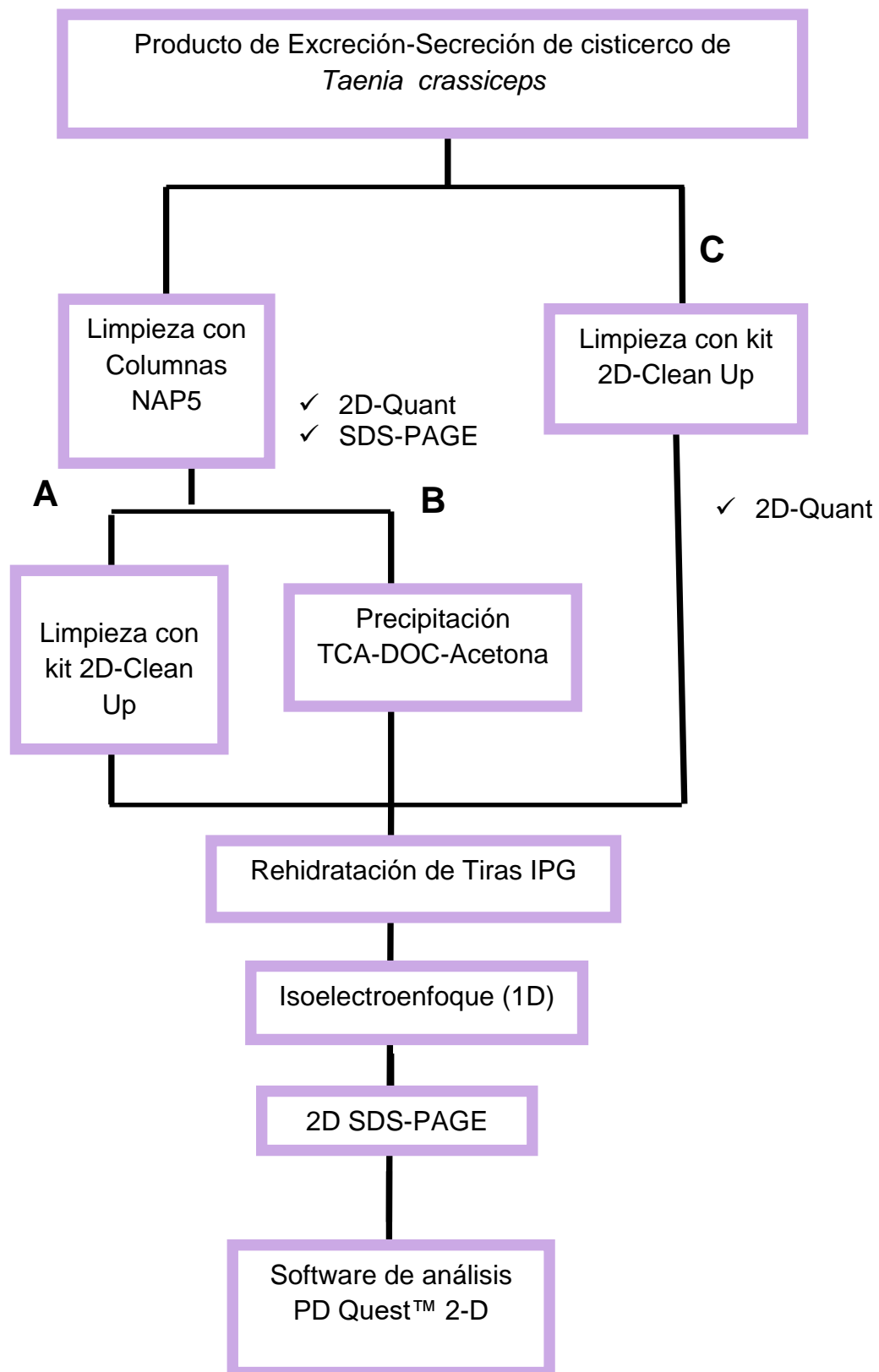


Fig.13. Estrategia experimental para la caracterización de proteínas de los productos (E/S).

3.12 Protocolos para Caracterización Proteómica

3.12.1 Desalación con Columna NAP5

Las columnas NAP5 fundamentan su aplicación en cromatografía de exclusión molecular que les permite la separación de moléculas diferentes presentes en una misma muestra. Estas columnas están recubiertas de dextranos con enlaces cruzados (sephadex).

Las columnas NAP5 utilizan dos Buffers:

- I. Buffer de trabajo de fosfatos 10 Mm (Na_2HPO_4 1M, NaH_2PO_4 H_2O 1M)
- II. Buffer de elución (Buffer de trabajo de fosfatos 10 Mm + 2% CHAPS)

En primer lugar se descartó el Buffer de conservación de las columnas, luego se pasaron 5 volúmenes de H_2O milli-Q y 5 volúmenes de buffer de trabajo para equilibrar la columna. La muestra se diluyó en proporción 1:4 con el buffer de elución. Posteriormente se agregó 1 ml de la muestra en la columna para iniciar la recolección. Para evitar pérdida de muestra, se recolectaron 8 fracciones por cada muestra que se desalaba por la columna (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8). Al finalizar, se añadió 3 ml de buffer de trabajo y 5 ml mínimo de H_2O milli-Q para limpiar la columna y poder almacenarla con 20% etanol- H_2O milli-Q a 4 °C. Las fracciones eluidas son monitoreadas a 280 nm (menos de 0.08 en densidad óptica (DO) indica que no hay presencia de proteínas). Aquellas que tengan más de 0.08 DO se colectan en pool. Se utilizaron columnas independientes por cada muestra.

3.12.2 Cuantificación con el Kit 2D-Quant

En contraste, con el método de Lowry, el Kit 2D-Quant (marca GE Healthcare) nos permite cuantificar y posteriormente analizar a las proteínas con técnicas de alta resolución como SDS-PAGE, IEF o 2D-PAGE.

Este ensayo se basa en la unión específica de los iones de cobre a las proteínas. Las proteínas son precipitadas y resuspendidas en una solución que contiene cobre, mientras que el cobre no unido se mide con un reactivo colorimétrico. La densidad de color es inversamente relativa a la concentración de proteínas.

Se preparó una curva estándar utilizando los mg/ml de la solución estándar de albumina de suero bovino (BSA) suministrada en el kit. Se configuraron seis tubos y se añadió BSA de acuerdo con la tabla 2.

# Tubo		1	2	3	4	5	6
Volumen	2 mg/ml	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
BSA standard solution							
[] proteína		0 µg	10 µg	20 µg	30 µg	40 µg	50 µg

Tabla 2. Preparación de la curva estándar de albumina de suero bovino

El intervalo útil del ensayo es de 0.5-50 µg.

Primero se añadieron 500 µl de precipitante, se agitaron e incubaron los tubos durante 3 min a temperatura ambiente, luego se adicionaron 500 µl de co-precipitante y se mezclaron brevemente por agitación.

Los tubos se centrifugaron a un mínimo de 14 500 rpm durante 20 min, hasta que se visualizó una pequeña pastilla blanquecina. Se decantaron

los sobrenadantes (SN), para luego añadirles 500 μ l del reactivo de cobre a cada tubo y luego se agitó brevemente hasta que se disolvió el pellet. En seguida se añadió 1 ml del reactivo de color de trabajo a cada tubo; se mezcló por inversión e incubó a temperatura ambiente durante 15-20 min. Para finalizar se agregó 200 μ l de cada tubo en la placa de 24 pocillos para poder leer la absorbancia a 480 nm.

3.12.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó en geles de 7 x 10 cm con un espesor de 1.0 mm. El gel separador se preparó a una concentración de acrilamida de 12% y el gel concentrador al 4.5%. La polimerización se llevó a cabo a temperatura ambiente. (Anexo 3)

Las muestras fueron desnaturalizadas diluyéndolas 1:1 (v:v) con buffer de muestra (Tris 120 mM pH 6.3, glicerol 10 %, SDS 4 %, azul de bromofenol 0.1 % y β -mercaptoetanol).

Se utilizó el marcador de peso molecular 250 kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375, Bio-Rad).

La electroforesis se corrió a 60 V, hasta que el gel separador hubo sido resuelto, entonces se elevó el voltaje a 120 V hasta el fin del gel concentrador. Posteriormente, el gel se tiñó durante una hora con una solución que contiene 0.25 g del colorante Coomassie Brilliant Blue (R-250), disuelto en 125 ml de isopropanol y 50 ml de ácido acético.

Finalmente se destiñó el gel en una solución de ácido acético 10%: metanol 40%: agua 50%.

3.12.4 Kit 2D Clean Up

El Kit 2D Clean Up (marca GE Healthcare) es recomendado para la limpieza de muestras con más de 100 µg de proteína.

Para cada volumen de muestra, se añadieron 3 volúmenes de precipitante, se mezclaron e incubaron durante 15 min a 4°C. Finalizada la incubación se añadieron 3 volúmenes de co-precipitante y se mezclaron mediante agitación. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. Al eliminar el SN se añadió 3 o 4 volúmenes de co-precipitante según el tamaño del pellet y se colocó a centrifugar a 4000rpm durante 10 min. Descartado el SN, se pipeteó suficiente agua milli-Q en la parte superior de cada pastilla para cubrir el pellet, se añadió 1 ml de buffer de lavado y 5 µl de buffer de lavado additive.

Se incubó a -20°C durante al menos 30 minutos y se agitó durante 20 a 30 segundos una vez cada 10 minutos. Al término de la incubación se centrifugó a 4000rpm durante 10 min. Al descartar el SN se observó una pastilla blanquecina (pellet).

3.12.5 Precipitación con TCA-DOC-Acetona

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Ácido Tricloro Acético (TCA)100%
- Desoxicolato de Sodio (DOC) 2%
- Acetona 100%
- Buffer de rehidratación: 8M urea, 2% CHAPS, 0.5%IPG buffer*, 20mM Ditiotretitol (DTT) y 0.004% azul de bromofenol (se adicionan al momento de rehidratar).

Se añadió DOC a un volumen de muestra para obtener una concentración final de 0.02%. Se mezcló por agitación y se dejó a temperatura ambiente por al menos 15 min (Dilución 1/100).

Posteriormente se añadió TCA hasta alcanzar una concentración del 10%. Se adicionaron 100 µl de TCA 100% (líquido), se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por al menos 1 hora (Dilución 1/10).

Concluida la hora, se centrifugó por 30 min a 14 500rpm 4°C, luego se descartó el SN por decantación. Se añadieron 1000 µl de acetona previamente enfriada a -20°, se mezcló y mantuvo en hielo por 15 min. (Agitación cada 5 minutos). Se realizó una nueva centrifugación de 30 min a 14 500 rpm a 4°C. Por último se descartó el SN y se dejó secar el pellet por no más de 5 min para facilitar la resuspensión.

3.12.6 Rehidratación de tiras IPG

Cada pellet se resuspendió en 130µL de buffer de rehidratación, 1.5 µl de DTT 50X y 1.5 µL de anfolitas; durante 2 horas a 37°C en agitación constante. Se rehidrató cada tira IPG (*Immobiline™ DryStrip*) pH 3-10 de 7cm con 125 µL de buffer de rehidratación – muestra durante 16 h en el recipiente de rehidratación cubriendo con aceite mineral (1500 µl) para evitar desecación.

3.12.7 Isoelectroenfoque

Se preparó el equipo de IEF IPGphor III a 20°C. El manifold se recubrió con aceite mineral. (aprox 110ml) Se prepararon los wickpads, estos se humedecieron con 150µl de agua milli-Q. Una vez rehidratadas las tiras, se colocaron en el manifold cuidando la orientación de la tira.

Se colocaron los pads hidratados sobre cada extremo de la tira, tocando aproximadamente 0.5cm del gel. Se situaron los electrodos sobre los pads

de manera que se asegure el contacto entre ellos y con la plataforma de corriente (Fig.14.).

El IPGphor se corrió con el programa que se muestra en la tabla 3:

Por pasos	100 V	150 V/h
Por pasos	300 V	200 V/h
Por gradiente	1000 V	300 V/h
Por gradiente	5000 V	4500 V/h
Por pasos	500 V	2000 V/h

Tabla 3. Programación de IPGphor

El tiempo estimado de corrida es entre 6 a 10 horas, dependiendo de la muestra. Una vez focalizadas las tiras se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior.

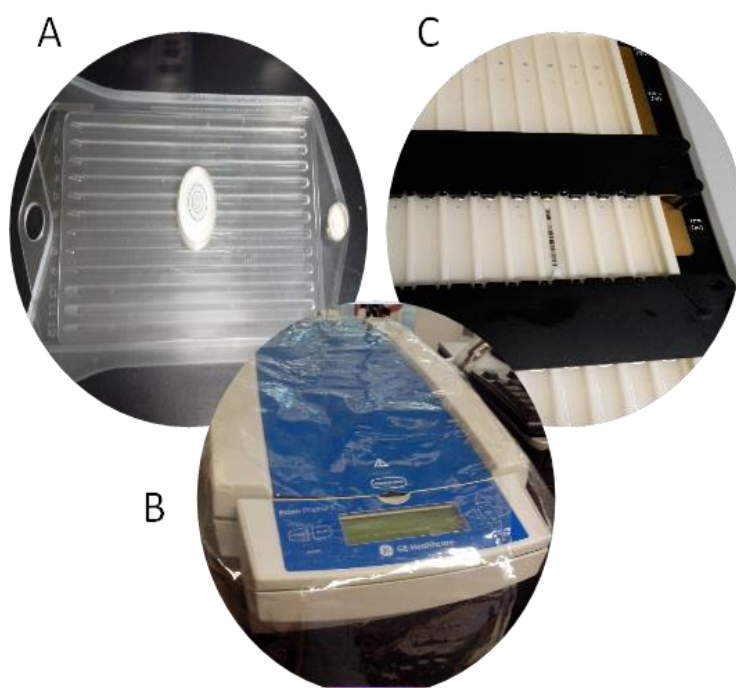


Fig.14. Equipos utilizados para el Isoelectroenfoco

A) Manifold; B) IEF IPGphor III; C) Tira IPG (Imagen autor, 2016).

3.12.8 Electroforesis en geles de policrilamida bidimensionales (2D-PAGE)

Las tiras almacenadas a -80 °C se equilibraron con buffer de equilibrio al cual por cada 2 ml se le agregaron 20 µl de DTT 100X. A cada tira de 7 cm se le agregó 1 ml de buffer de equilibrio durante 10 min a temperatura ambiente en agitación constante. Se retiró el buffer de equilibrio y se le adicionó nuevamente 1 ml de buffer de equilibrio renovado durante 10 min a temperatura ambiente en agitación constante. Se prepararon con anterioridad geles de 10 x 12 cm con un espesor de 1.5 mm. El gel separador se preparó a una concentración de acrilamida de 15% y el gel concentrador al 4.5%. La polimerización se llevó a cabo a temperatura ambiente (Anexo 3).

