



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

**MODIFICACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE  
TH17/T REGULADORAS EN UN MODELO MURINO DE  
GIARDIASIS, SUPLEMENTADO CON ÁCIDO LINOLEICO  
CONJUGADO**

---

Por:

**Itzel Reyes Duarte**

TESIS APROBADA POR

LA COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Itzel Reyes Duarte, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

*Maricela Montalvo Corral*

---

Dra. Maricela Montalvo Corral  
Directora de tesis

*Silvia Y Moya C.*

---

Dra. Silvia Yolanda Moya Camarena  
Asesor

*Erika Silva Campa*

---

Dra. Erika Silva Campa  
Asesor

*Jesús Hernández López*

---

Dr. Jesús Hernández López  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente al CONACYT por el apoyo otorgado para el financiamiento del proyecto CONACYT CB-2012-182422. Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por darme la oportunidad de estudiar un posgrado. A mi comité de tesis, comenzando por mi directora la Dra. Maricela Montalvo Corral, de quien siempre conté con su apoyo incondicional y consejos tanto en lo académico como en lo personal. A la Dra. Silvia Yolanda Moya Camarena por estar siempre al pendiente en el laboratorio y apoyarnos en todo lo que necesitáramos. Al Dr. Jesús Hernández López por siempre darse un tiempo para ayudarnos, aunque se encontrara ocupado, al igual que por permitirnos utilizar sus instalaciones y equipo. A la Dra. Erika Silva Campa por sus enseñanzas que contribuyeron tanto a mi trabajo de tesis como al aprendizaje personal. A mis compañeros de laboratorio, Lorena Bustamante Córdova, Lucinda del Carmen Puebla Clark y Karla Azucena González Martínez por sus enseñanzas, que gracias a ustedes fue posible integrar todo mi trabajo laboratorio, además de brindarme su amistad incondicional. A Enrique Gil González por su amistad y siempre apoyarme. A mis compañeros del laboratorio de inmunología, Edgar Rascón, Héctor Daniel Parra Sánchez y Mónica Guadalupe Reséndiz Sandoval, por su ayuda en las técnicas de laboratorio y sus consejos. A mis compañeritos que prestaron servicio en el laboratorio de Nutrición Molecular: Osmara Guadalupe Burgara Estrella, Janeth Ramos Enríquez, Lorenia Bernal Ayala, María Vázquez Hernández, José Francisco Valenzuela Sánchez, Karen García Reséndiz, Janet Ramírez Torres y Ana Rocío Rivera Durazo por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio y el cuidado de los ratones. A mi familia, mi mamá Ana Luz Duarte, a mis abuelos Graciela Duarte y Eduardo Bayliss, por su apoyo incondicional y siempre estar ahí para darme ánimos. A mis amigos, con los que pude contar en todo momento, algunos a pesar de la distancia y a mi compañero de vida Carlos por escuchar todas mis angustias y alentarme a seguir adelante.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	<b>ii</b>
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>3</b>
II.1 Respuesta Inmune en Mucosa Intestinal .....	3
II.1.1 Sistema Inmunológico en Mucosas .....	3
II.1.2 Actividad de Células Dendríticas en la Respuesta Innata.....	4
II.1.3 Diferenciación y Activación de Células T Cooperadoras (Th) .....	5
II.1.4 Funciones Efectoras de Células Th 17 .....	6
II.1.5 Modulación de Respuesta Inflamatoria por Células T Reguladoras .....	8
II.1.6 Plasticidad de las Células Th17 y T Reguladoras.....	9
II.1.7 Importancia de la Relación entre Th17/Treg en Respuesta a Parásitos ...	10
II.2. Giardiasis.....	12
II.2.1 Patogenia.....	12
II.2.2 Importancia de la Respuesta Inmune Celular a <i>Giardia lamblia</i> : Modelos Murinos .....	13
II.2.3 Respuesta Inmune Celular en Humanos .....	15
II.2.4 Respuesta Inmune después de la Eliminación de <i>Giardia lamblia</i> .....	16
II.3 Ácido Linoleico Conjugado (CLA) .....	17
II.3.1 Isómeros y Propiedades .....	17
II.3.2 Efecto Inmunomodulador del CLA .....	17
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
Objetivo General.....	24
Objetivos Particulares.....	24
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
V.1 Animales.....	25
V.2 Dieta y Tratamientos.....	25
V.3 Infección Experimental .....	26
V.4 Obtención de Células de Intestino.....	26
V.5 Obtención de Células de Bazo .....	27
V.6 Obtención de Extracto Soluble de <i>Giardia lamblia</i> .....	27
V.7 Cuantificación de Citocinas por Inmunoensayo Ligado a Enzima (ELISA)..	28
V. 9 Cuantificación Relativa de Citocinas y Factores de Transcripción .....	29
V.10 Análisis Histológico de Colon .....	30

V.11 Análisis Estadístico.....	31
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>32</b>
VI.1 Curva de Crecimiento de Ratones Infe­ctados con <i>Giardia lamblia</i> .....	32
VI. 2 Citocinas Cuantificadas por Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	33
VI. 3 Cuantificación Relativa de Factores de Transcripción y Citocinas en Intestino por RT qPCR.....	38
VI. 4 Análisis Histológicos.....	45
<b>VII. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>VIII. REFERENCIAS .....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Diferenciación de células T en función del estímulo por células dendríticas	6
2	Señalización intracelular para la diferenciación de células Th17	7
3	Señalización intracelular para la activación de transcripción de Foxp3	8
4	Curva de crecimiento de ratones de grupo control vs. suplementado con CLA	33
5	Producción de citocinas IL-6 e IL-10 <i>ex vivo</i> en sobrenadante de cultivo de células de bazo	35
6	Producción de citocinas TNF $\alpha$ e IL-17A <i>ex vivo</i> en sobrenadante de cultivo de células de bazo	37
7	Incremento relativo de ARNm de factores de transcripción PPAR $\gamma$ , ROR $\gamma$ T, FOXP3 y NF $\kappa$ B de células de intestino	41
8	Incremento relativo de ARNm de citocinas IL-17A, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ e iNOS en células de intestino	44
9	Cortes histológicos de colon representativos en la etapa preinfección y posteliminación de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Secuencias de oligonucleótidos iniciadores para RT-qPCR	30



## RESUMEN

La respuesta inmune efectora y reguladora en mucosa intestinal se encuentra en equilibrio debido a la relación entre poblaciones de células Th17 y T reguladoras (Treg), importantes en la respuesta a patógenos. *Giardia lamblia* es un parásito intestinal de importancia en salud pública, causa diarrea aguda, cambios en el epitelio duodenal y síndrome inflamatorio en colon posterior a la eliminación. Previamente en nuestro grupo de investigación se demostró que el ácido linoleico conjugado (CLA) tiene efectos sobre las células presentadoras de antígeno y que estimula la producción de IgA en intestino de ratones infectados con *G. lamblia*, pero se desconoce el efecto de polarización de células Th. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación de CLA en el perfil transcripcional característico de Th17 y Treg en ratones infectados con *G. lamblia*, así como los cambios en la mucosa de colon después de la eliminación. Se infectaron dos grupos de ratones, uno suplementando con CLA (n=16) y otro grupo control (n=16). Se determinó el peso de los ratones en ambos grupos durante el bioensayo. A partir de células de intestino delgado, se realizó la extracción de ARN total con Trizol® y cuantificación de ARNm de citocinas y factores de transcripción a los 0, 6, 14 y 40 días post infección (dpi), por RT-qPCR. Se analizaron muestras histológicas de la región proximal de colon. El peso de los ratones no presentó diferencias significativas entre grupos. El CLA aumentó la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ T y la expresión de citocinas IL-10, IL-17A y TGF- $\beta$  (P<0.05) comparado con el grupo control. La expresión de FOXP3 se elevó por efecto de la infección y fue mayor a los 40 días post infección (P<0.05). No se observaron cambios patológicos en la mucosa colónica por efecto de la infección o tratamiento. En conclusión, el CLA promovió una respuesta mixta Th17/Treg en los dpi estudiados. Sin embargo, al día 40 se favorece la producción de citocinas reguladoras, regresando el balance intestinal después de la respuesta inmune para eliminar al parásito.

**Palabras clave:** Ácido linoleico conjugado, *Giardia lamblia*, células Th17, células T reguladoras, ratón.

## ABSTRACT

The immunological and regulatory response in the intestinal mucosa is in equilibrium due to the relationship between populations of Th17 and regulatory T cells (Treg), involved in pathogens response. *Giardia lamblia* is an intestinal parasite significant in public health that causes acute diarrhea, changes in the duodenal epithelium and post-elimination inflammatory syndrome in colon. Cellular response and polarization to different cell subpopulations is influenced by the activity of antigen presenting cells (APC). Previously in our research group it was demonstrated that CLA has effects on APC and that it stimulates the production of IgA in intestine. The effect of cell polarization in Th cells is unknown. So the aim of this work was to evaluate the effect of CLA supplementation on the characteristic transcriptional profile of Th17 and Treg in mice infected with *G. Lamblia*, as well as changes in intestinal mucosa post-elimination. Two groups of mice were infected, one was supplemented with CLA (n=16) and another was the control group (n=16). The weight of the mice in both groups was determined during bioassay, small intestine cells were isolated by enzymatic digestion. Total RNA was extracted with Trizol®, and mRNA cytokine expression and transcription factors were quantified at 0, 6, 14 and 40 days after infection, by RT-qPCR. Additionally, samples were taken from the proximal colon region for histological analysis. Body weight of mice was not different between two groups. CLA had increased expression of ROR $\gamma$ t, IL-10, IL-17A and TGF- $\beta$  cytokines (P <0.05). The expression of FOXP3 was elevated by the effect of infection and was greater at 40-day post infection (P <0.05). Colonic samples were analyzed and no pathological changes were observed in the colonic mucosa due to infection or treatment. In conclusion, CLA promoted a Th17/Treg mixed response in studied days' post infection. However, at 40 dpi the production of regulatory cytokines is favored, returning the intestinal balance after the immune response to eliminate the parasite.

**Keywords:** Conjugated linoleic acid, *Giardia lamblia*, Th17 cells, regulatory T cells, mouse.

## I. INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune en la mucosa intestinal se desencadena a partir de la interacción con antígenos que ingresan por vía oral. Para conservar la homeostasis, los mecanismos efectores del sistema inmune deben estar estrictamente regulados y discriminar entre antígenos dietarios, microbiota y patógenos. Ante la presencia de un patógeno, se inicia la actividad de células efectoras a diferentes niveles de la respuesta inmune, se diferencian y proliferan debido a la señalización mediada por citocinas. En cambio, al reconocer antígenos dietarios se desarrolla una tolerancia inmunitaria (Banchereau et al., 2000; Janeway et al., 2002; Scott et al., 2011).

En mucosa intestinal, la relación entre células Th17 y T reguladoras (Treg) hace la diferencia entre daño y protección a tejido. Estas células son importantes en la respuesta a parásitos protozoarios extracelulares. *Giardia lamblia* es uno de los principales parásitos intestinales que afectan a la población a nivel mundial. Causa la enfermedad conocida como giardiasis, la cual puede presentarse como un cuadro agudo o crónico dependiendo de la inmunocompetencia del hospedero, además se han descrito posibles efectos a largo plazo en la salud intestinal. La respuesta adaptativa es importante tanto en la eliminación del parásito como en las consecuencias después de la resolución de la infección. (Luján et al., 2011).

Actualmente no existe medicamento profiláctico para giardiasis, los tratamientos para controlar la infección se basan en imidazoles y antibióticos. Recientemente, se han explorado otras alternativas como el uso de ácidos grasos como potenciadores de la respuesta inmune. El ácido linoleico conjugado (CLA) es uno

de los ácidos grasos más estudiados debido a sus propiedades biológicas (Chin et al., 1994; O'Shea et al., 2004). El CLA participa en mecanismos que ayudan a suprimir la inflamación, tanto en enfermedades autoinmunes como en infecciones causadas por bacterias o parásitos extracelulares (Ramirez-Santana et al., 2009).

Aún son pocos los estudios referentes al CLA empleado en retos inmunológicos como bacterias o virus, y no existe a la fecha estudios con parásitos. Trabajos previos en nuestro laboratorio encontraron que el CLA ayuda a disminuir la carga parasitaria en un modelo murino con giardiasis, con varios mecanismos efectores implicados en la respuesta innata, aumentando el tipo de población de células presentadoras de antígeno (APC) CD103+ y adaptativa, aumentando los anticuerpos encargados de la eliminación de la infección (IgA) (Bustamante-Córdova, 2016; Puebla-Clark, 2015). Modificar la respuesta inmune innata, conlleva a un cambio en la diferenciación de las células T vírgenes a células T efectoras del tipo Th1, Th2, Th17 o reguladoras (Treg), implicado en la eliminación temprana de la infección (Solaymani-Mohammadi et al., 2010). Por lo tanto, en el presente trabajo se estudiaron los cambios dinámicos en el perfil de citocinas y factores de transcripción característicos de células Th17 y Treg en ratones infectados con *Giardia lamblia* suplementados con CLA.

## **II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

### **II.1 Respuesta Inmune en Mucosa Intestinal**

#### **II.1.1 Sistema Inmunológico en Mucosas**

La respuesta inmune en mucosas es la más extensa y compleja del sistema inmunológico, involucra a la mayor población de células del sistema inmune. En mucosas, la respuesta inmune comprende desde la cavidad oral-faríngea, el tracto respiratorio, gastrointestinal, y tracto urogenital, así como las glándulas exocrinas. El tracto gastrointestinal presenta tres compartimentos: la capa epitelial, la lámina propia y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). En el tracto digestivo, el MALT es llamado tejido linfoide asociado a intestino (GALT), y se compone de las placas de Peyer, folículos linfoides aislados y nódulos linfáticos mesentéricos. En el GALT se diferencian y proliferan las células T, para que en el epitelio y la lámina propia se lleven a cabo las respuestas efectoras (Wu et al., 2014).

La superficie de mucosas se encuentra expuesta constantemente a antígenos dietarios, a la microbiota que la coloniza, pero también a los patógenos que ingresan por vía oral, por lo que se requiere una respuesta diferenciada. Lograr este tipo de respuesta requiere mecanismos estrictos de control para discriminar entre lo benéfico y lo perjudicial. En esta regulación participan distintas estirpes celulares del sistema inmune, que cumplen funciones de reconocimiento, y en su caso, destrucción y eliminación del patógeno y terminación de la respuesta (Janeway y Medzhitov 2002).

## II.1.2 Actividad de Células Dendríticas en la Respuesta Innata

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa, la conforman barreras de las mucosas intestinales. Cuenta con diversas poblaciones de células, algunas con gran capacidad fagocítica como macrófagos, y de producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, como neutrófilos y eosinófilos. Además, en la respuesta innata participan células especializadas en la presentación de antígenos, como las células dendríticas, a las que se les considera clave en la integración de las respuestas innatas y adaptativas (Janeway et al., 2002).

La mucosa intestinal alberga varias subpoblaciones de células dendríticas (DC) que se caracterizan por la expresión de proteínas específicas. Algunas subpoblaciones de DC producen enzimas y secretan citocinas que activan la respuesta innata como iNOS, (óxido nítrico sintasa, por sus siglas en inglés), TNF (factor de necrosis tumoral), e IL-1 $\beta$ ; citocinas que desencadenan respuestas inflamatorias de defensa antimicrobiana. Estas citocinas activan la vasodilatación del endotelio e incrementan la permeabilidad de los vasos sanguíneos dejando pasar a las proteínas del suero y el reclutamiento de leucocitos en el sitio de infección. Además, las DC son el puente entre la respuesta innata y adaptativa, ya que de estas dependerá la diferenciación de las células T efectoras o reguladoras. La activación de DC en mucosas consiste en el reconocimiento de antígenos con patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP). Estos PAMP son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones de las DC para inducir su maduración y migración a los nódulos linfáticos y placas de Peyer. Al llegar al tejido linfoide, las DC presentan el antígeno a células T vírgenes, durante el proceso de activación se requiere la producción de citocinas específicas y moléculas de coestimulación por las APC, que conduce a su diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Th) en un subtipo específico (Banchereau et al., 2000; Janeway et al., 2002;

Medzhitov, 2007; Serbina et al., 2003). Como ejemplo, las DC que expresan CD103<sup>+</sup>CD8a<sup>+</sup> promueven la diferenciación de células T vírgenes a Th1 (citotóxicas), aquella subpoblación CD103<sup>-</sup> induce la generación de células Th17. Mientras que las células dendríticas CD103<sup>+</sup> inducen la diferenciación a células Treg (Scott et al., 2011). La principal función de las células dendríticas es polarizar la respuesta inmune, esto dependerá del estado de madurez y de las citocinas producidas, además de otras células del sistema inmune (Faubert, 2000; Janeway et al., 2002; Loscher et al., 2005). Es por ello que la actividad de las DC es clave para la diferenciación de células T en la respuesta adaptativa.

### **II.1.3 Diferenciación y Activación de Células T Cooperadoras (Th)**

Las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse en varios subtipos de células efectoras según la naturaleza del agente patógeno. Cada una de las células Th se distingue por un perfil característico en la producción de citocinas. Por ejemplo, la diferenciación a células Th1 es promovida por interleucina (IL) 12 e IL-18 y una vez diferenciadas producen interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-2, involucradas en la eliminación de patógenos intracelulares. La diferenciación a células Th2 es inducida por IL-4 e IL-10 y estas producen IL-4, IL-5 e IL-10 actúan para promover la eliminación de parásitos extracelulares, por ejemplo, helmintos (Hirota et al., 2010; Weaver et al., 2013).

Las células Th17 se generan por el estímulo de las citocinas TGF- $\beta$  e IL-6. Estas producen la familia de citocinas IL-17 inducidas por la presencia de IL-23. Recientemente se encontró que también las Th17 son grandes productoras de IFN- $\gamma$  (Kebir et al., 2009). La producción de estas citocinas está relacionada a respuestas inflamatorias y a respuesta inmune contra parásitos extracelulares. Por último, la diferenciación a células Treg es promovida por las citocinas IL-10 y TGF- $\beta$ ; estas secretan IL-10. Las Treg se vinculan a la supresión de respuesta inmune y a la inducción de tolerancia en mucosas (figura 1) (Draper et al., 2014;

Langrish et al., 2004; Mueller et al., 2013). La diferenciación de la célula T virgen dependerá del tipo de respuesta que la DC tenga ante un antígeno.

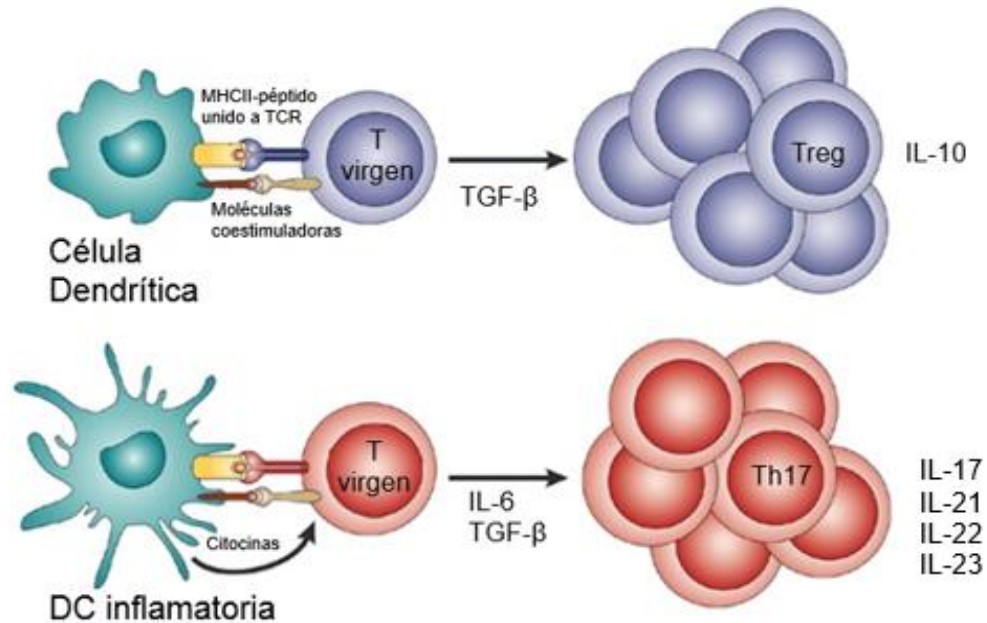


Figura 1. Diferenciación de células T en función del estímulo otorgado por células dendríticas. (Bluestone et al., 2003)

#### II.1.4 Funciones Efectoras de Células Th 17

En el intestino del ratón existe un número importante de células Th17 en estado basal, su producción es importante para la eliminación de patógenos extracelulares. La diferenciación hacia Th17 inicia cuando la citocina TGF- $\beta$ , en conjunto con IL-6, son reconocidas por receptores de células T (TCR) en la membrana de las células T vírgenes. Esto activa la cascada de señalización intracelular por Smad 2/3 y STAT3 respectivamente, los cuales se unen a la zona promotora del factor de transcripción ROR $\gamma$ T (retinoic acid-related orphan receptor gamma T, por sus siglas en inglés). Consecuentemente, el ROR $\gamma$ T



expresado se une a la región promotora que dirige la transcripción de IL-17 (figura 2) (Duhén et al., 2013; Hermann-Kleiter et al., 2010).