Se utilizó el marcador de peso molecular 250 kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375, Bio-Rad).

Con ayuda de unas pinzas, espátula y tijeras se acomoda la tira ya equilibrada dentro del pozo en el gel teniendo siempre en cuenta la carga de la tira y que el plástico de la tira quede en contacto con el vidrio. El gel se corrió en la cámara fría (4 °C) a 60 V hasta que supera el límite del gel concentrador. Posteriormente, se elevó el voltaje a 120 V, hasta el final del gel.

3.12.9 Análisis proteómico de los productos (E/S)

Las imágenes de todos los geles fueron obtenidas con el fotodocumentador MiniBIS Pro y el paquete computacional DNR GelCapture.

Se utilizó el Software de análisis PD Quest™ 2-D de Biorad para la identificación de los spots en los geles Bidimensionales de los productos (E/S).

Los puntos Isoeléctricos se calcularon manualmente con base a lo descrito por el proveedor (Amersham Biosciences) como referencia se utilizó el tríptico técnico '*Immobiline Drystrip* Visualización of pH gradients' N°, 18-1140-60 (ofrecido por el fabricante), se buscó el punto isoeléctrico en las gráficas provistas por el fabricante (Anexo 4).

El programa analizó los geles Bidimensionales proporcionándonos los PMs de los productos (E/S) inductores y No inductores de moléculas de células Treg.

3.13 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos de Inducción de células Treg se sometieron a análisis estadístico, utilizando el programa GraphPad InsStat, utilizando la prueba *t* de Student para datos no-pareados. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo.

IV. RESULTADOS

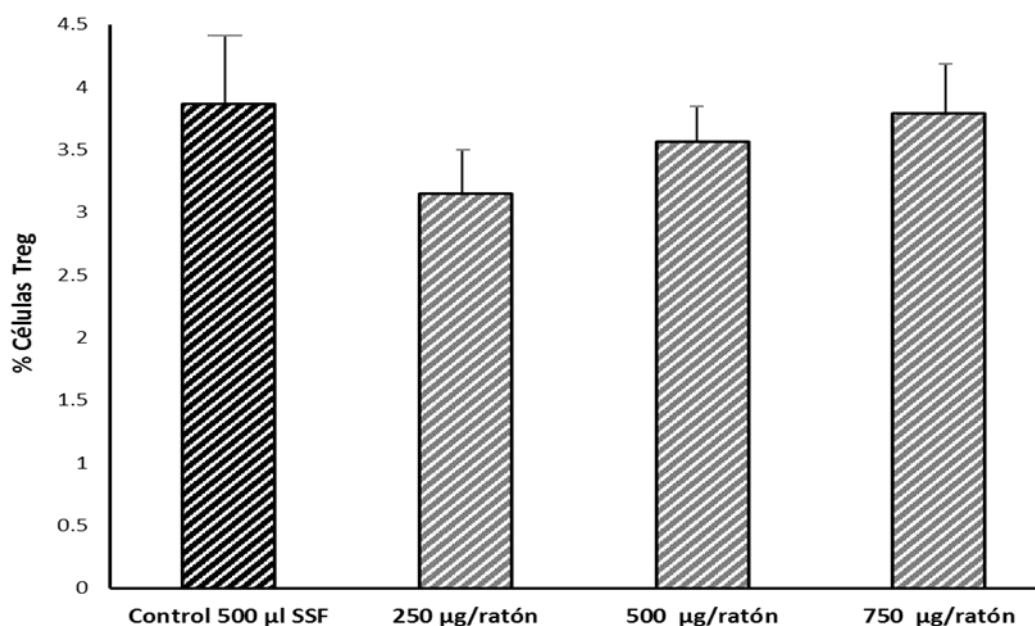
4.1 Evaluación de los productos (E/S) del cisticerco de *Taenia crassiceps* para la inducción de células Treg

Con los productos (E/S) obtenidos, se realizaron las pruebas de Inducción de células Treg y se adquirieron los datos en el citómetro (Anexo 2).

Se utilizaron 4 ratones para cada una de las dosis y para los controles en todos los experimentos.

4.1.1 Productos de excreción-secreción N° 4 (PES4)

Los resultados de inducción de células Treg por el PES4 se presentan en la Gráf.1.



Gráf. 1. Inducción de células Treg *in vivo* por PES 4

El PES 4 fue obtenido de un cultivo con 245 días de infección.

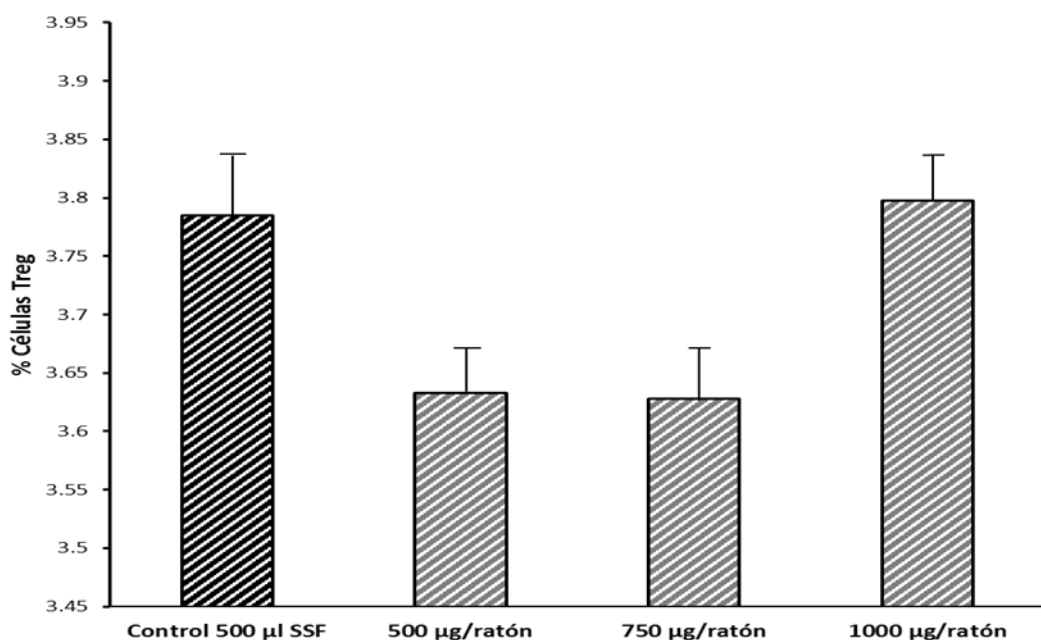
Este producto (E/S) fue realizado por Marlene Melo Salas (2014) y fue probado 4 veces en el laboratorio. El primer experimento realizado, mostró una inducción de Treg en la dosis 500 µg. Sin embargo, luego de

descongelar el producto (E/S) los experimentos restantes realizados no mostraron ningún tipo de diferencia significativa con respecto al control.

La Graf. 1 representa el 4^{to} experimento (fue el único experimento de ese producto (E/S) realizado por la autora de la presente tesis) y comprueba que el PES 4 es un producto (E/S) No Inductor de células Treg *in vivo*.

4.1.2 Productos de excreción-secreción A (PESA)

Los resultados de inducción de células Treg por el PESA se presentan en la Gráf.2.



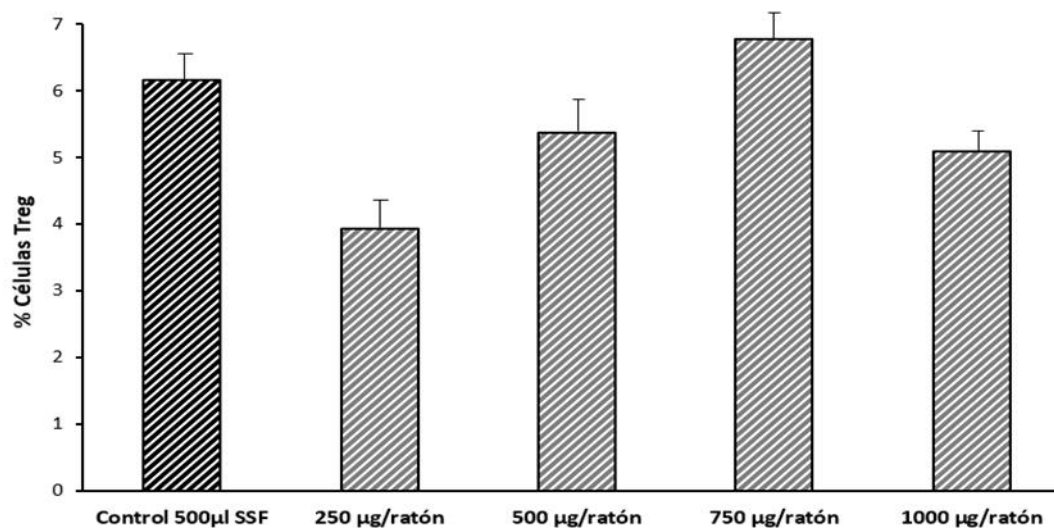
Gráf. 2. Inducción de células Treg *in vivo* por PESA

El PESA fue obtenido de un cultivo de 1 ratón con 200 días de infección. Este producto (E/S) no mostró una clara inducción de Treg *in vivo* en ninguna dosis del experimento. Debido a que la cantidad de proteínas obtenidas fue insuficiente para realizar más experimentos, se procedió a probar los siguientes productos (E/S).

4.1.3 Productos de excreción-secreción N° 5 (PES5)

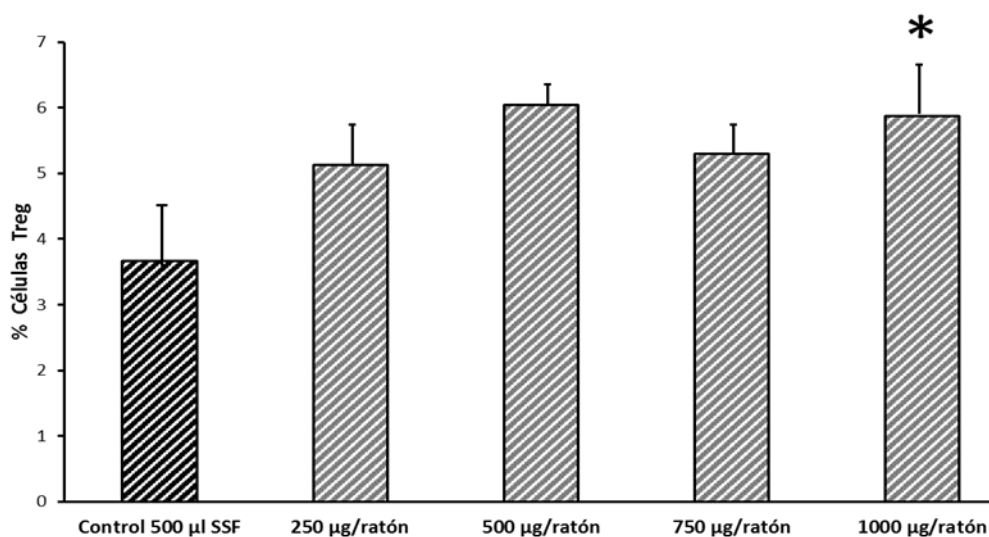
Los resultados de inducción de células Treg por el PES5 fueron obtenidos de tres diferentes experimentos como lo muestran las gráficas. 3,4 y 5.

1^{er} Experimento:



Gráf. 3. Inducción de células Treg *in vivo* por PES5 Exp.1

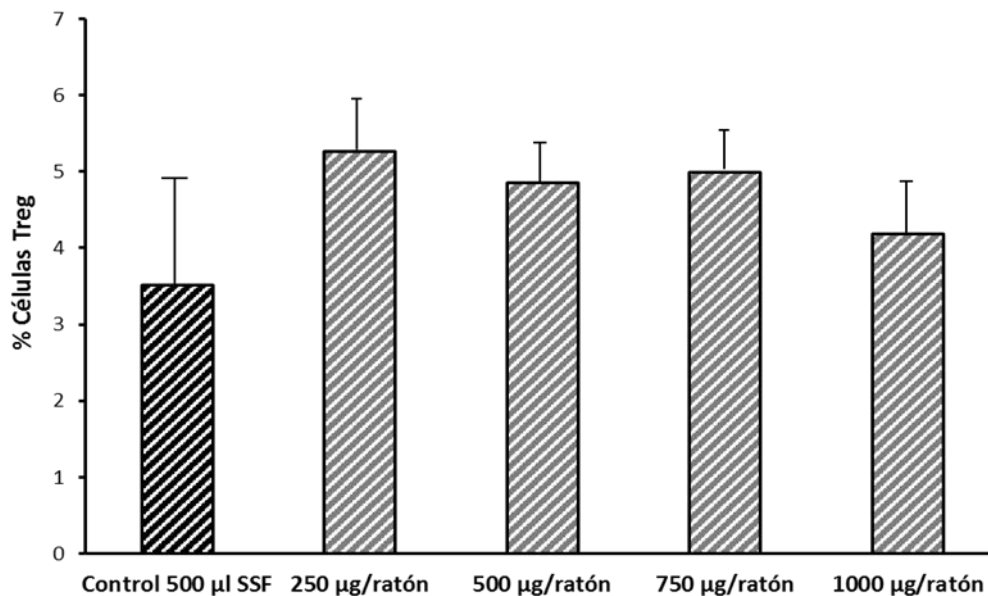
2^{do} Experimento:



Gráf. 4. Inducción de células Treg *in vivo* por PES5 Exp.2

Nota:(*) Diferencia de Significación Estadística

3^{er} Experimento:



Gráf. 5. Inducción de células Treg *in vivo* por PES5 Exp.3

El PES 5 fue obtenido de un cultivo de 1 ratón con 198 días de infección.