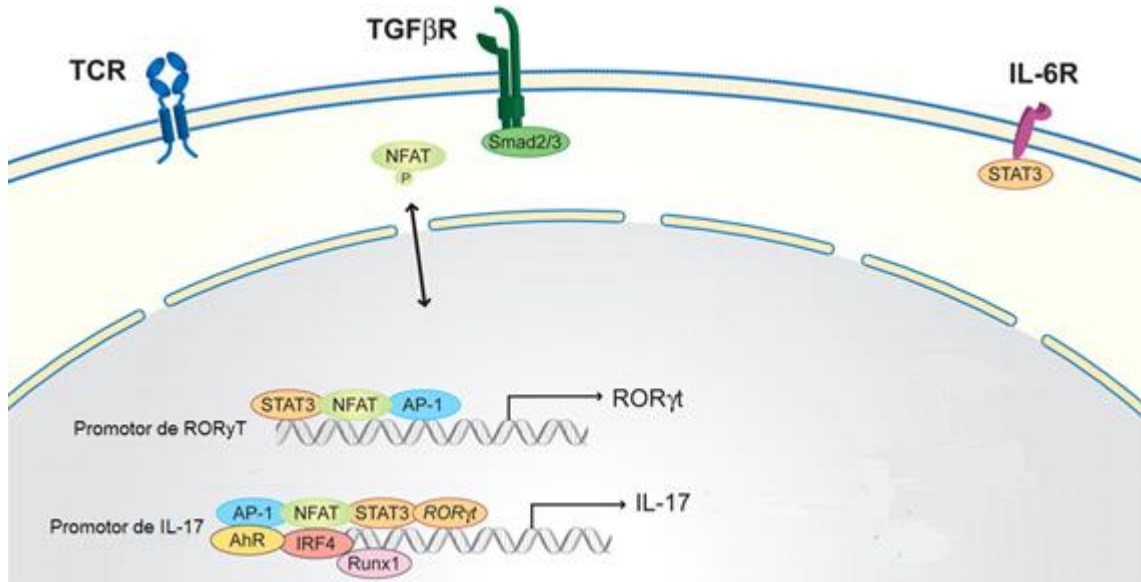


Figura 2. Señalización intracelular para la diferenciación de células Th17 (Hermann-Kleiter et al., 2010).

La IL-17 se divide en una familia de seis citocinas: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F; de las cuales IL-17A es la más estudiada en procesos inflamatorios (Dann et al., 2015; Dreesen et al., 2014). La IL-17A es considerada citocina proinflamatoria, ya que la señalización intracelular de esta citocina permite la activación de la vía NF-κB, la cual está ligada con la activación de la apoptosis y la producción de células proinflamatorias (Bettelli et al., 2006; Travis et al., 2014; Weaver et al., 2006; Xu et al., 2010). La producción no controlada de IL-17A se ha relacionado con procesos autoinmunes (Kimura et al., 2011; Veldhoen et al., 2006). No obstante, se ha comprobado la importancia de la producción de IL-17A en la eliminación de parásitos extracelulares, debido a que se relaciona con el transporte de inmunoglobulinas IgA, de la lámina propia al lumen intestinal, (Dann et al., 2015; Dreesen et al., 2014; Hirota et al., 2010). La IL-17A posee un efecto tanto como protector como nocivo en tejido, esto

dependerá de que su proliferación sea regulada por un tipo de célula antagónica a Th17.

### II.1.5 Modulación de Respuesta Inflamatoria por Células T Regulatoras

La diferenciación de las células Treg se inicia con el reconocimiento del TCR de la célula T virgen con MHC-II de la APC, en conjunto con un ambiente inmunosupresor (Bluestone y Abbas, 2003). Además, como coestímulo, el reconocimiento de TGF $\beta$  en el TCR en membrana, que activa la cascada de señalización del complejo Smad2/3 y el STAT5. Estos se unen a la región promotora del gen Foxp3 (forkhead box protein P3), que es un factor de transcripción característico de las Treg (figura 3) (Hermann-Kleiter et al., 2010).

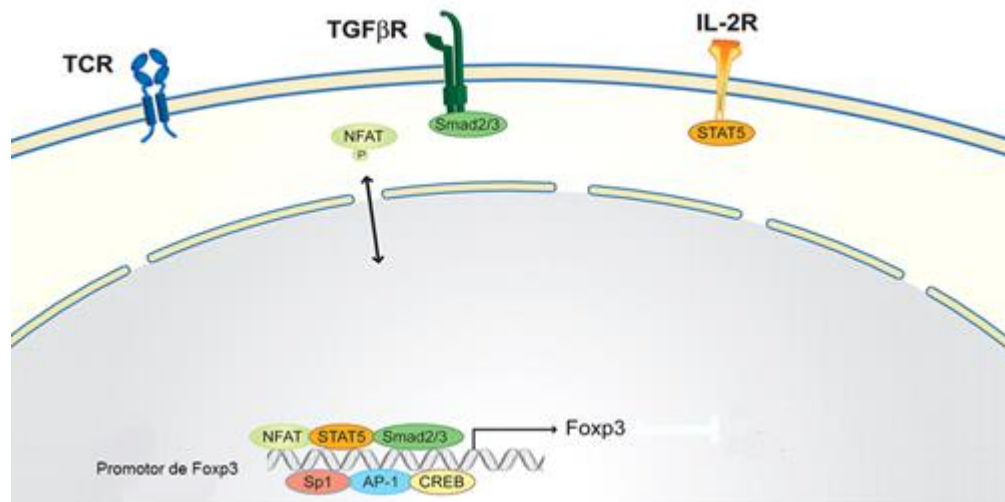


Figura 3. Señalización intracelular para la activación de transcripción de Foxp3 (Hermann-Kleiter et al., 2010).

La activación de las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes se lleva a cabo mediante la activación de mecanismos dependientes de las citocinas IL-10 y TGF- $\beta$  (W. Chen et al., 2003; Zheng et al., 2007). Existen dos tipos de células Treg, clasificadas según su origen, las primeras son llamadas naturales (nTreg), que se producen

en el timo. Las nTreg en un principio no expresan el factor de transcripción Foxp3, durante el proceso de diferenciación en el timo se requiere la interacción entre su receptor de linfocito T (TCR) moléculas del MCH-II que presentan antígenos propios (Jordan et al., 2001; Haribhai et al., 2011). El otro tipo son las inducidas (iTreg) Foxp3<sup>+</sup>, las cuales se generan a partir de células T vírgenes CD4<sup>+</sup> en sangre periférica y expresan IL-10. Las superficies mucosas, como en el intestino se encuentran una importante cantidad de Treg, y se ha observado que gran parte son naturales (Haribhai et al., 2009).

Estas células son consideradas antagónicas a las Th17, tienen un papel antiinflamatorio y mantienen la tolerancia por la producción principalmente de IL-10 (Li et al., 2011; Zheng et al., 2007). Su importancia se ha observado a nivel sistémico, donde se ha descrito que en su ausencia prevalece una gran infiltración de células de origen linfoide y mieloide produciendo daño en tejidos (Haribhai et al., 2011). Existen componentes que pueden favorecer la diferenciación de células T vírgenes a Treg. Se ha encontrado que ácidos grasos poliinsaturados favorecen la expresión del factor de transcripción PPAR $\gamma$  (Receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma), que consecuentemente inducen la diferenciación hacia Treg (Iwami et al., 2011). El ambiente inmunosupresor de las mucosas favorece la inducción de células Treg que suprimen la respuesta a antígenos exógenos, además que la citocina producida por Treg, IL-10, es capaz de contrarrestar el efecto de respuestas proinflamatorias.

### **II.1.6 Plasticidad de las Células Th17 y T Reguladoras**

La relación entre Th17 y Treg es recíproca, aunque se les describe como células antagónicas se ha comprobado que existe plasticidad entre ambas. La conversión de Th17 en Treg se ha observado durante procesos infecciosos bacterianos y de parásitos helmintos. Gagliani et al. (2015) encontraron que en

ratones infectados con *Staphylococcus aureus*, que las Th17 adquirirían el perfil transcripcional de Treg en la fase aguda de la infección. Además, observaron que ratones infectados por segunda vez con el parásito *Nippostrongylus brasiliensis*, también existía una conversión de Th17 a Treg *in vivo*. En el ensayo *in vitro*, confirmaron que esta transformación se lleva a cabo por la señalización intracelular de TGF- $\beta$ , donde un conjunto de proteínas citoplasmáticas al activarse se convierten en factores de transcripción que regulan la expresión y supresión de genes (Gagliani et al., 2015).

Diversos estudios *ex vivo* han descrito que existe igualmente una conversión de Treg a Th17 en cultivo celular bajo condiciones proinflamatorias. Yang et al. (2008) observaron que al añadir IL-6 y TGF- $\beta$  a células Treg cultivadas, estas adquirirían el perfil transcripcional de las Th17. La plasticidad entre Th17 y Treg, se ha descrito que depende del reconocimiento de IL-6 e IL-1 $\beta$  por los TCR, las cuales activan la señalización intracelular para la transcripción de ROR $\gamma$ t (Yang et al., 2008). Esta conversión parece ser dependiente de la expresión de IL-23 por las células dendríticas, y la activación del factor de transcripción ROR $\gamma$ t en las células Treg, las cuales son capaces de producir IL-17, expresando en conjunto, Foxp3 (Osorio et al., 2008). La plasticidad de las células Treg y Th17 proveen al organismo de una mayor flexibilidad para enfrentarse a patógenos y cambios del medio ambiente, así como evitar una respuesta inmune innecesaria ante los antígenos dietarios o la microbiota.

### **II.1.7 Importancia de la Relación entre Th17/Treg en Respuesta a Parásitos**

En un estado de homeostasis, se produce TGF- $\beta$  para suprimir la proliferación de células T efectoras e inducir las células Treg. Sin embargo, cuando se presenta una infección, las células del sistema inmune innato que se encuentran en la lámina propia secretan IL-6. La generación de Treg inducidas por TGF- $\beta$  es suprimida y provoca el dominio de células Th17 (Bettelli et al., 2006). Diversos

estudios han demostrado que la relación entre células Th17 y Treg es importante para el control y la eliminación de patógeno (Pang et al., 2014; Z. Wang et al., 2014).

La relación entre Th17 y Treg se ha evaluado en modelos murinos infectados con parásitos intracelulares. Fonseca et al., en 2012 evaluaron la relación entre células Th17 y Treg en mucosa intestinal de ratones infectados con *Toxoplasma gondii*. Se infectaron por vía oral a dos cepas de ratón, una susceptible C57BL/6 y otra resistente BALB/c al parásito. En este estudio se observó incremento en la población de Th17 en la lámina propia y las placas de Peyer durante el progreso de la infección. Ambas cepas de ratón presentaron un desbalance, la susceptible exhibió una cantidad más alta de Th17, mientras que la cepa resistente fue más alta la cantidad de Treg. Se evaluaron las funciones de IL-17 e IL-22 en ratones con IL-17 *-/-* e IL-22 *-/-*. Los ratones *knock out* presentaron una carga parasitaria e inflamación intestinal mayor que los de la cepa C57BL/6, y menor proporción de Treg. Se determinó que la producción de IL-17 e IL-22 es necesaria para el control de la infección por *T. gondii* y que las células Treg tienen una función importante en control de la inflamación y disminución del daño postinfección (Fonseca et al., 2012).

Mientras que Keswani y Bhattacharyya (2014) compararon la proliferación de Th17 y Treg provenientes de bazo de ratones suizos. Utilizaron un grupo infectado con *Plasmodium berghei ANKA* (cepa letal) y otro con *Plasmodium yoelii* (cepa menos agresiva). En ratones con *P. berghei ANKA* se encontró una disminución en la producción de citocinas TGF- $\beta$ , IL-2 e IL-10 y un aumento de TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-23 comparado con los ratones infectados con *P. yoelii*. Por el contrario, en ratones infectados con *P. yoelii* se encontró un mayor número de Treg provenientes de bazo. La letalidad de la infección *P. berghei ANKA* posiblemente pueda deberse a la falta de regulación de las Th17 por parte de Treg. Los resultados de este estudio sugieren que la expresión diferencial de

Treg y Th17 podría tener un papel clave en la letalidad de la infección por malaria (Keswani et al., 2014).

Recientemente, Pang et al. (2014) evaluaron la relación entre Th17 y Treg durante la infección con el parásito *Echinococcus multilocularis*. Para este estudio, utilizaron dos grupos de ratones, uno infectado con el parásito y otro sin infectar (control). Ambos grupos se monitorearon desde los 2 hasta 270 dpi, midiendo la expresión de factores de transcripción y perfil de citocinas característicos de Th17 y Treg. Observaron un incremento en la expresión de TGF- $\beta$  desde el día 8, alcanzando su pico máximo al 270 dpi. Mientras que se dio un incremento de ROR $\gamma$ T del 8 al 90 dpi y una disminución del 180 al 270 dpi. La expresión de Foxp3 fueron significativamente más alta al final de la etapa media y especialmente en la tardía, entre 30 y 270 dpi (Pang et al., 2014). La relación entre las Th17 y Treg es importante tanto para la eliminación del antígeno como para el control del sistema inmune, además ambas respuestas están relacionadas con la producción de anticuerpos IgA, importante en la respuesta de mucosas contra parásitos extracelulares.

## II.2. Giardiasis

### II.2.1 Patogenia

*Giardia lamblia* es un parásito protozoario binucleado flagelado del orden Diplomonadida, causante de la enfermedad conocida como giardiasis. La infección en humanos y otros mamíferos se da normalmente por la ingestión de agua o comida contaminada con quistes. Al pasar el quiste del estómago al duodeno, la primera parte del intestino delgado, se diferencia a trofozoíto. Los parásitos colonizan esta parte del tracto digestivo, donde son expuestos a las

enzimas digestivas, nutrientes y células de la mucosa intestinal (Rohrer et al., 1986).

La severidad de la infección depende de varios factores, incluyendo la edad del hospedero, estado nutricional, sistema inmune, así como la virulencia y patogenia de la cepa de *Giardia* (Williamson et al., 2000). En algunas ocasiones, se presenta de manera asintomática, pero en muchos casos puede causar problemas como diarrea, debilidad, dolor abdominal, pérdida de peso, vómito, flatulencias y fiebre (Faubert 2000; Baque et al., 2011). Aunque la mayor parte de las infecciones son de corta duración se han descrito efectos intestinales de largo plazo post infección, tales como daños en las uniones estrechas en mucosa e infiltración de neutrófilos (Chen et al., 2013).

### **II.2.2 Importancia de la Respuesta Inmune Celular a *Giardia lamblia*: Modelos Murinos**

Tanto la respuesta humoral como celular son imprescindibles para el control de la infección por *Giardia lamblia*. En un estudio realizado por Singer y Nash (2000), se compararon cuatro tipos de ratones: deficiente de células B, deficiente de células T- $\alpha\beta$ , deficiente de células B y T- $\alpha\beta$  (SCID) y tipo silvestre. Los cuatro grupos de ratones fueron infectados con *G. lamblia* y se observó que en los tipos silvestre y deficientes de células B eliminaron el parásito más rápidamente que los ratones deficientes de T- $\alpha\beta$  y SCID. Esto dio la pauta para sugerir que las células T tienen un papel importante en la eliminación del parásito. Para comparar resultados, se realizó un estudio con *G. muris*, en el cual la infección se caracteriza por ser más duradera que *G. lamblia*, en ratones deficientes de células B, T- $\alpha\beta$  y de tipo silvestre. Como resultado, no hubo diferencias en el tiempo de la resolución de infección entre los ratones deficientes comparado con el tipo silvestre. Singer et al., (2000) describieron que como ratones deficientes

de células T resolvieron la infección, la vía de señalización de anticuerpos debía ser independiente a la respuesta inmune celular (Singer et al., 2000).

Singer y Nash (2000), también trataron de determinar el tipo de célula Th que se encarga de la eliminación de *G. lamblia*. En este experimento utilizaron tres grupos de ratones infectados con *G. lamblia*. El primer grupo fue el tipo silvestre, el segundo, al cual se le suprimió el gen IFN- $\gamma$  para Th1, y el tercero, que se le suprimieron los genes de IL-4, IL-4R y STAT-6 para Th2. Los ratones de los grupos dos y tres pudieron controlar la infección igual que el tipo silvestre. Este resultado permitió hipotetizar que había otro tipo de célula T cooperadora necesaria para la eliminación del parásito en ratón (Singer et al., 2000).

En el 2003, Zhou et al., comprobaron la importancia de la producción de IL-6 en células intestinales, durante una infección por *G. lamblia* en ratón. Se tomaron dos grupos, uno silvestre y otro deficiente de IL-6. Se examinó la carga parasitaria los 5, 15, 28 y 60 dpi. En el tipo silvestre se observó que pudo controlar la infección al 15 dpi mientras que en el grupo de ratones deficientes de IL-6, a pesar de que se produjeron anticuerpos IgA, se vio la eliminación del parásito hasta el 60 dpi. Esto demostró que IL-6 es una citocina necesaria para el control temprano de la giardiasis. Se encontró que en intestino, las células dendríticas son la fuente de la citocina IL-6, y con ello se estimula la respuesta adaptativa (Zhou et al., 2003).

Jiménez et al., el 2014 reportaron que existe una respuesta sistémica y localizada en giardiasis. Se cuantificó la producción de citocinas en bazo de ratones BALB/c infectados con *G. intestinalis* y observaron un aumento de IL-4 a los 7 dpi y de IFN- $\gamma$  a los 14 dpi, coincidiendo con la etapa aguda y de eliminación respectivamente. Por otro lado, la IL-10 fue aumentando gradualmente a los 14, 21 y 28 dpi. En suero se observó un aumento de anticuerpos IgA en la etapa de eliminación, mientras que en extracto fecal este incremento se percibió a los 7 dpi. Debido a los resultados obtenidos,



propusieron que se trataba de una respuesta mixta por las células Th1 y Th2 (Jimenez et al., 2014).

Hasta hace poco no se conocían los efectos de otras poblaciones de linfocitos T en la respuesta a esta parasitosis. Sin embargo, Dreesen et al. (2014), en un modelo de infección con *Giardia muris*, observaron un aumento en la producción de IL-17A, citocina expresada por Th17, la cual se relacionó con eliminación del parásito. También se describió un aumento significativo en la producción de IL-6 y TGF- $\beta$  en la primera semana post infección, mientras que la expresión de IL-10 no cambio durante la infección (Dreesen et al., 2014).

Aún existen pocos estudios que describan la importancia la respuesta Th17 en la eliminación de otras cepas de *Giardia*. Recientemente, Dann et al., 2015 estudiaron la importancia de la expresión de IL-17A para la producción de anticuerpos IgA en un modelo ratón infectado con *Giardia lamblia*. Analizaron dos grupos infectados, uno tipo silvestre y otro il17<sup>-/-</sup>, observaron que en el tipo silvestre el pico de la infección se dio a los 5 dpi y a los 15 dpi se había eliminado el parásito, mientras que en el grupo il17<sup>-/-</sup> no fue capaz de eliminarlo a la segunda semana postinfección. Lo que demuestra que IL-17A es importante para la eliminación de *G. lamblia*, ya que esta citocina es requerida para el transporte de IgA hacia el lumen intestinal (Dann et al., 2015). La diferenciación hacia Th17 y producción de citocinas proinflamatorias es esencial para la eliminación tanto de *G. lamblia* como de *G. muris*. Sin embargo, pocos estudios se han realizado acerca de la respuesta reguladora en la eliminación del parásito.