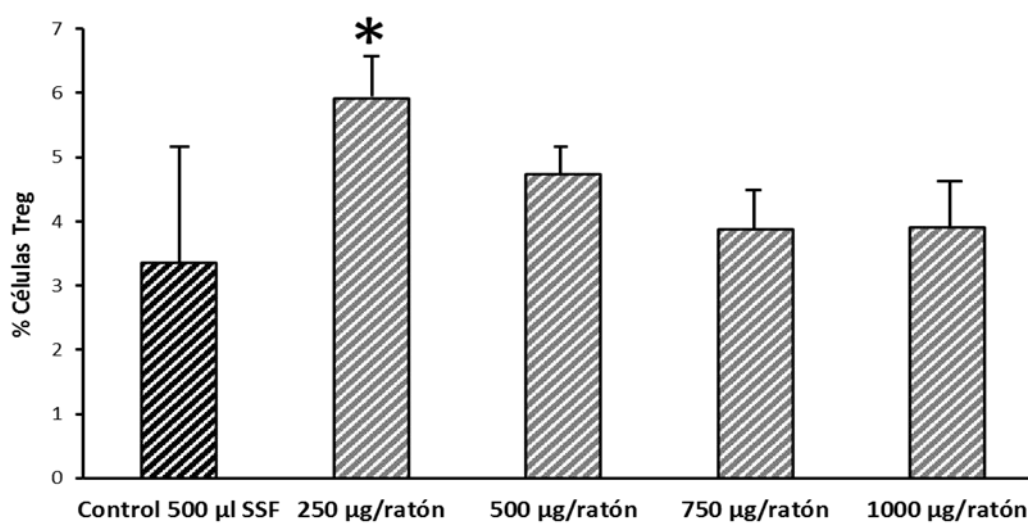
En el primer y tercer experimento realizado con la inoculación del PES5, no se evidenció un aumento significativo de células Treg *in vivo* en ninguna dosis en comparación con los controles. Sin embargo en el segundo experimento, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células Treg en los ratones inoculados con 1000 µg de proteína del PES5 ($p = 0.0392$). Teniendo en cuenta, que solo uno de los tres experimentos presenta un aumento significativo, se determinó que el PES5 no tiene la capacidad de inducir células T reguladoras (Producto (E/S) No inductor).

Dado que los Productos (E/S) utilizados anteriormente contenían poca cantidad de proteína, debido a que solo se utilizó 1 ratón por cultivo, se procedió a hacer un cultivo con un mayor número de ratones y al mismo tiempo se recolectaron cisticercos para obtener extractos totales.

4.1.4 Productos de excreción-secreción N°6 (PES6)

Los resultados de inducción de células Treg por el PES6 fueron obtenidos de cuatro diferentes experimentos como se observan en las gráficas 6, 7, 8 y 9.

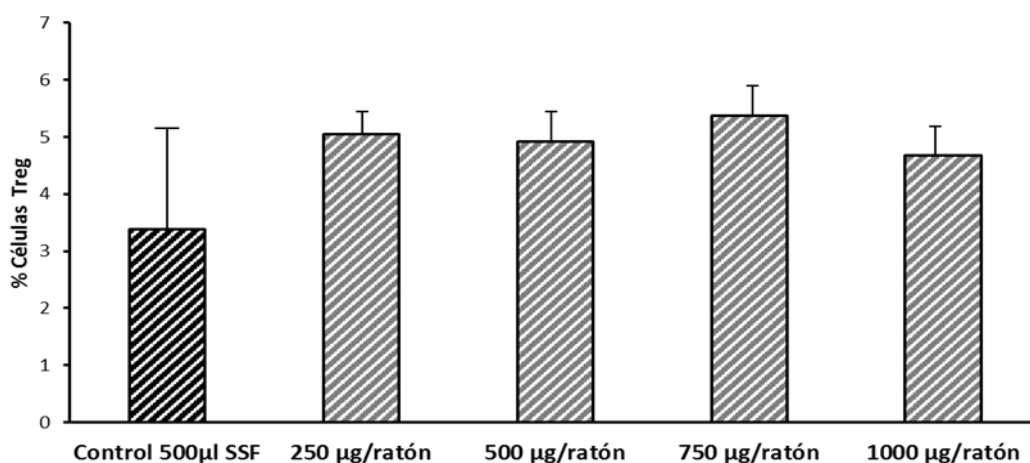
1^{er} Experimento:



Gráf. 6. Inducción de células Treg *in vivo* por PES6 Exp.1

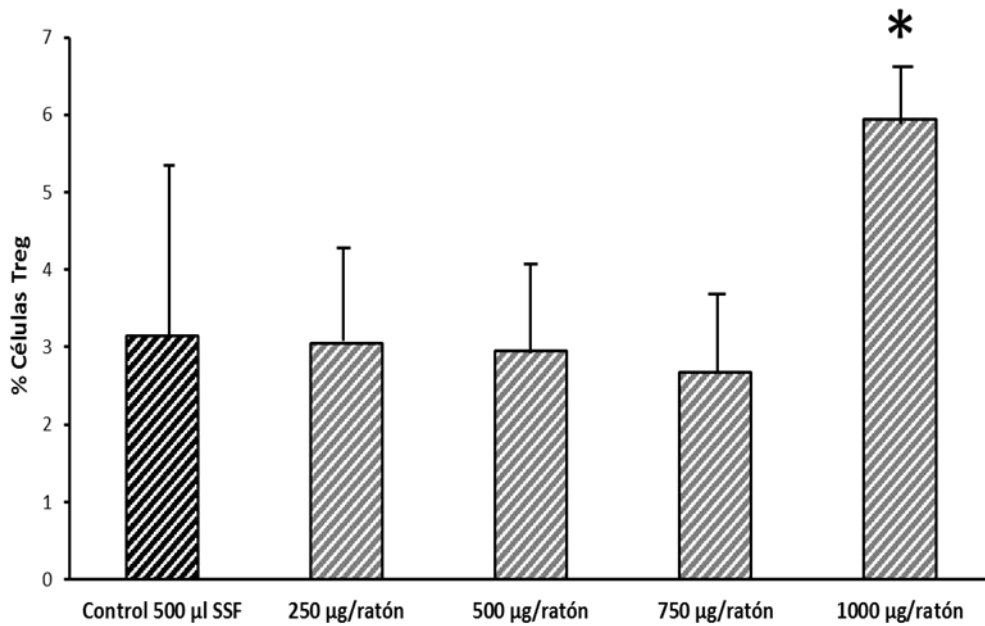
Nota:(*) Diferencia de Significación Estadística

2^{do} Experimento:



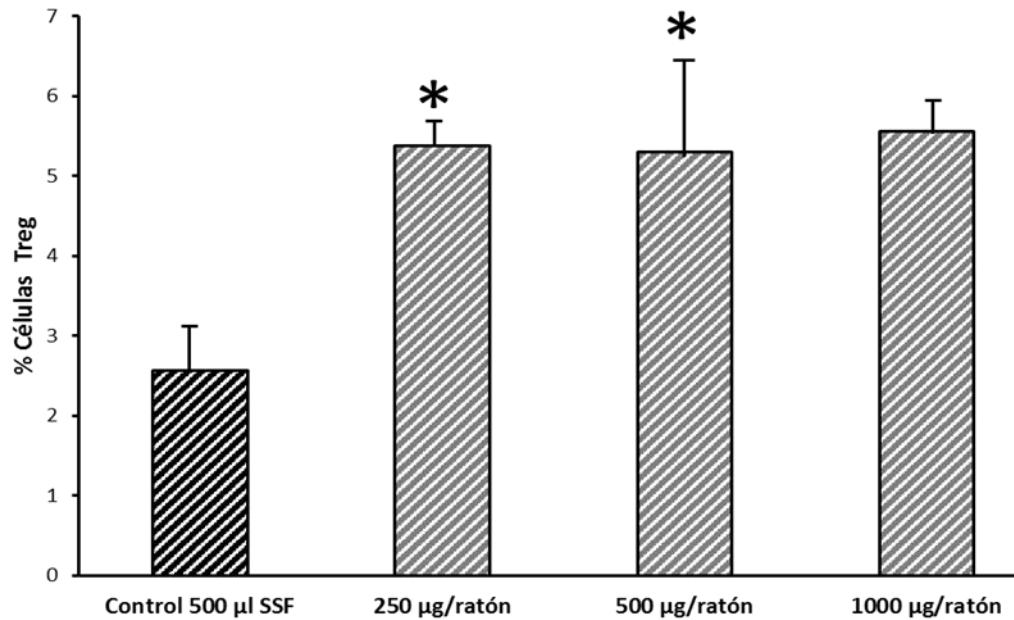
Gráf. 7. Inducción de células Treg *in vivo* por PES6 Exp.2

3^{er} Experimento:



Gráf. 8. Inducción de células Treg *in vivo* por PES6 Exp.3
Nota: (*) Diferencia de Significación Estadística

4^{to} Experimento:



Gráf. 9. Inducción de células Treg *in vivo* por PES6 Exp.4
Nota:(*) Diferencia de Significación Estadística

El PES6 fue obtenido de un cultivo de 5 ratones con 196 días de infección. En el primer experimento se observa un aumento significativo en el porcentaje de células Treg con respecto a los controles en la dosis 250 μg ($p=0.0067$), en el tercer experimento en la dosis 1000 μg ($p=0.0302$) y en el cuarto experimento en las dosis 250 y 500 μg ($p=0.0124$ y $p=0.0170$ respectivamente). El segundo experimento fue el único que no mostró un aumento significativo.

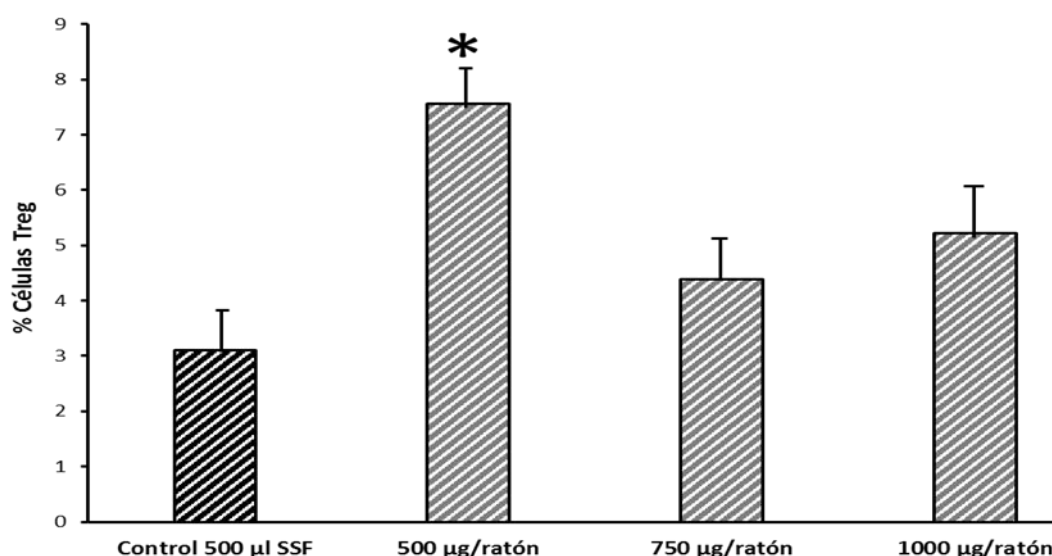
Se realizaron 4 experimentos para poder confirmar que este producto (E/S) es capaz de inducir células Treg *in vivo* (Producto Inductor).

Los extractos totales de cisticercos fueron obtenidos del cultivo del PES6.

4.1.5 Extracto Total del cisticercos

Se obtuvieron cisticercos en diferentes tiempos de recolección, los resultados de inducción de células Treg se muestran en las siguientes gráficas 10, 11 y 12.

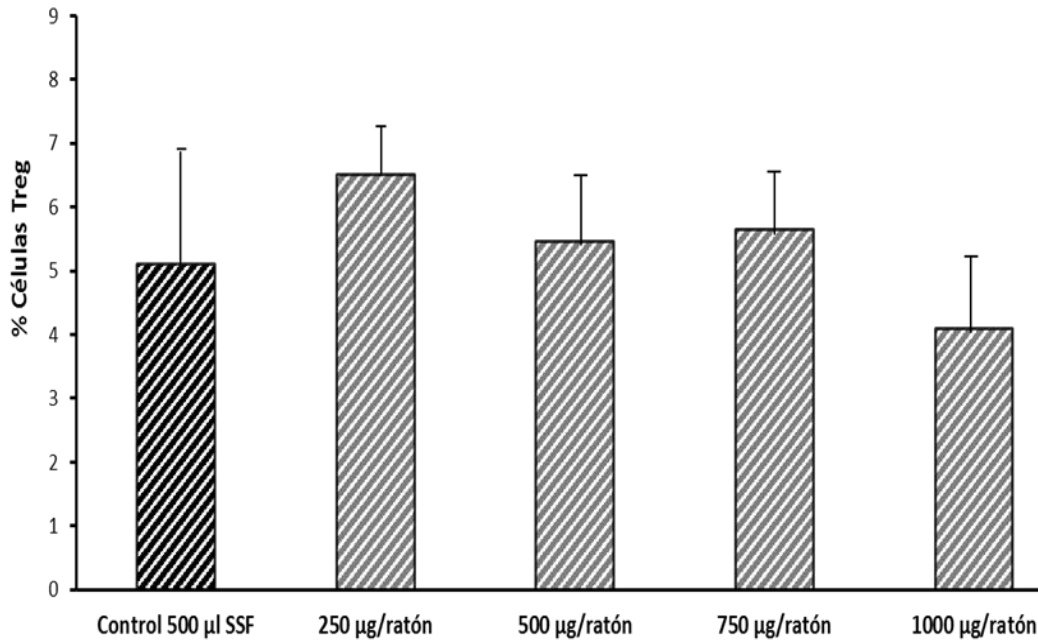
1^{er} Tiempo de Recolección: Cisticercos Obtenidos antes de Iniciar el cultivo con medio RPMI 1640. (CAC)



Gráf. 10. Inducción de células Treg *in vivo* utilizando el extracto CAC

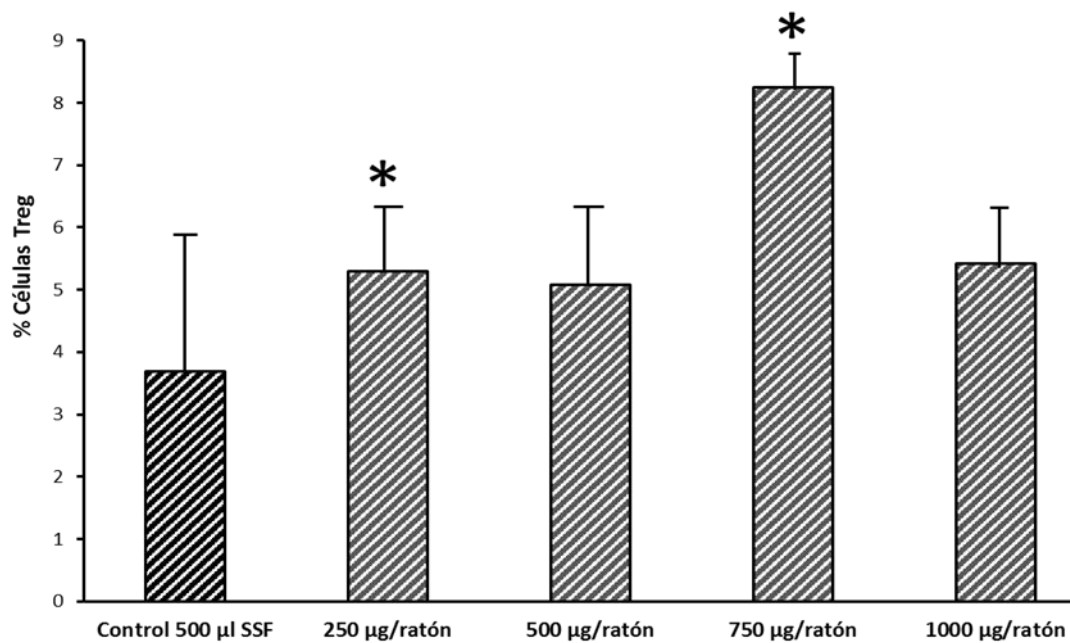
Nota:(*) Diferencia de Significación Estadística

2^{do} Tiempo de Recolección: Cisticercos obtenidos al Inicio del cultivo con medio DMEM (CIC)



Gráf. 11. Inducción de células Treg *in vivo* utilizando el extracto CIC.

3^{er} Tiempo de Recolección: Cisticercos obtenidos al finalizar el cultivo (CFC)



Gráf. 12. Inducción de células Treg *in vivo* utilizando el extracto CFC.

Nota: (*) Diferencia de Significación Estadística

El extracto total de cisticercos mostró un aumento significativo con respecto a los controles en el tiempo de recolección (CAC) en la dosis de 500 µg ($p=0.0407$) y en el tiempo de recolección (CFC) en las dosis 250 y 750 µg ($p=0.0159$ y $p=0.0107$ respectivamente), mientras que en el segundo tiempo de recolección no se observó ninguna diferencia significativa.

Los cisticercos obtenidos al finalizar el cultivo generan un extracto total, que ya no contiene proteínas del hospedero.

A continuación las siguientes tablas nos muestran un panorama general:

Productos (E/S)		Dosis				Condición
		250 µg	500 µg	750 µg	1000 µg	
PES4	Exp.1	-	*	-	/	NO INDUCTOR
	Exp.2	-	-	-	/	
	Exp.3	-	-	-	/	
	Exp.4	-	-	-	/	
PESA		/	-	-	-	NO INDUCTOR
PES5	Exp.1	-	-	-	-	NO INDUCTOR
	Exp. 2	-	-	-	*	
	Exp.3	-	-	-	-	
PES6	Exp.1	*	-	-	-	INDUCTOR
	Exp.2	-	-	-	-	
	Exp.3	-	-	-	*	
	Exp.4	*	*	/	-	

Tabla 4. Resumen de las pruebas de Inducción de células Treg con los productos (E/S)

Extracto Total del Cisticerco	Dosis				Condición
	250 µg	500 µg	750 µg	1000 µg	
1 ^{era} Recolección (CAC)	/	*	-	-	INDUCTOR
2 ^{da} Recolección (CIC)	-	-	-	-	NO INDUCTOR
3 ^{era} Recolección (CFC)	*	-	*	-	INDUCTOR

Tabla 5. Resumen de las pruebas de Inducción de células Treg con los extractos totales de los cisticercos

- / No se realizó experimento
- No mostró aumento significativo
- * Mostró aumento significativo

4.2 Caracterización de las proteínas de los productos (E/S) que inducen células T reguladoras.

Se estandarizó la técnica de proteómica para productos (E/S) obtenidos de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en el modelo murino.

Se trabajó con la muestra con la que se contaba con mayor cantidad de proteínas. (PES6) (Producto Inductor)

- ✓ **Protocolo A:** Desalación con Columna NAP5 en combinación con el Kit 2D- Clean Up (Fig.15.) (Fig.16.).
- ✓ **Protocolo B:** Desalación con Columna NAP5 en combinación con TCA- DOC-Acetona (Fig.17.).
- ✓ **Protocolo C:** Aplicación de la muestra directa, limpieza con el Kit 2D-Clean Up (Fig.18.).

Para el protocolo B y C se utilizaron las muestras previamente desaladas por las columnas NAP5.

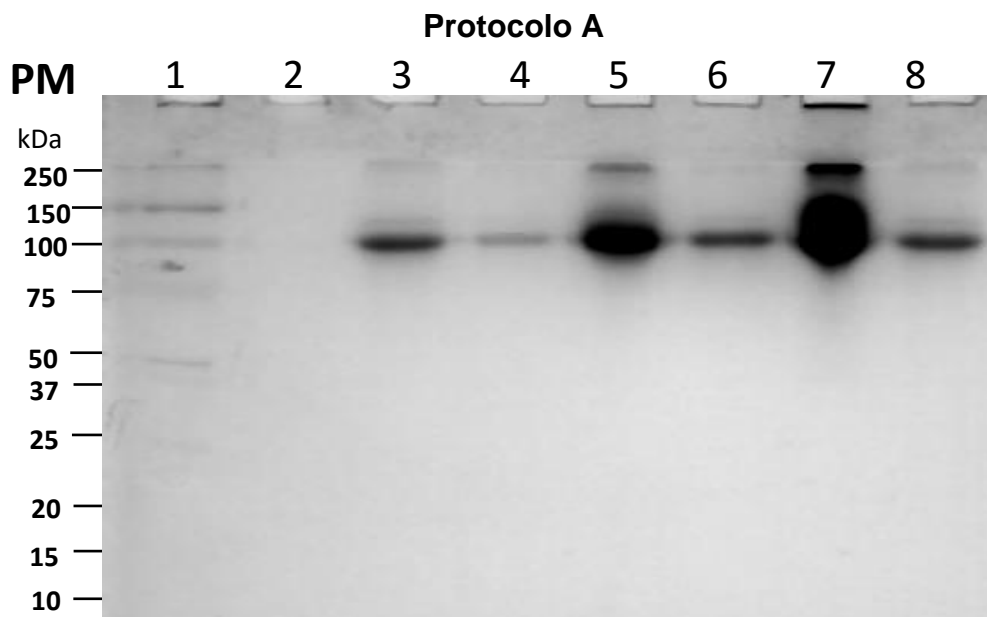


Fig.15. Perfil electroforético del PES6 luego de la desalación con columnas NAP5 en Gel de Policrilamida (SDS-PAGE) 12% Teñido con azul de Coomassie. En el carril 1 se muestra el Marcador de Peso molecular (PM), los carriles 3 y 4 contienen 5 µg y 5µl del PES6, los carriles 5 y 6 contienen 15 µg y 15 µl del PES6 , los carriles 7 y 8 contienen 30 µg y 30 µl del PES6.

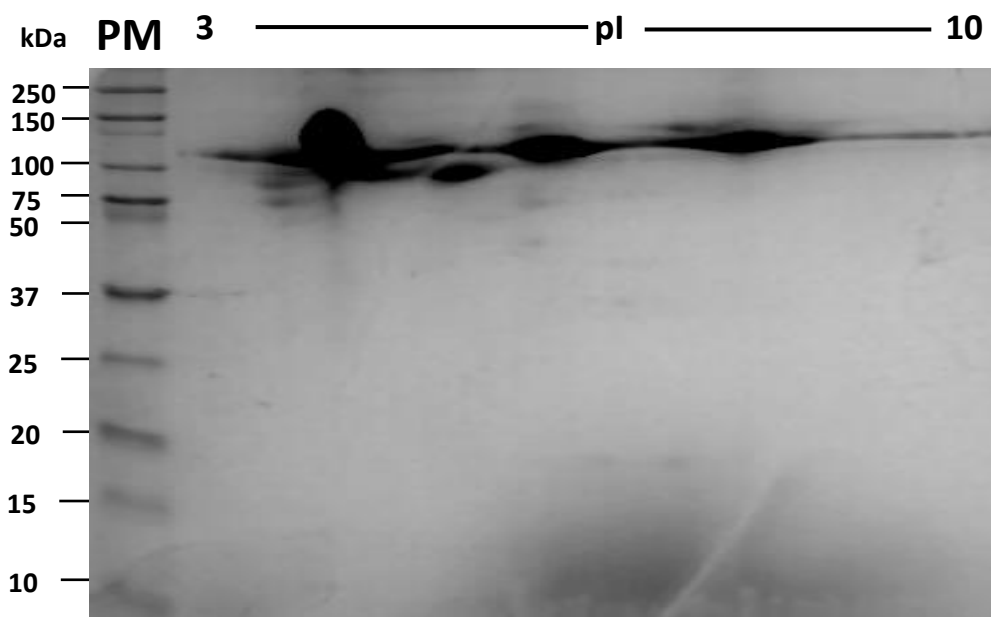


Fig.16. Electroforesis 2D-PAGE del PES6 luego de limpiarlas con el Kit 2D-Clean Up. Gel de pH 3-10 y 15% de acrilamida teñido con azul de Coomassie.

Protocolo B

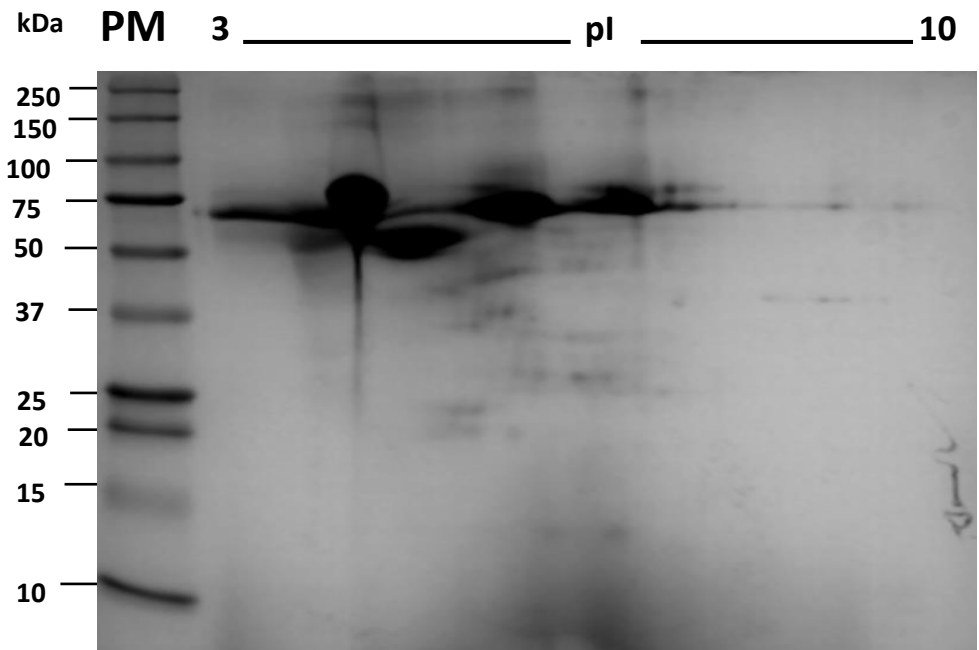


Fig.17. Electroforesis 2D-PAGE del PES6 luego de limpiarlas con TCA-DOC-Acetona. Gel de pH3-10 y 15% de acrilamida teñido con azul de Coomassie.

Protocolo C

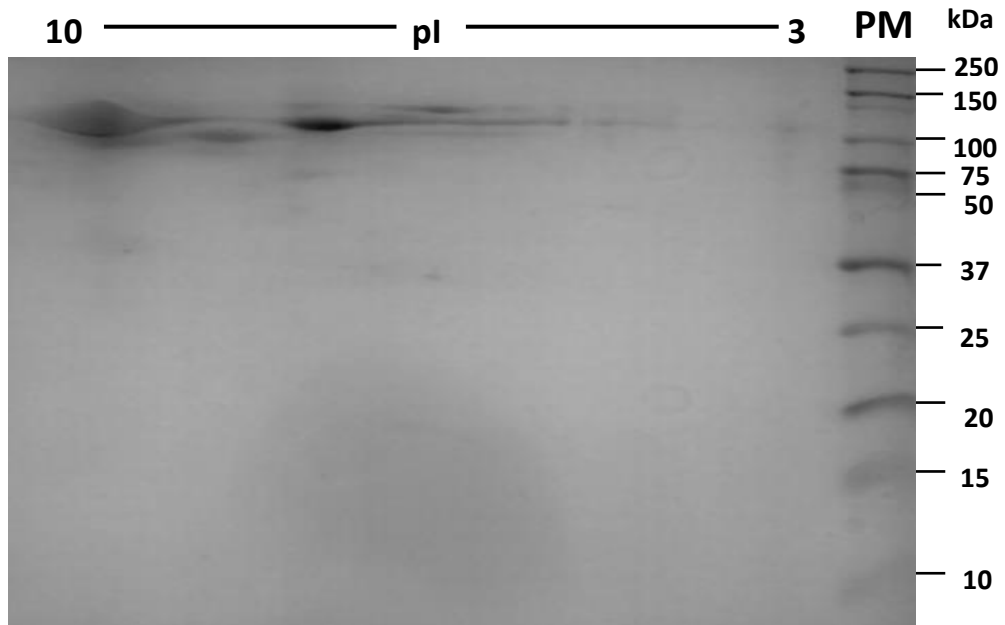


Fig.18. Electroforesis 2D-PAGE del PES6 luego de limpiarlas con el Kit 2D-Clean Up. Gel de pH 3-10 y 15% de acrilamida teñido con azul de Coomassie.

En vista que el protocolo B dio mejores resultados, se procedió a correr geles de los productos (E/S) para determinar la forma diferencial de los spots que pueden estar asociados a la inducción de células Treg (Fig.19)(Fig.20).