### **II.2.3 Respuesta Inmune Celular en Humanos**

Uno de los escasos estudios que se han realizado en humanos, por Saghaug et al. (2016) dividieron en dos grupos a los participantes, unos expuestos a *G.*

*lamblia*, los cuales presentaban síntomas y los no expuestos, los cuales confirmaron con pruebas que no tuvieran infección. Saghaug, et al., observaron que en células T CD4<sup>+</sup> de memoria, en sangre periférica, la población de Th17 se mostró elevada en personas expuestas a *G. lamblia* comparada con el grupo no expuesto (Saghaug et al., 2016).

Aunque previamente se ha reportado que la giardiasis produce una respuesta inflamatoria, un trabajo realizado por Yahya et al. (2015) compararon el porcentaje de población de Treg Foxp3<sup>+</sup> en humanos infectados con diversos parásitos, entre ellos *G. lamblia*. Yahya et al., observaron que la población de células Treg Foxp3<sup>+</sup> incrementó en sangre periférica de pacientes con giardiasis al compararlos con infectados de otros parásitos (Yahya et al., 2015). La giardiasis produce diverso tipo de respuestas, tanto pro como antiinflamatorias. Ambas respuestas son importantes para el control y la eliminación efectiva de la infección.

#### **II.2.4 Respuesta Inmune después de la Eliminación de *Giardia lamblia***

La respuesta inflamatoria en mucosas del intestino de ratón, después de la eliminación de *G. lamblia*, suele ser persistente. Se ha observado la disfunción en la barrera epitelial e internalización de bacterias comensales, por lo que existe un aumento en la infiltración fagocítica y en la producción de citocinas proinflamatorias (Chen et al., 2013). La inflamación post eliminación se ha observado en humanos y en modelos murinos, y es un tema de creciente interés debido a las implicaciones en la salud intestinal a largo plazo. Existen diversos tratamientos para controlar la infección, como imidazoles y antibióticos, pero recientemente se proponen alternativas que potencie el sistema inmune y disminuya las molestias en el sistema digestivo, después de la eliminación del parásito.

## II.3 Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

### II.3.1 Isómeros y Propiedades

El CLA es un ácido graso poliinsaturado que consta de un conjunto de isómeros cis-9, trans-11 y trans-10, cis-12 derivados del ácido linoleico, encontrados frecuentemente en productos cárnicos y lácteos provenientes de rumiantes (Bassaganya-Riera et al., 2002; Chin et al., 1994; Ha et al., 1987). Además, se obtiene por la biohidrogenización producida por la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler et al., 1966).

En el 2008, la Administración de Medicamentos y Alimentos autorizó al CLA como un compuesto seguro para el consumo humano (FDA, 2008). Se ha descrito que posee un efecto protector contra enfermedades como el cáncer, aterosclerosis, y diabetes debido a sus propiedades antiinflamatorias (O'Shea et al., 2004). El CLA se encuentra comúnmente en productos animales, además que se le ha atribuido como potente antiinflamatorio, por lo que podría tener una influencia en el sistema inmune.

### II.3.2 Efecto Inmunomodulador del CLA

Se han obtenido efectos de los diferentes isómeros del CLA en las funciones del sistema inmune innato y adaptativo, incluyendo la potenciación de la respuesta a patógenos y el aumento en la producción de citocinas antiinflamatorias en modelos murinos de inflamación (Zhang et al., 2005). Estudios donde se han analizado los efectos del CLA, sobre el sistema inmune, han descrito resultados que comprueban su acción moduladora, pero a diferentes niveles. Las discrepancias entre los resultados podrían deberse al tipo de células que se utilizan para cada estudio, composición de la dieta e isómeros empleados, así

como la especie, cepa y edad de los animales de experimentación. También cuando se utilizan células en cultivo, el tipo de medio, la temperatura entre otras condiciones, podrían tener alguna influencia en los efectos del CLA resultantes (Bassaganya-Riera et al., 2001; Hayek et al., 1999; Zhang et al., 2005).

En un estudio hecho por Bassaganya-Riera et al. (2004), experimentaron con un modelo de ratón de la cepa C57BL6/J, a los que se les administró dextran sulfato de sodio para inducir inflamación del intestino. Se dividieron en dos grupos, uno control al que no se le proporcionó ningún tratamiento, y por separado, al que se con una mezcla 50:50 de los isómeros 9-cis, 11-trans y trans-10, cis12 de CLA. Se encontró una disminución en la expresión de NFκB, factor de transcripción relacionado a respuestas proinflamatorias, en los ratones suplementados con CLA en comparación del grupo control. Además, en los cortes histológicos de intestino, se comprobó que los ratones a los que se les administró CLA presentaron menor inflamación que los que no tuvieron tratamiento (Bassaganya-Riera et al., 2004).

Conforme a lo anterior, Reynolds et al. (2009) probaron el efecto del CLA en dos grupos de ratones alimentados con carne que contenían dos distintas concentraciones de CLA. Un grupo con una concentración alta (4.3% del total de la composición de ácidos grasos) y otro con una baja (0.84% del total de la composición de ácidos grasos). Cada grupo fue a su vez dividido en dos tratamientos: uno al que se les indujo shock tóxico por lipopolisacáridos bacterianos y el grupo control a los cuales se les administró buffer de fosfato salinos (PBS) 1x en lugar de la endotoxina. Después de 6 horas, se les extrajo sangre para la obtención de suero y se cuantificó la expresión relativa de ARNm de IL-10, la cual fue significativamente más alta en ratones alimentados con una dieta alta en CLA. En el grupo con dieta alta en CLA, la producción de citocinas proinflamatorias como IFN-γ, IL-12 e IL-1β, se vio reducida significativamente. También, hubo una disminución en la expresión del factor de transcripción NFκB mientras que la expresión de PPARγ fue significativamente mayor, esto comparado con el grupo con dieta baja en CLA. Por lo que se demostró que una

dieta alta en CLA ejerce efectos antiinflamatorios en una sepsis inducida por LPS *in vivo* (Reynolds et al., 2009).

El CLA está involucrado en la proliferación de células Treg, lo que proporciona una disminución en la extravasación leucocitaria y un menor daño en la mucosa intestinal. En un estudio hecho por Evans et al. (2010), encontraron que en ratones que fueron suplementados con CLA, aminoró la inflamación, debido a un incremento en los porcentajes de células Treg en nódulos linfáticos mesentéricos (Evans et al., 2010).

Bassaganya-Riera et al. (2012), compararon los efectos inmunomoduladores de probióticos bacterianos VSL#3 y del CLA, contra un grupo control, en ratones a los cuales se les indujo colitis con dextran sulfato de sodio. Tanto en el grupo tratado con VSL#3, como en el de CLA, se demostró una disminución significativa en la inflamación, lo cual indicó que hubo una disminución en la cantidad de macrófagos activados por la vía clásica, por lo que hubo una disminución en colitis y una recuperación temprana en la fase aguda inflamatoria de la enfermedad. También, la expresión de genes para las citocinas factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) y MCP-I se vieron reducidos en ambos grupos suplementados (Bassaganya-Riera, Viladomiu, et al., 2012).

El CLA actúa como ligando y activador de factores de transcripción, como el PPAR $\gamma$ , que reducen la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1 $\beta$  en mucosas. También, se describe al PPAR $\gamma$  como antagonista a la expresión de NF $\kappa$ B y se le ha relacionado con la subsistencia de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-10 en ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) (Draper et al., 2011; Guri et al., 2010). Loscher et al. (2005) utilizaron células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón, las cuales cultivaron y estimularon con lipopolisacáridos bacterianos. En este estudio se suplementó previamente a un grupo de ratones con el isómero cis-9, trans-11 de CLA y otro, el grupo control, con dimetil sulfóxido. Las células de los roedores suplementados con CLA, mostraron una disminución significativa de IL-12 y un aumento en IL-10 a nivel

transcripcional y de expresión de proteínas. Demostrando que el isómero cis-9, trans-11, de CLA, tiene la capacidad de inducir la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10, en células dendríticas y por consecuencia, modula la producción de citocinas asociadas a la polarización de la respuesta mediada por células Th (Loscher et al., 2005).

La citocina proinflamatoria IL-12 activa las células dendríticas, por lo que influye en la diferenciación de las células Th (Banchereau et al., 2000; Draper et al., 2014). Los linfocitos T forman parte de la respuesta inmune celular, estos provienen de una célula pluripotencial en médula ósea, que migran hacia el timo para madurar ahí. Estudios sugieren que el CLA podría influir sobre las vías críticas en su diferenciación en timo (O'Shea et al., 2004; Pang et al., 2014).

Relacionado a los estudios anteriores, Draper et al. (2014), describieron el efecto del CLA en células dendríticas, en un estudio *in vitro* y *ex vivo*. Para el ensayo *in vitro*, se utilizaron células dendríticas derivadas de médula ósea que fueron estimuladas con lipopolisacáridos bacterianos. Después, a un cultivo celular se trató con isómero de CLA 9-cis, 11-trans, mientras que a otro cultivo no se le administró ningún tratamiento. El cultivo de DC sin tratamiento produjeron citocinas proinflamatorias ante el estímulo de lipopolisacárido, incluyendo IL-12, IL-6 y TNF- $\alpha$ . Las células tratadas con el isómero de CLA redujeron la expresión de citocinas IL-12 e IL-27 y en cambio aumentó la producción de IL-10, esto comparado el cultivo sin tratamiento donde no se observó un cambio en esta citocina. Para el estudio *ex vivo*, se utilizaron ratones BALB/c, los cuales fueron estimulados con lipopolisacáridos bacterianos para inducir inflamación en colon. Se tomaron células dendríticas de ratones suplementados con una dieta alta en el isómero cis-9, trans11 de CLA por 5 semanas. Las células fueron cultivadas y se demostró que hubo una menor producción de IL-12 en células de ratones suplementados con CLA comparado con el grupo control. En ambos estudios disminuyó la producción de citocinas proinflamatorias en células tratadas y ratones suplementados con CLA (Draper et al., 2014).

Draper, et al. (2014), identificaron que el CLA puede suprimir la secreción de IL-17 de las células extraídas del bazo, al igual que la diferenciación de células Th17. Se aislaron células T CD4<sup>+</sup> estimuladas con anti-CD23/CD28. Para identificarlas como Th17, se les adicionó citocinas que promueven su diferenciación (rIL-6, rIL- $\beta$ , rIL-23 e  $\alpha$ IFN- $\gamma$ ) al medio de cultivo por 3 días. Se tomó el sobrenadante y se re estimularon con anti-CD23/28. Al sexto día, se observó que el CLA suprimió la expresión de CD25, marcador de las células Th17, lo que no sucedió con el grupo control (Draper et al., 2014).

Asimismo, al CLA se le han adjudicado propiedades antiparasitarias. En un modelo murino de infección con *Plasmodium berghei* se demostró que la suplementación con CLA favoreció la resolución de la infección, con un aumento de la capacidad fagocítica y producción de anticuerpos. La parasitemia apareció al tercer día en los ratones suplementados, mientras que en el grupo control sólo el segundo día. Además, el tiempo de supervivencia incrementó 3 días en los animales tratados con CLA (Kumar et al., 2011).

Un estudio realizado en nuestro laboratorio por Puebla-Clark (2015), se utilizaron ratones de la cepa C3H/Hen infectados con *G. lamblia*. Un grupo fue suplementado con una mezcla de isómeros (50:50) cis-9, trans11 y trans-10, cis-12 de CLA y otro con búfer salinos de fosfatos como control para evaluar los efectos en la respuesta inmune innata. La infección se monitoreó durante 8 días. Se observó un número menor de trofozoítos en ratones suplementados con CLA comparado con el grupo control a los 6 dpi, caracterizado por ser el pico máximo de infección. Las células presentadoras de antígeno CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> se elevaron significativamente a los 3 días de iniciada la suplementación y disminuyeron a los 6 dpi. También, hubo una mayor cantidad de las células antiinflamatorias que expresaban el receptor CD206, en ratones suplementados con CLA (Puebla-Clark, 2015).

En el trabajo realizado por Bustamante-Córdova 2016, en el mismo modelo de infección, se evaluó el efecto del CLA en la respuesta adaptativa. Se observó un incremento en anticuerpos IgA-Giardia específica en extracto fecal al sexto día de la infección comparado con los demás dpi. Esto coincide con el día cuando se presentó el mayor número de trofozoítos. Sin embargo, hubo aumento significativo en IgA específica en los ratones suplementados con CLA 50:50 comparado con el grupo control (Bustamante-Córdova, 2016). Diversos estudios sugieren que IL-17A es necesaria para el transporte de IgA hacia el lumen de mucosas. Al igual que el aumento de IL-17A concuerda con el aumento de células Th17 (Dann et al., 2015). Sin embargo, también se le ha encontrado un aumento de anticuerpos IgA en la presencia de células Treg aún más efectivo que con otras células T CD4<sup>+</sup> (Cong et al., 2009).

En base a los resultados previos, podemos sugerir el efecto del CLA en células de la respuesta innata en la etapa temprana de la infección por *Giardia lamblia*, puede modular la respuesta de células T en la mucosa intestinal.



### III. HIPÓTESIS

El ácido linoleico conjugado (CLA) modificará la expresión de factores de transcripción, perfil de citocinas característicos de células Th17 y Treg y los cambios en mucosas de colon en ratones C3H/HeN infectados con *Giardia lamblia*.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo General

- Evaluar el efecto de la suplementación con CLA en la expresión de factores de transcripción y perfil de citocinas Th17 y Treg en un modelo murino de giardiasis.

### Objetivos Particulares

- Analizar la expresión de ARNm de los factores de transcripción y perfil de citocinas que identifican a las células Th17 y Treg en intestino.
- Cuantificar la producción de citocinas *ex vivo* Th17 y Treg en células de bazo.
- Evaluar los cambios en la mucosa intestinal en la etapa post eliminación del parásito.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1 Animales

Se emplearon 32 ratones machos de 8 a 10 semanas de edad, de la cepa C3H/HeN (Harlan Teklad, Madison, WI, EEUU). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de bioterio a temperatura constante de 22°C y 12 h de ciclos de luz u oscuridad (7.00 a 19.00h). Los tiempos de muestreo para el registro de peso de los ratones se realizaron los días 0, 6, 14 y 40 post infección. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, según lo establecido por la NOM-062-ZOO-1999. El protocolo de experimentación fue previamente aprobado por el Comité de Ética institucional del CIAD (CE/005/2012).

### V.2 Dieta y Tratamientos

Los ratones fueron alimentados con la formulación comercial Global Diet 18% de proteína (Harlan Teklad, Madison, WI, EEUU), que cumple con los requerimientos nutricionales del ratón. El alimento y agua se proporcionaron estériles y en demanda libre. Los ratones (n=16) se suplementaron con 50 mg de una mezcla 50:50 de isómeros de CLA, 9-cis, 11-trans y 10-trans, 12-cis (50:50) y el grupo control (n=16), con buffer salino de fosfatos (PBS) vía orogastrointestinal durante los tres días previos a la infección y a lo largo de 6

dpi, por medio de una sonda estéril (Instech, Solomon, EEUU) previamente sumergida en solución de sacarosa 1% (Bassaganya-Riera et al., 2012).

### V.3 Infección Experimental

Para el desafío inmunológico, los ratones se infectaron con trofozoítos de *Giardia lamblia* de la clona GS/M-83-H7 con una carga parasitaria de  $5 \times 10^6$ , administrada en 0.2 ml de PBS frío, por medio de una cánula de plástico para alimentación oral (Instech, Solomon, EEUU), el contenido se vació directamente a la entrada del intestino delgado.

### V.4 Obtención de Células de Intestino

El intestino delgado de cada ratón se dispuso en tubo cónico de 50 ml (Corning®, EEUU) con 15 ml de medio Hank's sin calcio y magnesio (HBSS) con antibióticos para su transporte. Se descartaron las placas de Peyer y se limpió el tejido sobrante. Se cortó en trozos de 10 cm aproximadamente que fueron abiertos longitudinalmente y almacenados en HBSS frío con antibióticos para su posterior procedimiento. El tejido fue cortado en segmentos de aproximadamente 1 cm y colocado en un tubo cónico de 50 ml con 15 ml de medio HBSS adicionado con EDTA 20 mM y 2% de suero fetal bovino a 37°C, el cual se incubó en agitación durante 15 minutos. Este procedimiento se realizó tres veces. Posteriormente, el tejido fue cortado en fragmentos de 0.5 cm y se dispuso en un tubo cónico de 50 ml (Corning®, EEUU) con 15 ml de RPMI adicionado con HEPES 20 mM y 5% de suero fetal bovino, se dejó reposando a 37°C durante 15 min. Se colocó el tejido en la solución enzimática (DNasa 4.25µg/ml y colagenasa 25µg/ml) y se incubó en agitación de 150 rpm en un agitador orbital, durante 1.5 h a 37°C. Se retiró el tejido mediante filtración con organza y el contenido filtrado se centrifugó a 329 g por 8 min a 25°C (Centrífuga

Beckman Coulter Allegra 6R, EEUU). El botón fue resuspendido y se añadieron 5 ml de medio RPMI suplementado para ser filtrado con triple organza y centrifugado nuevamente. Finalmente, se llevó a 1 ml de volumen final para el conteo celular en cámara de Neubauer.

#### V.5 Obtención de Células de Bazo

El bazo fue extraído y colocado en un tubo eppendorf (BD®, EEUU) con 1 ml de medio RPMI para su transporte. El bazo se cortó en 4 piezas, las cuales se pasaron a una placa de Petri con medio RPMI estéril, el tejido fue macerado con triple organza. El contenido fue colectado en un tubo cónico 50 ml (Falcon®, EEUU), se agregaron 5 ml de solución de lisis (Cloruro de amonio 150 mM, Bicarbonato de potasio 10 mM, EDTA 1mM) se dejó reposar 5 min para después agregar RPMI con SFB 10% para detener la lisis celular. Las células fueron centrifugadas a 329 g por 8 min a 4°C, se realizó un segundo lavado y las células fueron contadas en cámara de Neubauer.

#### V.6 Obtención de Extracto Soluble de *Giardia lamblia*

Se realizó la expansión de clones GS/M-83-H7 de *G. lamblia* por 72 h, *in vitro*, en medio TYI-S-33 de Keister (Keister, 1983). Los tubos de cultivo de 20 ml se incubaron en hielo por 30 min, se centrifugaron a 329 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se lavaron en dos ocasiones con PBS y se les agregó 100 µl de inhibidor de proteasas (SIGMA, EEUU). Se les indujo choque térmico a los trofozoítos por tres ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido. Después, se sonicó la suspensión con micro punta en frío a 40% output, y 7 ciclos de 10 s (Brandon sonifier 250, Shelton). La solución obtenida se centrifugó a 10 621 g por 30 min (Eppendorf Centrifuge 5417R, EEUU) y se recolectó el sobrenadante (Gottstein, et al., 1990; Velazquez et al., 2005; Kambda et al.,

2011). La concentración de proteínas se midió por método de ácido bicinonínico usando un sistema comercial (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, EEUU) según las instrucciones del fabricante.

#### V.7 Cuantificación de Citocinas por Inmunoensayo Ligado a Enzima (ELISA)

Se realizó un cultivo celular de las células obtenidas de bazo, se ajustó a  $2 \times 10^6$  células en cada pozo. Las células recibieron dos diferentes estímulos, un grupo con una mezcla de estimulación PMA/Ionomicina 1x (2µl/ml) (eBiosciences, EEUU), extracto soluble de *G. lamblia* (50µg/ml) y un grupo sin estímulo, en placas de 48 pozos. Se colectó el medio de cultivo y células en tubos de 1.5 ml (Eppendorf®, EEUU), y se centrifugó a 1300 g durante 5 min (Eppendorf Centrifuge 5417R, EEUU), se separó el sobrenadante en alícuotas y se almacenaron a -80°C para la posterior cuantificación de las citocinas TGF-β, IL-10, TNF-α, IL-6 e IL-17 por Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA) Ready Set-Go! (eBiosciences, EEUU) (Appel, 2005). Se cuantificó el número de células en cada botón celular proveniente de cada muestra se cuantificó y se resuspendió en 1 ml de TRizol® y se almacenó a -80°C para la posterior extracción de ARN total.