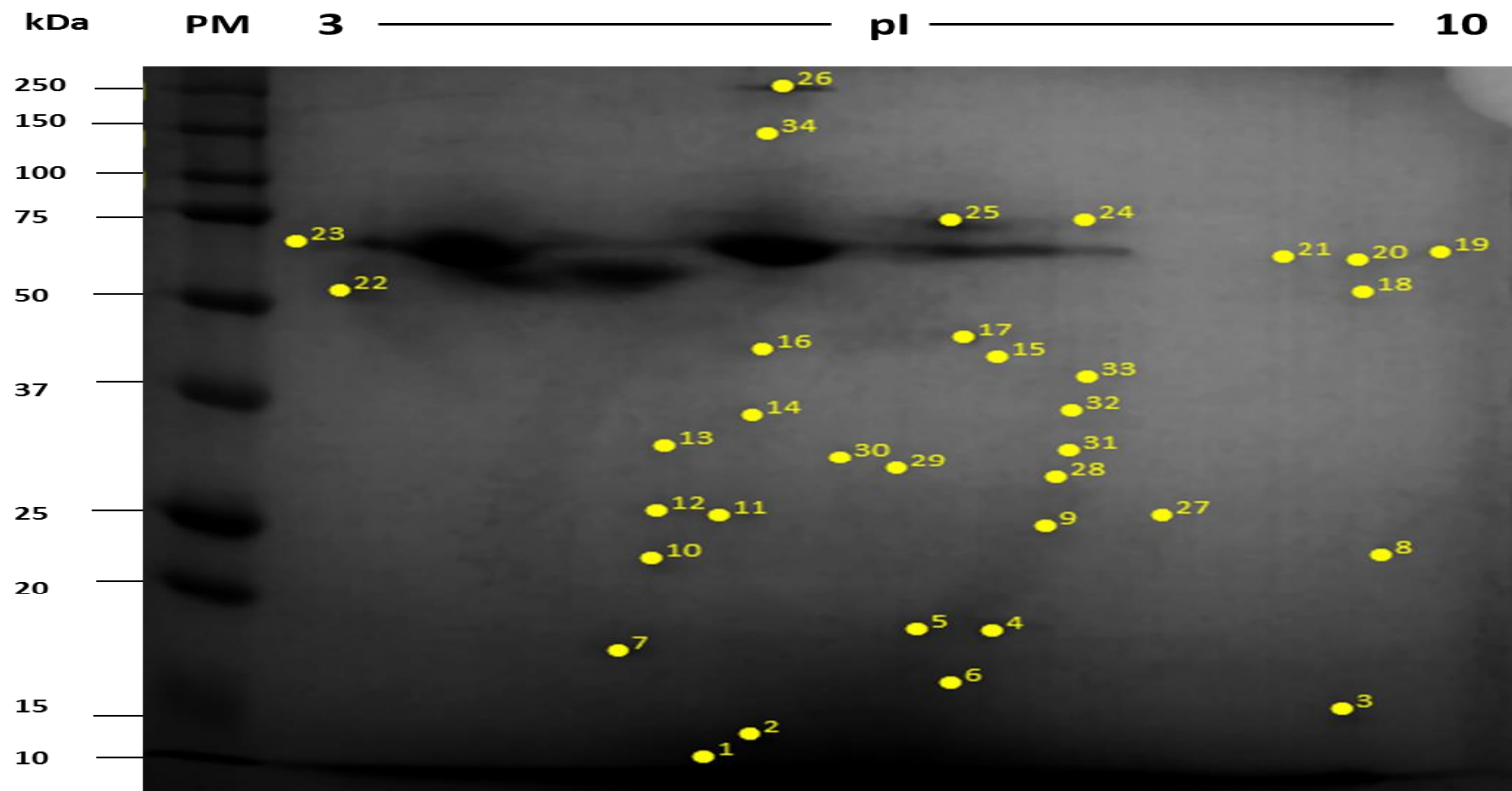


Fig.19. Electroforesis 2D-PAGE del PES4 (NO INDUCTOR). Gel de pH 3-10 y 15% de acrilamida teñidos con azul de Azul Coomassie. Un Total de 34 spots.

PES6 Inductor

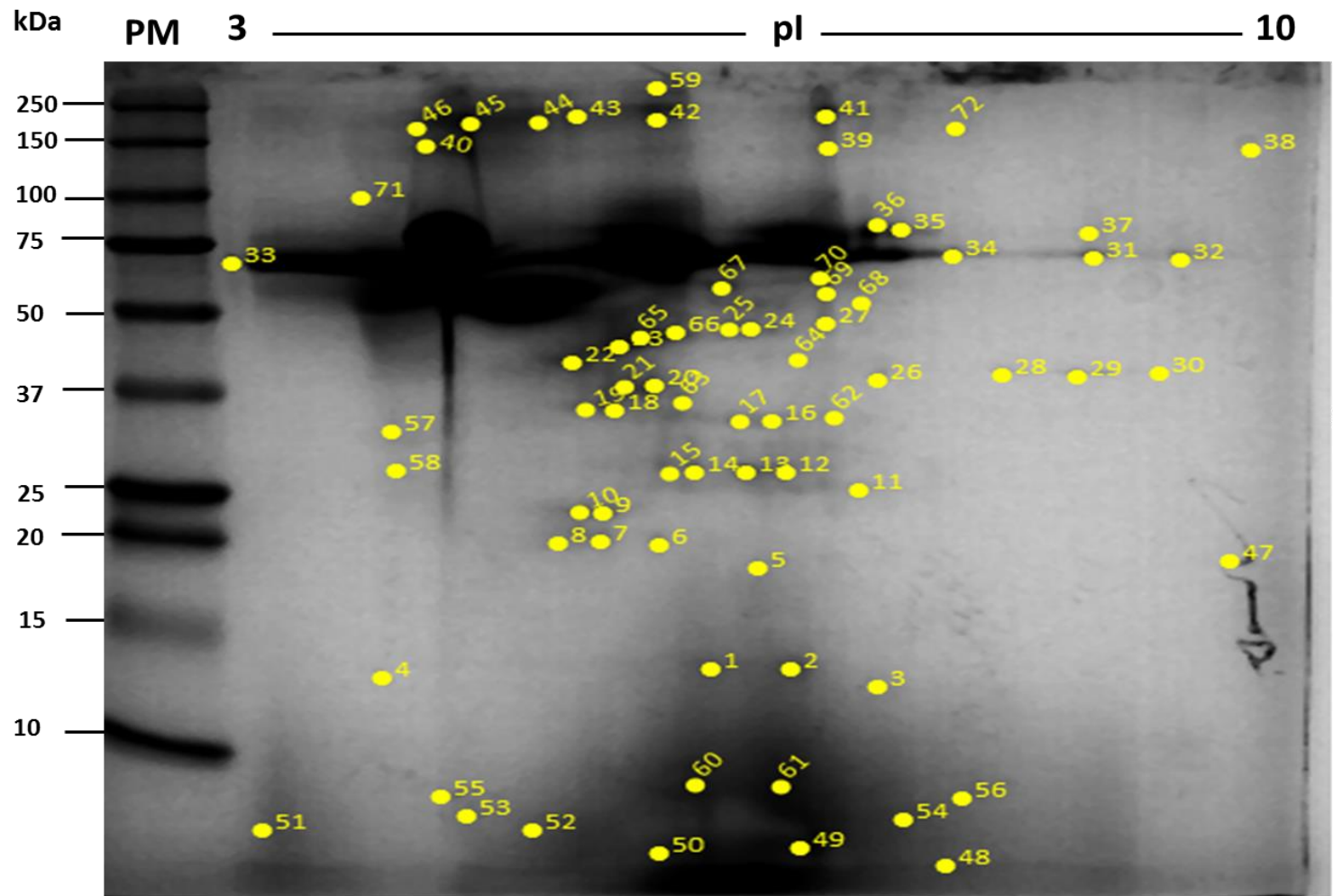


Fig.20. Electroforesis 2D-PAGE del PES6 (INDUCTOR). Gel de pH 3-10 y 15% acrilamida teñido con azul de Coomassie. Un Total de 72 spots.

El PES4, el gel No Inductor mostró un total de 34 spots con pls entre 3.4 y 7.9 y rango de pesos moleculares (10-150kDa) (Anexo 5). El PES6, el gel Inductor mostró un total de 72 spots con pls entre 3.5 y 8 y rango de pesos moleculares (2-218kDa). (Anexo6) Se compararon ambos geles para obtener los spots conservados y diferenciales en los productos (E/S). Se obtuvo que un total de 11 spots conservados que comparten las mismas características entre el punto isoeléctrico y el peso molecular (Fig.21).

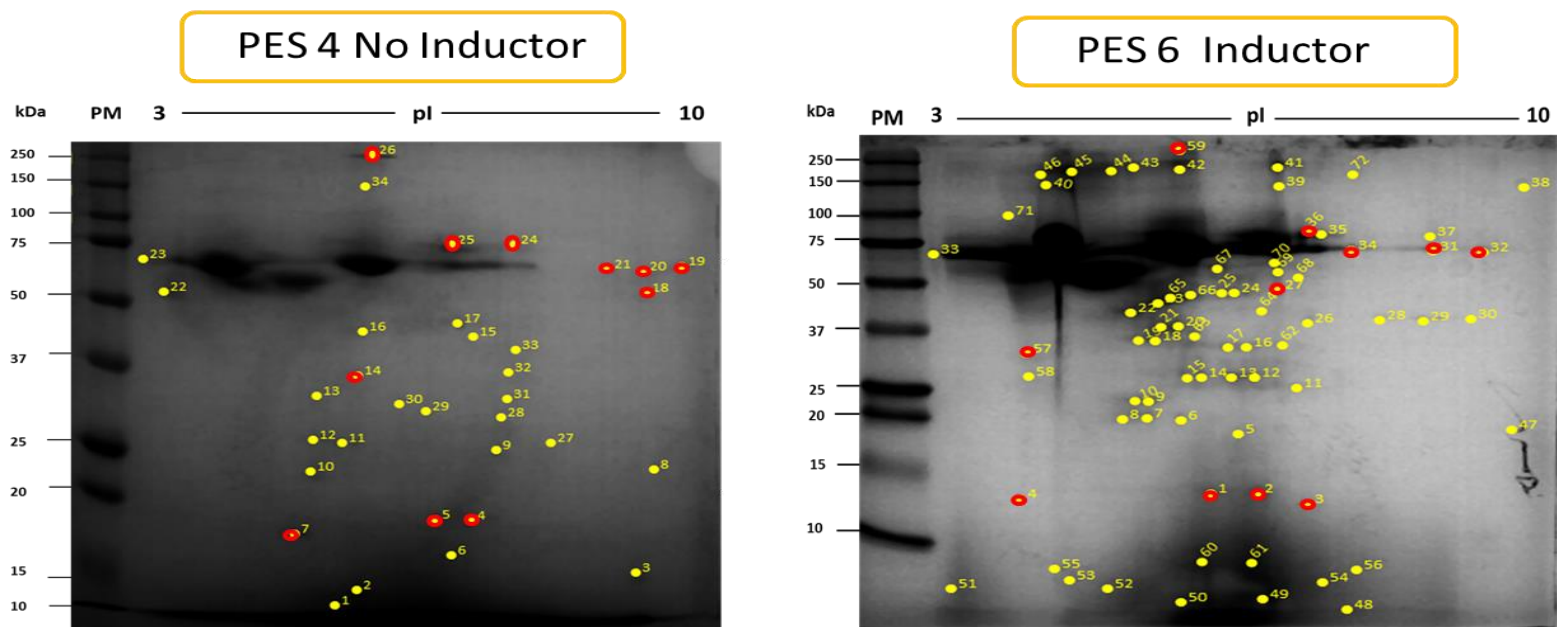
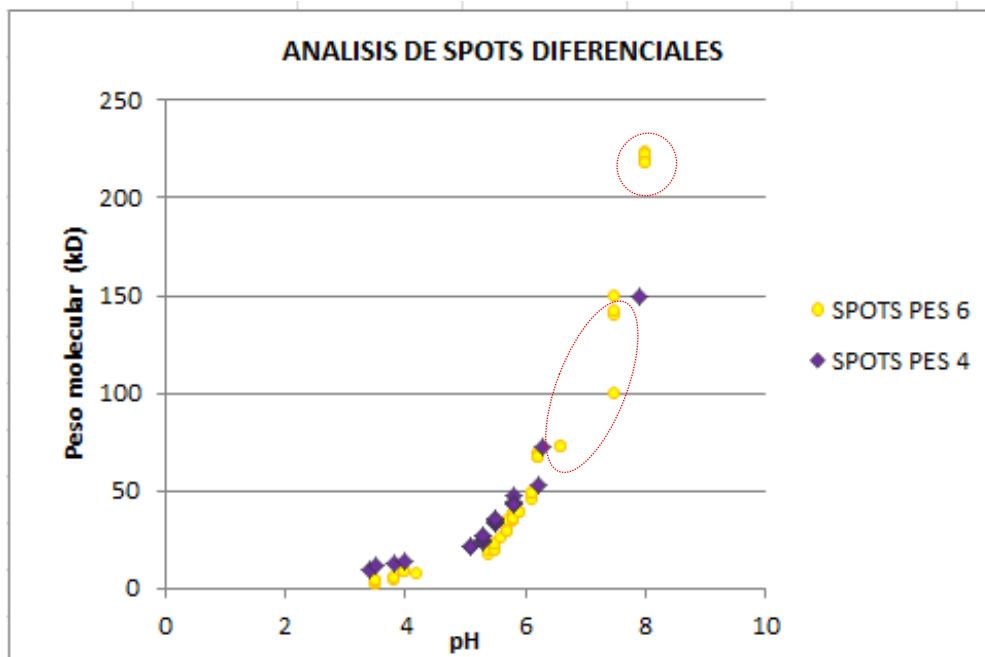


Fig.21. Análisis comparativo de geles para obtener los Spots conservados y diferenciales de los productos (E/S).

Nota: De rojo se muestran los spots conservados

El análisis comparativo de los geles (No inductor/ Inductor) permitió obtener un total de 13 spots diferenciales en el PES6 que probablemente son las proteínas responsables de la inducción de las células T reguladoras en el modelo murino, las cuales se encontraban con un pI con rango entre 6.6 – 8 y PMs entre 73-223 kDa (Gráf.13.).



Gráf. 13. Análisis de los Spots diferenciales de los productos (E/S).

V. DISCUSIÓN

Estudios recientes demuestran que el cisticerco de *Taenia crassiceps* es capaz de modular la respuesta inmune a través de una serie de mecanismos de evasión (31). Aunado a esto se ha reportado que durante la cisticercosis murina el parásito es capaz de inducir células T reguladoras (Tregs), las cuales se incrementan al inicio y en la fase crónica de la enfermedad. Este hallazgo sugiere que las células Treg podrían estar controlando la inflamación para así favorecer un ambiente permisivo para el establecimiento y supervivencia del parásito (78, 80).