#### V. 8 Extracción de ARN Total de Células de Intestino y Bazo

Se extrajo el ARN de las muestras de  $3 \times 10^6$  células congeladas en Trizol® siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante. Las muestras fueron descongeladas y se les agregó 500 µl de cloroformo 99.5% (Sigma-Aldrich, USA). Se les dio una breve agitación por vórtice y se centrifugaron a 17 950 g (Eppendorf Centrifuge 5417R, EEUU) durante 10 min a 4°C. Posteriormente se extrajo la fase superior, sin perturbar la interfase, y se pasó a otro tubo. A la fase obtenida se le agregaron 200 µl de isopropanol 99.5% (Sigma-Aldrich, EEUU) y

se dejó en reposo durante 5 min. Después se centrifugó nuevamente a 17 950 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y el botón se resuspendió con la solución restante. Posteriormente, se agregó 1 ml de etanol (75%) y se centrifugaron las muestras a 17 950 g durante 10 min a 4°C. Para finalizar, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar con el tubo 1.5 ml durante 20 min aproximadamente. Finalmente se agregaron 40 µl de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del ARN total extraído fue medido mediante la absorbancia a 260 nm y la relación 260/280 en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EEUU).

#### V. 9 Cuantificación Relativa de Citocinas y Factores de Transcripción

Se amplificaron los ARNm de genes para citocinas y factores de transcripción característicos de las células Th17 y Treg (Tabla 1) por el método retrotranscripción y reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Para la detección y amplificación de las secuencias de ARNm se utilizó el sistema comercial Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Applied Biosystems, EEUU), 100 ng de ARN total y 200 nM de oligonucleótidos iniciadores sentido y antisentido (Tabla 1) en una mezcla de reacción de 25 µl. Las condiciones de amplificación usadas fueron un ciclo de 50°C por 30 min; 95°C por 10 min; y curva de disociación de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos y 60°C por 30 segundos. Se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para la cuantificación relativa, donde  $\Delta Ct$  representa la diferencia entre la expresión relativa de la muestra y el gen constitutivo, el cual fue  $\beta$ -Actina (Wang et al., 2012).

**Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos iniciadores**

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencias 5'-3'</b>	<b>Referencia</b>
<b>ROR<math>\gamma</math>T</b>	Fw GAACCAGAACAGGGTCCAGA Rv CGTAGAAGGTCTCCAGTCG	Dreesen et al., 2014
<b>FOXP3</b>	Fw GGCCCTTCTCCAGGACAGA Rv GCTGATCATGGCTGGGTTGT	Fontenot et al., 2003
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Fw TCGCTGATGCACTGCCTATG Rv GAGAGGTCCACAGAGCTGATT	Dai et al., 2013
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Fw CAGGTCCACTGTCTGCCTCT Rv TGTCATATCCCGGAGTTCA	Dai et al., 2013
<b>IL-17A</b>	Fw ACTACCTCAACCGTTCCACG Rv TTCCCTCCGCATTGACACAG	Dann et al., 2015
<b>IL-10</b>	Fw GCTAACCGACTCCTTAATGCAG Rv AGCTTCTCACCCAGGGAATT	Dreesen et al., 2014
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Fw TTGCTTCAGCTCCACAGAGA Rv TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC	Dreesen et al., 2014
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Fw TTCAGGCAGGCAGTATCA Rv CCAGCAGGTTATCATCATCATC	Zhang et al., 2012
<b>iNOS</b>	Fw CCACGGACGAGACGGATAG Rv TGGGAGGAGCTGATGGAGTAG	Zhang et al., 2012
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	Fw CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT Rv TGGGATAGAGGTCTTTACGG	Wang et al., 2012

#### V.10 Análisis Histológico de Colon

Se tomó un fragmento de 1.5 cm de colon ascendente. Las muestras de tejido se fijaron en solución de formaldehído al 10%. A partir del tejido fijado se realizaron los bloques en parafina, posteriormente se realizaron cortes de 3  $\mu$ m de espesor en micrótomo, se montaron 6 cortes por muestra en laminillas de vidrio y se sometieron a lavados con alcoholes para su desparafinización. Finalmente se tiñeron con el método hematoxilina-eosina para su posterior análisis histológico en microscopio de luz (procedimiento realizado por el Dr. Guillermo López Cervantes) (Dreesen et al., 2014).



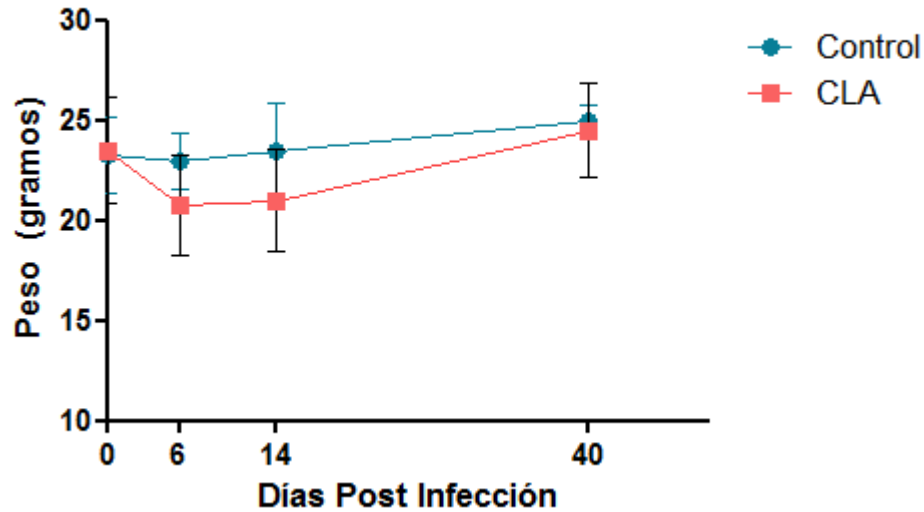
## V.11 Análisis Estadístico

Los resultados del registro de peso de los ratones y ELISA fueron analizados en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x4 con un número de muestra de 4 ratones por grupo. Siendo dos factores de tratamiento: control y CLA 50:50 y cuatro de tiempos infección: 0, 6, 14 y 40. Los resultados de cuantificación relativa con un arreglo factorial de 2x3. Tratamientos: control y CLA 50:50 y tiempos postinfección: 6, 14 y 40 con un número de muestra de 3 ratones por grupo. Para histología se realizó una puntuación la cual tuvo un arreglo factorial de 2x2 siendo dos tratamientos, descritos anteriormente y dos tiempos: 0 o preinfección y 40 dpi o posteliminación. Se consideró un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , y la comparación de medias se llevó a cabo por Tukey-Kramer. Se utilizó el programa NCSS 2007 para el procesamiento de los datos.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### VI.1 Curva de Crecimiento de Ratones Infectados con *Giardia lamblia*

Una vez realizada la infección experimental, se registró el peso de los ratones en cada tiempo de muestreo, como monitoreo general de la salud y el crecimiento de cada ratón el día pre infección 0 y a los 6, 14 y 40 dpi. No existió una diferencia significativa entre el peso del grupo suplementado con CLA y el control. En la figura 4 se observa una tendencia a aumento de peso en los ratones a los 40 dpi en ambos grupos ( $P=0.058$ ) ( $25 \pm 0.81$  y  $24.5 \pm 2.4$  g, respectivamente) por efecto de la infección. En la primera semana de infección existió un cambio en la cinética comparada con la reportada por el proveedor para la semana de edad correspondiente. Sin embargo, a los 14 dpi los ratones en ambos grupos recuperaron su peso de acuerdo a su edad. Según lo reportado por Byrd et al., en 1994, donde utilizaron ratones de la cepa C3H/HeN infectados con *G. lamblia*, no obtuvieron cambios significativos en el peso del ratón por efecto de la infección (Byrd et al., 1994). Recientemente, Iñigo-Figueroa et al. (2013) en un modelo de ratón CD-1 con giardiasis, tampoco observaron cambios entre el peso de los ratones infectados y no infectados. Sin embargo observaron un aumento de peso al finalizar la infección comparado al día inicial (Inigo-Figueroa et al., 2013).



**Figura 4.** Curva de crecimiento de ratones C3H/HeN infectados con *G. lamblia* del grupo control vs. CLA en los días 0, 6, 14 y 40. \*Indica diferencia significativa del efecto de tratamiento entre medias  $\pm$  DE ( $P < 0.05$ ).

#### VI. 2 Citocinas Cuantificadas por Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

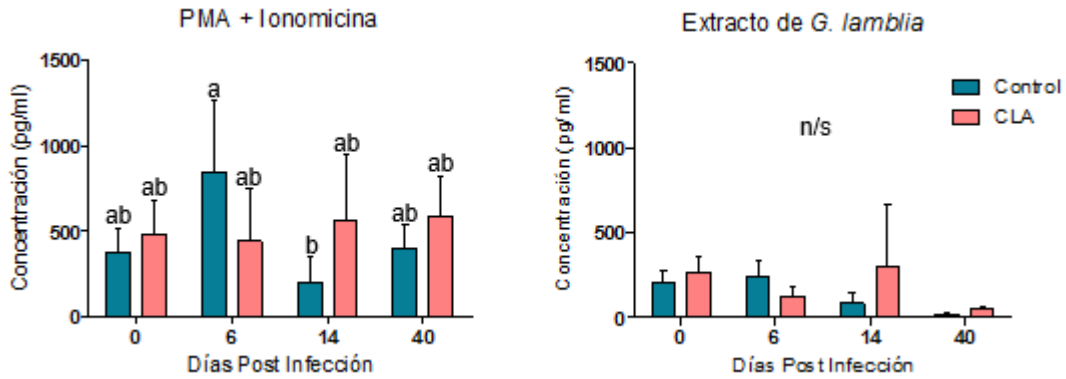
Para la cuantificación de producción de citocinas IL-6, IL-10, IL-17A, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y TGF- $\beta$  en sobrenadante de cultivo de células de bazo, se realizó un ELISA, pero sólo las primeras cuatro fueron detectables. Se restó la concentración final de citocinas en células cultivadas sin tratamiento a la del cultivo celular con estímulo PMA e ionomicina y con extracto soluble de *G. lamblia*.