El cisticerco del genero *Taenia* podría estar utilizando como un posible mecanismo de escape la inducción de células T reguladoras, por lo cual el presente trabajo se centró en la identificación de los productos de excreción-secreción (E/S) liberados por los cisticercos con capacidad para inducir estas células *in vivo*.

Se realizaron pruebas biológicas de inducción de las células Treg con los productos (E/S) de los cisticercos de *Taenia crassiceps*. Los resultados obtenidos mostraron que los productos (E/S) de los cultivos PES4, PESA y PES5, al ser inoculados vía intraperitoneal en ratones BALB/c (susceptibles), no presentan un aumento significativo de células Treg con respecto a los controles en el sitio de infección. Por otro lado, al probar el PES6, se observó un aumento estadísticamente significativo, que demuestra la capacidad de este producto (E/S) para inducir células Treg *in vivo*.

El producto (E/S) inductor (PES6), proviene de un cultivo de ratones infectados durante 196 días mientras que los productos (E/S) no inductores, PES4, PESA y PES5 provienen de cultivos de 245, 200 y 198 días respectivamente. Teniendo en cuenta que cada producto (E/S) se obtuvo de manera independiente, se puede especular que el tiempo de infección de los ratones utilizados en cada cultivo juega un papel importante

para determinar si el producto (E/S) es o no inductor. Este hallazgo se respalda en estudios anteriores en donde se observan diferentes niveles de células Treg a 5, 30 y 130 días post-infección (117).

Se sabe, que los productos (E/S) liberados por los cisticercos pueden ser proteínas de desecho o moléculas funcionales que están involucradas en procesos biológicos vitales (52, 53). Sin embargo, algunos de los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que no todos los productos (E/S) son capaces de inducir células T reguladoras.

Teniendo en cuenta que estos productos metabólicos pueden contener enzimas proteolíticas que generan diferentes patrones de actividad catalítica, es probable que la expresión de estas enzimas sea similar, pero considerablemente variable (51). Por lo tanto, la capacidad inductora de los productos (E/S) también podría ser atribuida a la variabilidad del cisticerco o bien, que a lo largo del tiempo hay una producción diferente de moléculas, siendo esto reforzado en estudios anteriores, en donde pacientes con neurocisticercosis en la fase crónica de la infección muestran un aumento significativo de células T reguladoras (117, 33). Además, la producción de diferentes moléculas parasitarias depende en gran medida al entorno en que se encuentre el cisticerco. Por ejemplo, el cisticerco en caso de sufrir estrés por temperatura, responde sintetizando diversas proteínas como HSP 80, HSP 70 y HSP 60. Esta última proteína ha sido identificada en los productos de excreción-secreción y es reconocida por los sueros de los pacientes con neurocisticercosis (118).

Teniendo en consideración los estudios anteriores, se puede decir que unos mínimos cambios en las condiciones establecidas para la obtención de los productos (E/S) pueden ser determinantes en su rol biológico. Por otro lado, cabe resaltar que se desconoce mediante que mecanismo los productos (E/S) del cisticerco de *Taenia crassiceps* están induciendo células T reguladoras y sobre todo, que moléculas están involucradas en esta inducción. Recientemente en la infección por *Echinococcus granulosus* se ha determinado que los productos (E/S) de la fase adulta

ejercen un potente efecto inhibitor sobre la maduración y la función de las células dendríticas que a su vez puede conducir a la diferenciación de células T CD4⁺ en células T reguladoras (119).

También se realizaron ensayos de inducción con extractos totales de los cisticercos para comprobar si las moléculas constitutivas del parásito tienen la capacidad de inducir células T reguladoras. Los extractos totales estaban conformados por cisticercos que fueron recolectados en tres diferentes tiempos: antes de iniciar el cultivo con medio RPMI 1640 (CAC); al inicio del cultivo con medio DMEM (CIC) y al finalizar el cultivo (CFC). Los resultados de los ensayos con los cisticercos obtenidos en el tiempo CAC y CFC fueron significativos, demostrando la capacidad de estos macerados para inducir células Tregs, mientras que los cisticercos obtenidos al inicio del cultivo con medio DMEM (CIC) no presentan un resultado significativo por lo tanto no inducen.

El tiempo CAC está conformado por un macerado de cisticercos recién extraídos del roedor, se sabe por literatura que los cisticercos poseen en su superficie tegumentaria moléculas del hospedero como inmunoglobulinas o glicoproteínas (46). Entonces es posible que el parásito se recubra de moléculas que participen en la inducción de Tregs.

Por otro lado, estudios recientes realizados en otra parasitosis como es Esquistosomiasis demuestran que los helmintos parásitos (*Schistosoma mansoni* y *Schistosoma bovis*) expresan moléculas en su superficie y en capas más internas de su tegumento. Estas moléculas parasitarias son capaces de neutralizar los mecanismos efectores del sistema inmune del hospedero (98,120). Teniendo en cuenta esto, se puede decir, que probablemente el resultado significativo obtenido con el macerado somático del tiempo CFC pueda atribuirse a que durante la infección por *Taenia crassiceps* las moléculas del tegumento podrían estar induciendo células T reguladoras.

Los productos de secreción y excreción fueron analizados a través de geles de 2D. Inicialmente se estandarizó la técnica probando tres protocolos de desalación de muestra: (A) Limpieza con columna NAP5 y el Kit 2D-Clean Up; (B) Limpieza con columna NAP5 y precipitación TCA-DOC-Acetona y (C) Limpieza con Kit 2D-Clean Up. La técnica más efectiva fue la Limpieza con columna NAP5 y precipitación TCA-DOC-Acetona debido a que mostraba de manera más evidente los posibles spots. Ya con esta técnica estandarizada se corrieron geles de dos dimensiones de los productos (E/S) inductores y no inductores encontrándose 72 spots totales para el PES inductor y 34 para el PES No inductor. Los análisis entre ambos PES demuestran claramente 13 puntos diferenciales entre ellos, con pIs en un rango de 6.6 – 8 y PMs entre 73-223 kDa. Estos puntos son las proteínas posiblemente candidatas a ser moléculas que inducen células Tregs.

Los resultados obtenidos en las pruebas biológicas de inducción de células T reguladoras mediante la inoculación intraperitoneal de los productos (E/S) a los ratones BALB/c, ponen a relucir la capacidad del cisticerco para evadir la respuesta inmune mediante la utilización de mecanismos inmunoreguladores. Esto se ve reforzado con estudios realizados a *Echinococcus granulosus* en donde los productos (E/S) tienen la capacidad de inducir un fenotipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ en las células T; siendo considerada esta acción como una vía de escape ante la respuesta inmunitaria (119). Teniendo en cuenta que las células T reguladoras modulan al sistema inmune, es posible que el parásito utilice la inducción exacerbada de Treg para así, expresar altos niveles de CD25 generando una competencia con las células T efectoras por la interleucina 2, destinándolas a una muerte por apoptosis (121). Por lo cual es probable que la inducción de células T reguladoras forme parte de uno de los mecanismos de escape más efectivos que tiene el parásito para su supervivencia.

Los datos obtenidos en este trabajo son importantes porque sugieren que tanto los productos (E/S) como los extractos totales del cisticerco tienen la capacidad para inducir células Treg como mecanismo inmunoregulador.

VI. CONCLUSIONES

- Los hallazgos de este trabajo sugieren que los cisticercos de *Taenia crassiceps* poseen capacidades inmunomoduladoras que les permite sobrevivir en su hospedero.
- Los extractos totales (macerados somáticos) obtenidos al inicio y al finalizar el cultivo, como los sobrenadantes que contienen los productos de excreción-secreción (E/S) liberados por los cisticercos, tienen la capacidad de inducir células T reguladoras *in vivo*.
- La inducción de los linfocitos T hacia un fenotipo regulador (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) demostrada en el presente trabajo, puede entenderse como una posible vía de escape del parásito y nos aproxima para entender un poco más acerca de la relación hospedero-parásito.
- La utilización de las columnas NAP5 en combinación con TCA-DOC-Acetona es la técnica de proteómica más efectiva para la desalación de la muestra en el modelo de cisticercosis murina.
- Los 13 spots diferenciales encontrados en el PES6 (rango de pH 6.6-8 y p.m. 73-223 kD) podrían ser responsables de la inducción de células Tregs, tomando un papel clave en los mecanismos patógenicos del parásito.

VII. RECOMENDACIONES

Para poder obtener las secuencias específicas de las proteínas que inducen células Treg, se recomienda realizarle digestión trípica a cada gel obtenido, seguido de un paso de fraccionamiento como cromatografía líquida y su posterior análisis por espectrometría de masas en *tandem* (MS/MS), una vez identificados los péptidos y proteínas se puede hacer una búsqueda exhaustiva en bases de datos de proteínas reportadas en otros parásitos del mismo orden para poder realizar una validación de proteínas y análisis comparativo de los experimentos.

Además se recomienda caracterizar los extractos totales de los cisticercos de *Taenia crassiceps* de igual manera como se realizó con los productos (E/S) en vista que se obtuvieron resultados positivos con respecto a la prueba de inducción de células Treg.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Sarti E, Schantz PM, Lara R, Gomez H, Flisser A. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. Trop Med Parasitol. 1988; 39(3):194-198.
- 2) White A. Neurocysticercosis: A Major Cause of Neurological Disease Worldwide. Clin Infect Dis. 1997; 24(2):101–113.
- 3) Flisser A. Epidemiología. En: “Cisticercosis: Guía para profesionales de la Salud”. (Larralde C, y Aluja AS de, Coords). Editorial Fondo de Cultura Económica, Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Fundación Mexicana para la Salud, México. 2006. 87-97.
- 4) Dirección Regional de Salud Tacna. Boletín Epidemiológico Semanal. Órgano oficial de difusión de la Red Regional de Epidemiología-DIRESA, Tacna-Perú; 2014. Vol. 2.
- 5) Flisser A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. Prog Clin Parasitol. 1994; 4: 77-116.
- 6) García H, Gonzalez E, Evans C, Gonzales A, Gilman R. Grupo de trabajo en Cisticercosis en Perú. *Taenia solium* cysticercosis. Lancet. 2003; 362(9383):547-556.
- 7) Imirizaldu L, Miranda L. Neurocysticercosis. An emergent disease. An Sist Sanit Navar. 2004; 27(2):201–209.
- 8) Pawlowski ZS. Control of neurocysticercosis by routine medical and veterinary services. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; 102 (3):228–232.
- 9) Flórez A, Pastrán S, Peña A, Benavides A, Villareal A, Rincón C, *et al.* Cisticercosis en Boyaca, Colombia: estudio de seroprevalencia. Acta Neurol Colomb. 2011; 27(1):9–18.
- 10) Diehl R. Bruns' syndrome and racemose neurocysticercosis: a case report. Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45(2):269–271.
- 11) García H, Gonzales E, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos F, Tsang V. Grupo de Trabajo en Cisticercosis en Perú. Epidemiología y

- Control de la Cisticercosis en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010; 27(4): 592-597.
- 12) Freeman R. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1810) Rudolphi, 1810(cestoda). Can J Zool.1962; 40: 969–990.
 - 13) Smith K, Parrish M, Esch G, Kuhn R. 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): 383-389.
 - 14) Sciutto E, Frago G, Diaz M.L, Valdez F, Montoya R.M, Govezensky T *et al.* Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H2 and sex influence on susceptibility. Parasitol Res.1991; 77 (3):243-246.
 - 15) Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigen from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. Arch Pathol Lab Med.1990; 144 (9):926-928.
 - 16) Toledo A, Frago G, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López F, *et al.* Two Epitopes Shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Confer Protection against Murine *T. crassiceps* Cysticercosis along with a Prominent T1 Response. Infect Immun.2001; 69 (3): 1766–1773.
 - 17) Morales J, Escobedo G, Rodriguez M, Téllez N, Cerbón M, Larralde C. Differential expression of AP-1 transcription factor genes c-fos and c-jun in the helminth parasites *crassiceps* and *Taenia solium*. Parasitology. 2004; 129 (2): 233-243.
 - 18) López L, Montrozier H, Lemassu A, García E, Segura E, Daffe M. Structure and antigenicity of the major glycolipid from *Taenia solium* cysticerci. Mol Biochem Parasitol.2002; 119(1): 33-42.
 - 19) Esquivel M, Larralde C, Morales J, Ostoa P. Protein and antigen diversity in the vesicular fluid of *Taenia solium* cysticerci dissected from naturally infected pigs. Int J Biol Sci.2011; 7(9):1287-1297.

- 20) Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano M. Sex Hormone Changes Induced by the Parasite Lead to Feminization of the Male Host in Murine *Taenia crassiceps* Cysticercosis. J. Steroid Biochem. Molec Biol Vol. 1995; 52(6): 575-580.
- 21) Huerta L, Terrazas L, Sciutto E, Larralde C. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. J Parasitol. 1992; 78 (3): 471-476.
- 22) Terrazas L, Bojalil R, Govenzensky T, Larralde C. A role for 17 β -estradiol in immunoendocrine regulation of cisticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol. 1994; 80 (4):563-568.
- 23) Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. Parasitology. 2010; 137(3): 335–346
- 24) Rugiero E, Noemí I. Teniasis. En Atías Antonio. Parasitología Médica. 2^a ed. Santiago: Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. 1992: p.194-196.
- 25) Clare M. Vias do metabolismo energético e respiratório em cisticercos de *Taenia crassiceps in vivo* e seu estudo *in vitro* sob a ação de fármacos anti-helmínticos (Tesis Doctoral). Ministerio de Educación. Universidad Federal de Goiás. Instituto de patología tropical y Salud pública. Goiânia, Goiás, Brasil. 2007.
- 26) Maillard H, Marionneau J, Prophette B, Boyer E, Celerier P. *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. AIDS. 1998; 12 (12):1551–1552.
- 27) Ostoa P, Esquivel M, Ostoa J. P, Bazúa S, Larralde C. Budding of *Taenia crassiceps* cyticerci *in vitro* is promoted by crowding in addition to hormonal, stress, and energy-related signals. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010: 1-5.
- 28) Chavarria A, Fleury A, Garcia E, Marquez C, Fragoso G, Sciutto E, Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles, Clin. Immunol. 2005; 116 (3): 271-278.

- 29) Rojas M. Cisticercosis, Una Imponderada Zoonosis en el Perú. Boletín Informativo del Colegio Médico-Veterinario del Perú. 1983; 18: 19-23.
- 30) Dzik J. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. Acta Biochim Pol. 2006; 53 (1): 33-64.
- 31) Peón A, Espinoza J, Arlett L, Terrazas L. Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. Biomed Res Int. 2013; (1):1-13.
- 32) Erb KJ. Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand?. Eur J Immunol. 2007;37: 1170-1173.
- 33) Adalid L, Arce A, Fragoso G, Cárdenas G, Rosetti M, Casanova D, et al. Cysticerci Drive Dendritic Cells to Promote *in vitro* and *in vivo* Treg Differentiation. Clin Dev Immunol. 2013; 117 (3): 1-9.
- 34) Rodríguez M, David J, Bojalil R, Satoskar A, Terrazas L. Cutting Edge: Susceptibility to the Larval Stage of the Helminth Parasite *Taenia crassiceps* Is Mediated by Th2 Response Induced Via STAT6 Signaling. J Immunol. 2002; 168 (7): 3135-3139.
- 35) Rodríguez M, Saavedra R, Tenorio E, Rosas L, Satoskar A, Terrazas L. A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. Infect Immun. 2004; 72(8):4552–4560.
- 36) Reyes J, Terrazas C, Vera L, Terrazas L. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. Infect Genet Evol. 2009; 9(6): 1115-1127.
- 37) Terrazas C. Modulación de la actividad de células dendríticas expuestas a antígenos de *Taenia crassiceps*. (Tesis de Licenciatura). Fac. de estudios superiores de Iztacala. Universidad Nacional de México. Los reyes Iztacala, México. 2008.
- 38) Lightowers M, Rickard M. Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. Parasitology. 1988; 96 Supl 1: 123-166.

- 39) Rosales D, Ortiz L. Infecciones parasitarias: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA. 2008; 2 (2): 89-98.
- 40) Schmid P. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for “macroscopic phenomena” such as virulence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009; 364 (1513): 85–98.
- 41) Moreau E, Chauvin A. Immunity against Helminths: Interactions with the Host and the Intercurrent Infections. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010:1-9.
- 42) Maizels R, Balic A, Gomez N, Nair M, Taylor M, Allen J. Helminth parasites – masters of regulation. Immunol Rev. 2004; 201 (1): 89-116.
- 43) Zaccone P, Fehervari Z, Phillips J, Dunne D, Cooke A. Parasitic worms and inflammatory diseases. Parasite Immunol. 2006; 28 (10): 515-523.
- 44) Bautista R. Parasitic helminths of veterinary concern: host immune response regulation and potential use for the treatment of inflammatory diseases. Journal Veterinaria México. 2009; 40 (3): 283-291.
- 45) Harnett W, Harnett M. Helminth-derived immunomodulators: Can understanding the worm produce the pill?. Nat Rev Immunol. 2010; 10 (4): 278-284.
- 46) Ccama Sullca A. Persistencia de anticuerpos maternos contra cisticercosis porcina y su efecto sobre el EITB (Tesis de Maestría). Fac. de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 2001.
- 47) Sciutto E, Fragoso G, Baca M, De La Cruz V, Lemus L, Lamoyi E. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. Infect Immun. 1995; 63 (6):2277-2281.
- 48) Terrazas L, Bojalilt R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective th1-type immune response to a late permissive th2-type

- response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol.* 1998; 84 (1): 74-81.
- 49) Spolski R, Corson J, Thomas P, Kuhn R. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol.* 2000; 22 (6): 297-305.
- 50) Spolski R, Alexander M, Kuhn R. Suppressed cytotoxic T lymphocyte responses in experimental cisticercosis. *Veterinary Parasitology.* 2002; 106 (4): 325-330.
- 51) León N, Padilla C, Pajuelo M, Sheen P, Zimic M. Cisteínoproteasas catepsinas L de *Taenia solium*: Rol biológico en la infección y potencial uso para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2013; 30(3): 446-54.
- 52) Harnett W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Mol Biochem Parasitol.* 2014; 195(2): 130-136.
- 53) McNeilly T, Nisbet A. Immune modulation by helminth parasites of ruminants: implications for vaccine development and host immune competence. *Parasite.* 2014; 21(51):1-11.
- 54) Chehayeb J, Robertson A, Martin R, Geary T. Proteomic Analysis of Adult *Ascaris suum* Fluid Compartments and Secretory Products. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8 (6): 1-13.
- 55) Maizels R, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites, cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology.* 2003; 3(9): 733–744.
- 56) Geary J, Satti M, Moreno Y, Madrill N, Whitten D, Headley S, *et al.* First analysis of the secretome of the canine heartworm, *Dirofilaria immitis*. *Parasit Vectors.* 2012; 5(1):1-10.
- 57) Plancarte A, Flisser A, Larralde C. Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*. *Cytobios.* 1983; 36 (142): 83-93.
- 58) Laclette J, Rodriguez M, Landa A, Arcos L, Alba P, Mancilla R, Willms K. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of antigen B. *Acta Leiden.* 1989; 57(2):115–122.

- 59)Tato P, Arechavaleta F, Molinari L.A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibit cytokine production. Parasitol Res. 1997; 84 (2): 117-122.
- 60)Tato P, Arechavaleta F, Molinari L. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. Parasitol Res. 1997; 84 (2): 117-122.
- 61)Gao Y, Yan H, Ding F, Lu Y,Sun S. Annexin B1 at the host–parasite interface of the *Taenia solium* cysticercus: Secreted and associated with inflammatory reaction. Acta Trop. 2007; 101 (3):192–199.
- 62) Rosales D, Ortiz L. Infecciones parasitarias: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA. 2008; 2 (2): 89-98.
- 63)Molinari J, Mejia H, White A, Garrido E, Borgonio V, Baig S, Tato Patricia. *Taenia solium*: A Cysteine Protease Secreted by Metacestodes Depletes Human CD4 Lymphocytes *in vitro*. Exp Parasitol .2000; 94 (3):133-192.
- 64)Harmsen M, Cornelissen J, Buijs H, Boersma W, Jeurissen S, van Milligen F. Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. Int J Parasitol. 2004; 34(6):675-682.
- 65)Tantrawatpan C, Maleewong W, Wongkham C, Wongkham S, Intapan PM, Nakashima K. Serodiagnosis of human fascioliasis by a cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant *Fasciola gigantica* cathepsin L antigen. Am J Trop Med Hyg. 2005; 72(1):82-86.
- 66)McKerrow J, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. Proteases in parasitic diseases. Annu Rev Pathol. 2006; 1: 497-536.
- 67)Zimic MJ, Infantes J, López C, Velásquez J, Farfán M, Pajuelo M, *et al.* Comparison of the peptidase activity in the oncosphere excretory/secretory products of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. J Parasitol. 2007;93(4):727- 34

- 68) Baig S, Damian R, Morales J, Olecki P, Talhouk J, Hashmey R, White Jr A. Characterization of excretory/secretory endopeptidase and metallo-aminopeptidases from *Taenia crassiceps* metacestodes. *J Parasitol.* 2005; 91 (5): 983–987.
- 69) Lee J, Dissanayake S, Panico M, Morris H, Dell A, Haslam S. Mass spectrometric characterisation of *Taenia crassiceps* metacestode N-glycans. *Mol Biochem Parasitol.* 2005; 143(2):245–249.
- 70) Gómez L, Rivera I, Rodríguez M, Terrazas L. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitol Res.* 2006; 99 (4): 440-448.
- 71) Terrazas L, Terrazas C, Gómez L. Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *Int J Parasitol.* 2010; 40 (9):1051-1062.
- 72) Terrazas L, Alcántara M, Bonifaz L, Terrazas C, Satoskar A. Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *FASEB J.* 2013; 27 (11) 4547-4560.
- 73) Becerra-Díaz M, Terrazas L. *Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ . *Int J Parasitol.* 2014; 44 (9): 613–623.
- 74) Hesse M, Piccirillo C, Belkaid Y, Prufer J, Mentink M, Leusink M et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10- producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol.* 2004; 172 (5):3157–3166.
- 75) McKee A, Pearce E. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol.* 2004; 173 (2): 1224-1231.

- 76) Singh K, Gerard H, Hudson A, Reddy T, Boros D. Retroviral FoxP3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology*. 2005; 114(3): 410-417.
- 77) Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*. 2005; 174 (11): 7147–7153.
- 78) Adalid L, Fragoso G, Fleury A, Sciutto E. Mechanisms Underlying the Induction of Regulatory T cells and Its Relevance in the Adaptive Immune Response in Parasitic Infections. *Int J Biol Sci*. 2011; 7(9):1412-1426.
- 79) Ruiz N, López A, Nájera M, Camacho C, Arce A, Adalid L *et al*. Participación de las células T reguladoras en la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*. *Arch Neurociencia (Mex)*. 2013; 18 Supl 1:33-37.
- 80) Melo Salas, M. Papel de la inducción y depleción de células T reguladoras durante la infección por el cisticerco de *Taenia crassiceps* en un modelo murino (Tesis de Licenciatura). Fac. de estudios superiores de Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 2014
- 81) Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. 2007; 13 (3):108-116.
- 82) Herrera F, Nocito M, Martín D, Herrera R, Nava A, Andrés B *et al*. Tolerancia inmunológica y trasplante renal. *NefroPlus*. 2014; 6(1):15-19.
- 83) Sakaguchi N. Naturally arising FoxP3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunologic tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005; 6(4): 345–352.
- 84) Yamazaki 2003 Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, *et al*. Direct expansion of functional CD25 + CD4 + regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*. 2003; 198 (2): 235-247.

- 85) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor α -Chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; 155 (3):1151-1164.
- 86) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. *Science.* 2003; 299 (5609): 1057-1061.
- 87) Cupedo T, Nagasawa M, Weijer K, Blom B, Spits H. Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur J Immunol.* 2005; 35(2): 383-390.
- 88) Wei S, Kryczek L, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood.* 2006; 108 (2):426-431.
- 89) San Segundo D, Benito M, Fernández G, Marín M, Arias M, López M. Células T reguladoras y tolerancia en trasplante: Efecto de la inmunosupresión farmacológica. *Immunol Rev.* 2007; 26 (3): 157-168.
- 90) Giuliani R. Plasticidad de los Fenotipos T CD4+ Helper Modulación de la Respuesta Inmune. *Hematología.* 2013; 17(1): 37-45.
- 91) Vergara U. Linfocitos T reguladores y respuesta inmune. *Av Cs Vet.* 2009; 24 (1- 2): 72-79.
- 92) Hsieh CS, Lee HM, Lio CW. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12 (3):157-167.
- 93) Limón L, Solleiro H, Pupko I, Lascurain R, Vargas M. Las células T reguladoras en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Cardiol Mex.* 2013; 83 (1): 45-54.
- 94) Fantini M, Dominitzki S, Rizzo A, Neurath M, Becker C. *In vitro* generation of CD4+CD25+regulatory cells from murine naive T cells. *Nat Protoc.* 2007; 2(7):1789-1794.
- 95) Muller Y, Seebach J, Bühler L, Pascual M, Golshayan D. Transplantation tolerance: Clinical potential of regulatory T cells. *Self Nonself.* 2011; 2(1):26-34.

- 96) Montoya C, Velilla P, Rugeles M. Caracterización de las células T reguladoras por citometría de flujo: estado del arte y controversias. *Biomédica*. 2010; 30(Supl):37-44.
- 97) Siachoque H, Satisteban N, Iglesias A. Linfocitos T reguladores: subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad T regulatory lymphocytes: subpopulations, mechanism of action and importance in the control of autoimmunity. *Revista colombiana de reumatología*. 2011; 18 (3): 203-220.
- 98) Ramajo A. Análisis de los proteomas y glicoproteomas del tegumento y de los productos de excreción-secreción de *Schistosoma bovis*. Estudio de la interacción del parásito con el sistema fibrinolítico del hospedador (Tesis Doctoral). Fac. de Farmacia. Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola. Universidad de Salamanca. Salamanca, España. 2008.
- 99) Góngora R, Acestor N, Quadroni M, Fasel N, Saravia N, Walker J. Mapping the proteome of *Leishmania viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomédica*. 2003; 23(2):153-160.
- 100) Monzón C. Caracterización de un anticuerpo monoclonal dirigido contra *Trypanosoma evansi* y su aplicación en la detección de antígenos circulantes. *Rev Sci Tech. Off. int. Epiz.* 2006; 25 (3): 1067-1074.
- 101) Antitupa I, Quispe W, Mayo J, Valverde F, Sanchez E. Purificación de la fracción antigénica 27-28 kDa a partir del antígeno metabólico secretado-excretado de *Fasciola hepática*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2014; 31(2): 288-291.
- 102) Mayta H, Hancock K, Levine M, Gilman R, Verastegui M, García H, *et al.* Grupo de Trabajo en Cisticercosis en Perú. Characterization of a novel *Taenia solium* oncosphere antigen. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 156(2): 154–161.

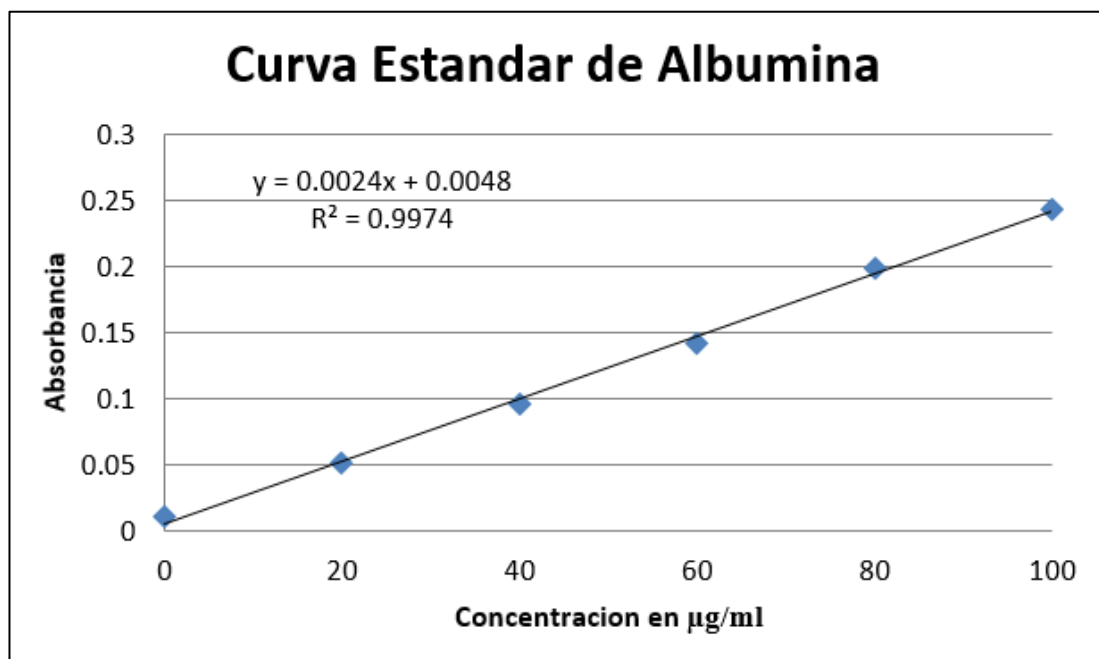
- 103) Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259):680-685.
- 104) Svensson H. Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta Chem. Scand.* 1961; 15 (2): 325-341.
- 105) Vesterberg O, Svensson H. Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta Chem. Scand.* 1966; 20 (3): 820-834.
- 106) MacGillivray A, Rickwood D. The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography. *Eur J Biochem.* 1974; 41 (1): 181-190.
- 107) Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 1975; 26 (3):231-243.
- 108) O'Farrell P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975; 250 (10): 4007-4021.
- 109) Fenjo D, Qin J, Chait BT. Protein identification using mass spectrometric information. *Electrophoresis.* 1998;19 (6):998-1005
- 110) Perkins D, Pappin D, Creasy D, Cottrell J. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999; 20 (18): 3551-3567.
- 111) Carrette O, Burkhard P, Sanchez J, Hochstrasser D. State-of-the-art two dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (2): 812- 823.
- 112) Görg A, Weiss W, Dunn M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004; 4 (12):3665-3685.
- 113) Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J Proteomics.* 2011; 74 (10): 1829-1841.

- 114) Bjorn V. Proteomic analysis of *Taenia spp.* Excretion/secretion proteins: the search for *Taenia solium*-specific diagnostic antigens (Tesis Doctoral). Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie Faculteit Diergeneeskunde. Universiteit Gent Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke. 2014.
- 115) Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193 (1): 265-275.
- 116) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- 117) Adalid L, Fleury A, García T, Hernández M, Parkhouse M, José Crispín *et al* .Human neurocysticercosis: *in vivo* expansion of peripheral regulatory t cells and their recruitment in the central nervous system. *J Parasitol.* 2012; 98(1): 142-148.
- 118) Vargas L, Solis C, Lacleite J. "Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda)". *Parasitology* .2001; 122 (5): 583-588.
- 119) Wang Y, Zhou H, Shen Y, Wang Y, Wu W, Liu H *et al*. Impairment of dendritic cell function and induction of CD4+CD25+FoxP3+ T cells by excretory-secretory products: a potential mechanism of immune evasion adopted by *Echinococcus granulosus*. *BMC Immunol.* 2015; 16(1): 44-53.
- 120) De la Torre E. Caracterización molecular y funcional de proteínas de *Schistosoma bovis* implicadas en la regulación de los mecanismos hemostáticos del hospedador (Tesis Doctoral). Fac. de Biología. Universidad de Salamanca. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), España. 2013.
- 121) Vignali A., Collison L., Workman C. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(7): 523–532.

IX. ANEXOS

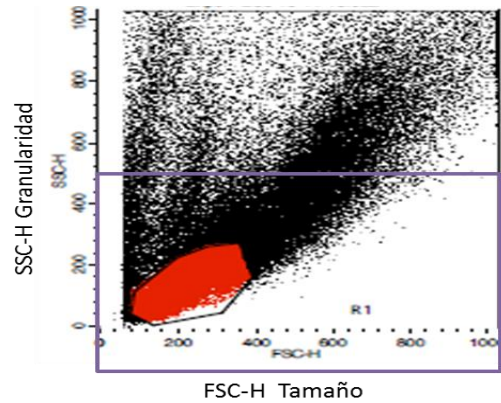
Anexo 1. Cuantificación por método de Lowry

Concentracion	Absorbancia
0	0.0098
20	0.0512
40	0.0952
60	0.1412
80	0.1987
100	0.2441

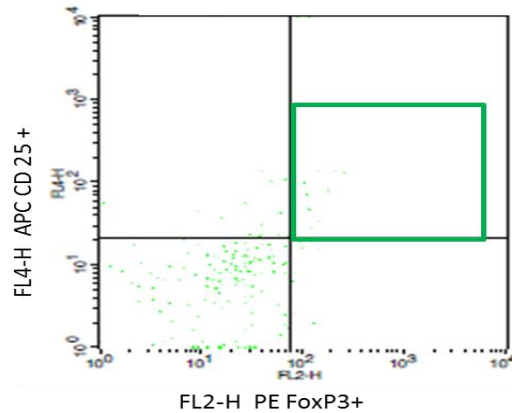


Anexo 2. Análisis del Fenotipo de las Treg por citometría de Flujo

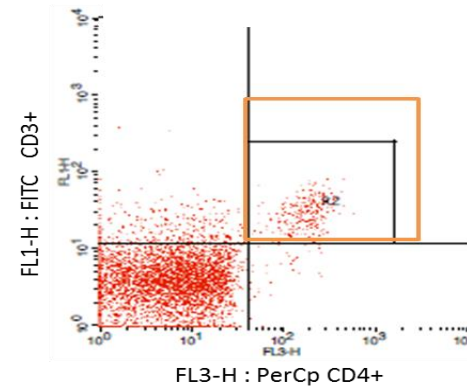
Análisis de los datos del Experimento 3 del PES6 – Ratón 1 de la Dosis 1000µg/ml



R1 : Región de Linfocitos



Región de Marcaje Cuádruple



R2 : Región de Dobles Positivos

% CD3+CD4+

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3209	5.72	2.78
UR	2845	5.07	2.47
LL	49731	88.59	43.16
LR	351	0.63	0.30

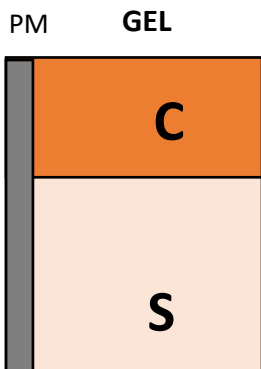
Gate: G1

% de Células T reguladoras
CD3+CD4+ CD25+FoxP3+

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	271	9.48	0.24
UR	221	7.73	0.19
LL	2149	75.17	1.86
LR	218	7.63	0.19

Gate: G2

Anexo 3. Preparación de Geles



Se prepararon por separado las mezclas del gel Separador y Concentrador. Primero se depositó el gel Separador y al polimerizar la solución se coloca el peine y el gel concentrador

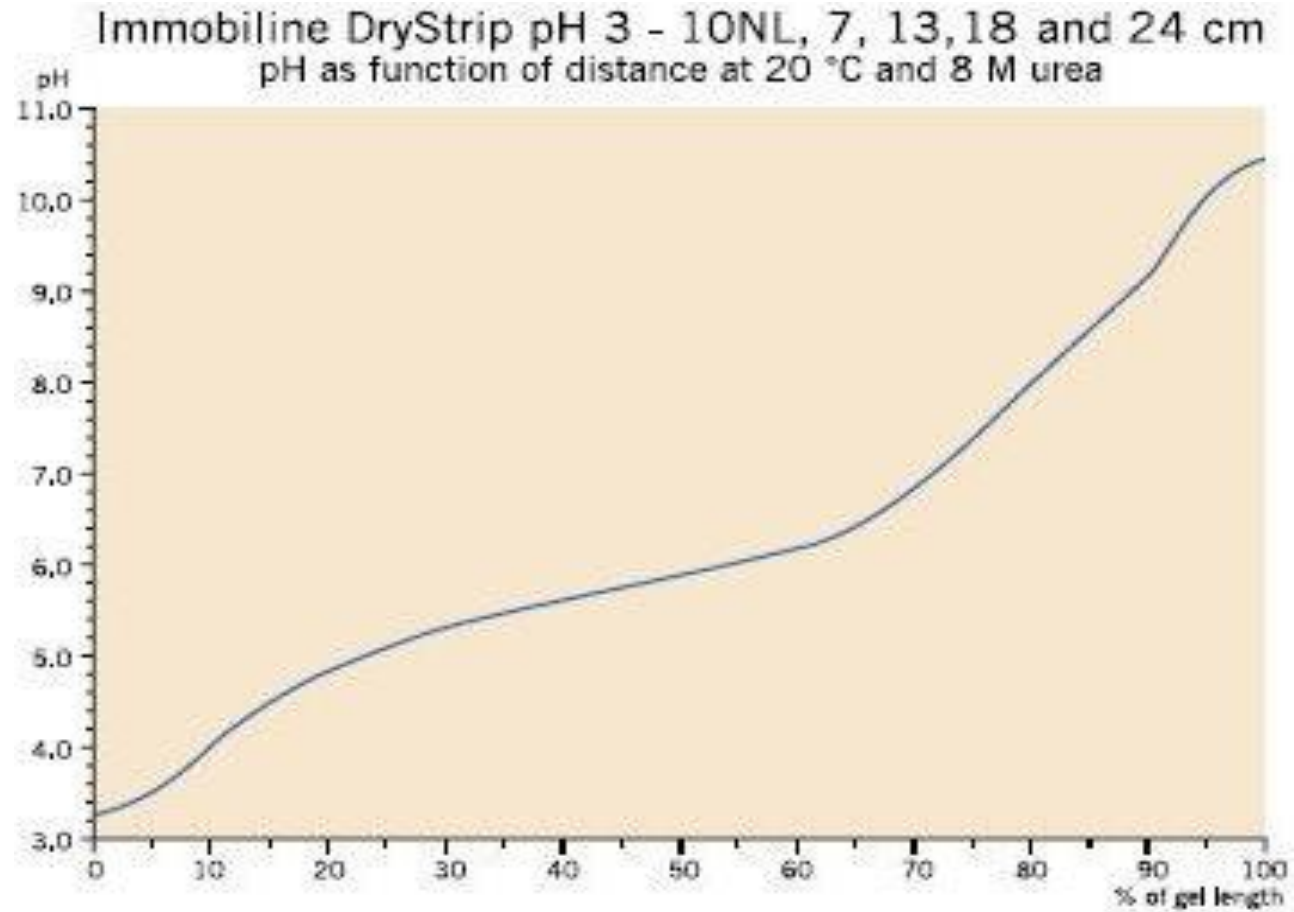
- ✓ Gel de Policrilamida al 12 % con 4% SDS de 7 x 10 cm con un espesor de 1.0 mm

Soluciones	Separador	Concentrador
Concentración del Gel	12%	4.5%
H ₂ O (ml)	2.5	1
Buffer Resolving Gel 4x pH 8.8 (ml)	2.5	-
Buffer Stacking pH 6.8 (ml)	-	1.5
Acrilamida- (ml)	5	2.5
APS 10% (ml)	0.2	0.2
TEMED (ml)	0.02	0.02

- ✓ Gel de Policrilamida al 15 % con 4 % SDS de 10 x 12 cm con un espesor de 1.5 mm

Soluciones	Separador	Concentrador
Concentración del Gel	15%	4.5%
H ₂ O (ml)	4.3	1
Buffer Resolving Gel 4x pH 8.8 (ml)	3	-
Buffer Stacking pH 6.8 (ml)	-	1.5
Acrilamida- (ml)	7.5	2.5
APS 10% (ml)	0.2	0.2
TEMED (ml)	0.02	0.02

Anexo 4. Gráfica Técnica de *Immobiline Drystrip* Visualization of pH gradients



Anexo 5. Spots Totales del producto (E/S) N°4

Se obtuvieron un total de 34 spots de los cuales 22 spots son diferenciales y se encuentran resaltados de amarillo.

Spot No.	% Longitud en el Gel	pH	PM
1	3	3.4	10
2	5	3.5	12
3	8	3.8	13
4	18	4.7	17
5	18	4.7	17
6	10	4	14
7	17	4.7	16
8	28	5.1	22
9	32	5.3	24
10	26	5.1	21
11	30	5.3	25
12	30	5.3	27
13	38	5.5	33
14	42	5.7	35
15	48	5.8	43
16	49	5.8	44
17	50	5.8	47
18	55	6.1	52
19	60	6.2	71
20	59	6.2	69
21	59	6.2	70
22	56	6.2	53
23	61	6.3	73
24	64	6.4	75
25	64	6.4	75
26	79	8.1	250
27	30	5.3	27
28	36	5.5	33
29	37	5.5	34
30	38	5.5	36
31	38	5.5	36
32	41	5.7	36
33	48	5.8	43
34	75	7.9	150

Anexo 6. Spots Totales del producto (E/S) N°6

Se obtuvieron un total de 72 spots de los cuales 58 spots son diferenciales y se encuentran resaltados de amarillo.

Spot No.	% Longitud en el Gel	pH	PM
1	23	4.9	13
2	23	4.9	13
3	20	4.8	12
4	22	4.9	12
5	34	5.4	17
6	36	5.5	19
7	36	5.5	19
8	36	5.5	19
9	38	5.5	23
10	38	5.5	23
11	40	5.6	26
12	42	5.7	29
13	42	5.7	29
14	42	5.7	29
15	42	5.7	29
16	47	5.7	34
17	48	5.8	34
18	49	5.8	36
19	50	5.8	36
20	51	5.8	37
21	51	5.8	37
22	54	5.9	39
23	55	6.1	45
24	56	6.1	49
25	56	6.1	49
26	51	5.8	38
27	56	6.1	50
28	51	5.8	38
29	51	5.8	38
30	51	5.8	38
31	61	6.3	69
32	61	6.3	69

33	60	6.2	69
34	61	6.3	69
35	64	6.6	73
36	64	6.6	74
37	64	6.6	73
38	73	7.5	140
39	73	7.5	142
40	73	7.5	150
41	77	8	220
42	77	8	220
43	77	8	223
44	77	8	222
45	77	8	222
46	77	8	218
47	34	5.4	19
48	5	3.5	2
49	6	3.5	3
50	6	3.5	3
51	5	3.5	4
52	8	3.8	4
53	9	3.8	5
54	9	3.8	5
55	12	4.2	7
56	10	4	8
57	44	5.7	34
58	46	5.7	29
59	78	8.1	250
60	11	4	8
61	11	4	8
62	47	5.7	34
63	49	5.8	36
64	54	5.9	39
65	56	6.1	49
66	56	6.1	49
67	59	6.2	67
68	59	6.2	67
69	60	6.2	67
70	60	6.2	67
71	70	7.5	100