La producción de IL-6 en células de bazo estimuladas con PMA incrementó a los 6 dpi en el grupo control por efecto de la interacción tiempo-tratamiento ( $P=0.05$ ) comparado a los 14 dpi del mismo grupo (figura 5a). En las células cultivadas con extracto de *G. lamblia* se observó una tendencia a incrementar a los 14 dpi en el grupo suplementado con CLA disminuyendo a los 40 dpi, esto por efecto de la infección ( $P=0.07$ ). Según lo reportado por Kamda et al. (2012), la producción de IL-6 por parte de las DC y otras células es necesaria para la inducción de células Th17 que a su vez producen IL-17A, relacionada con la

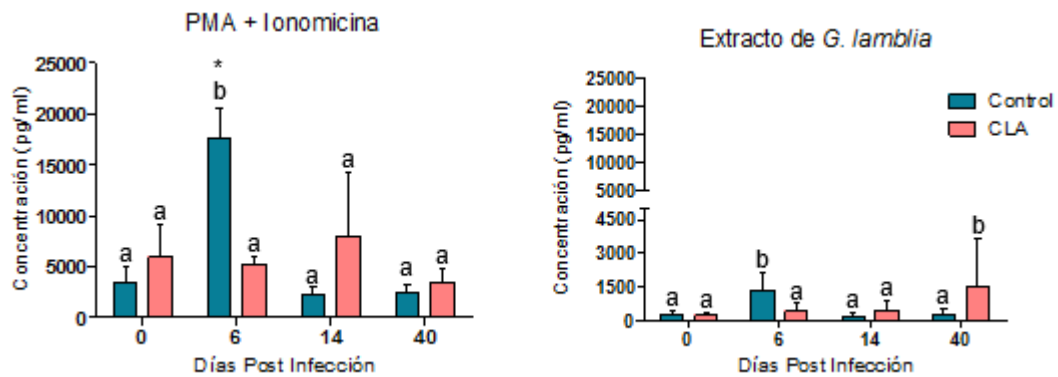
eliminación de *G. lamblia* (Kamda et al., 2012). Por lo que podríamos deducir que existe una respuesta contra la giardiasis. El cambio en la producción de IL-6 por la interacción de los factores podría tener consecuencias en el direccionamiento para la diferenciación de células T vírgenes.

La concentración de IL-10, citocina considerada antiinflamatoria, se elevó en células estimuladas con PMA e ionomicina a los 6 dpi en el grupo control comparado con el grupo suplementado con CLA y los demás dpi, esto por efecto de la interacción tiempo post infección-tratamiento ( $P < 0.001$ ) y de la infección ( $P < 0.001$ ) (figura 5b). En las células estimuladas con extracto de *G. lamblia*, la producción de IL-10 se encontró elevada a los 6 dpi en el grupo control y a los 40 dpi en el grupo suplementado con CLA, por efecto de interacción entre tiempo y tratamiento ( $P = 0.02$ ). El patrón de producción de IL-10 en respuesta al extracto de *G. lamblia*, concuerda con lo descrito por Jiménez et al., 2014, quienes evaluaron la respuesta inmune sistémica en ratones BALB/c infectados con *G. duodenalis* y reportaron un aumento gradual de IL-10 hasta a los 28 dpi (Jimenez et al., 2014). De igual forma, McCarthy et al. (2013), describieron que el CLA 80:20 incrementa la producción de IL-10 a nivel sistémico (McCarthy et al., 2013). Según nuestros resultados, se sugiere que hubo una regulación de la respuesta en giardiasis relacionada al efecto de la IL-10 sobre la producción de anticuerpos de tipo IgA de alta especificidad.

(a) IL-6



(a) IL-10

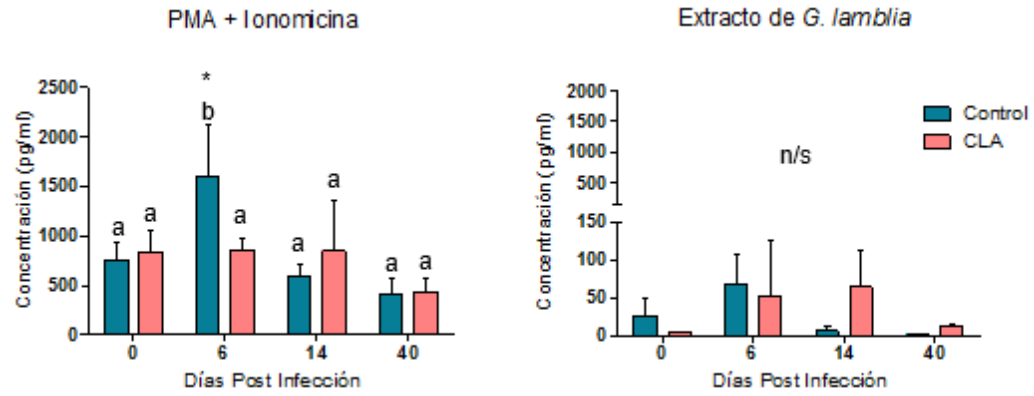


**Figura 5.** Producción de citocinas IL-6 (a) e IL-10 (b) *ex vivo* en sobrenadante de cultivo de células de bazo sin estímulo, estimuladas con PMA/ionomicina y con extracto de *Giardia lamblia* en ratones infectados con *G. lamblia* en grupo suplementado con CLA comparado con grupo control en días post infección 0, 6, 14 y 40. Los datos representan medias  $\pm$  DE. Literales<sup>ab</sup>: diferencia entre interacción tiempo-tratamiento ( $P < 0.05$ ) \*diferencia efecto tiempo ( $P < 0.05$ ).

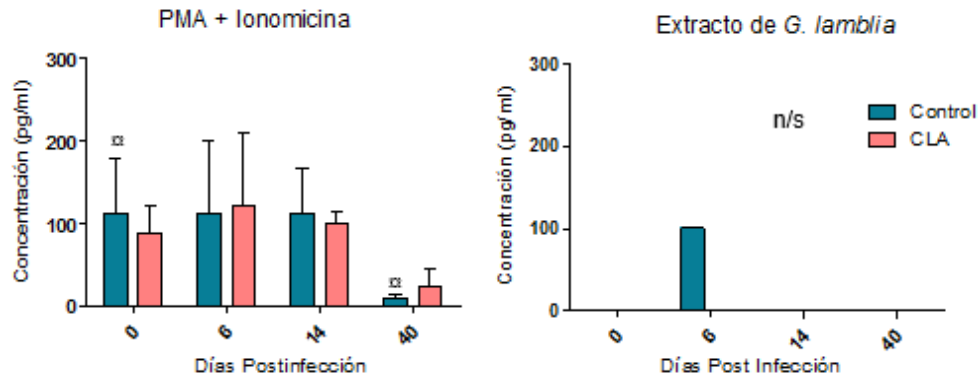
La producción de TNF- $\alpha$  (figura 6a), la cual induce la respuesta celular hacia patógenos, aumentó a los 6 dpi en las células estimuladas con mitógeno, provenientes del grupo control, por efecto de la interacción tiempo y tratamiento (P=0.01) y por la infección (P=0.0001). Mientras que en las estimuladas con *G. lamblia*, aunque se observa el mismo patrón de respuesta, no se observaron diferencias significativas. Por lo contrario Chen et al. (2013) observaron que en ratones infectados con *G. lamblia* el TNF-  $\alpha$  se incrementó a los 35 dpi, es decir en la etapa de eliminación de la infección (Chen et al., 2013). Esto podría deberse a las diferencias en la respuesta de las cepas de ratón y de *Giardia* empleadas.

Encontramos que la IL-17A, indispensable para el transporte de anticuerpos IgA de alta afinidad, (figura 6b) incrementó significativamente (P=0.006) los primeros dpi en ambos grupos, disminuyendo la producción en ambos grupos a los 40 dpi. No se encontraron diferencias entre tratamientos. Bassaganya-Riera et al. (2012), encontraron que en ratones suplementados con CLA 50:50, se elevó IL-17A en nódulos linfáticos mesentéricos y en bazo en un modelo de colitis (Bassaganya-Riera, Viladomiu, et al., 2012). En cambio, Draper et al. (2014), observaron que el CLA indujo la disminución en la producción de IL-17A *in vitro* en células de ratón derivadas de médula ósea estimuladas con péptido OVA (Draper et al., 2014). Nuestros resultados podrían haber diferido con lo anterior ya que el cultivo de células de bazo se realizó *ex vivo* con un desafío inmunológico diferente. En células cultivadas con extracto de *G. lamblia*, la citocina IL-17A sólo fue detectable al día 6 post infección en el grupo sinCLA.

**(a) TNF $\alpha$**



**(b) IL-17A**



**Figura 6.** Producción de citocina TNF $\alpha$  (a) e IL-17A (b) *ex vivo* en sobrenadante de cultivo de células de bazo sin estímulo, estimuladas con PMA/ionomicina y con extracto de *Giardia lamblia* en ratones infectados con *G. lamblia* en grupo suplementado con CLA comparado con grupo control en días post infección 0, 6, 14 y 40. Los datos representan medias  $\pm$  DE. Literales <sup>ab</sup> representan diferencia entre tiempos post infección interacción tiempo-tratamiento (P<0.05)

### VI. 3 Cuantificación Relativa de Factores de Transcripción y Citocinas en Intestino por RT-qPCR

Se midieron los niveles de expresión de las citocinas por RT-qPCR del 0, 6, 14 y 40 dpi de los factores de transcripción ROR $\gamma$ T, Foxp3, PPAR $\gamma$  y NF $\kappa$ B (figura 7) y de las citocinas IL-17A, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , iNOS (figura 8) e IL-6 en células de intestino. Para el cálculo de incremento relativo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  se normalizó cada gen con  $\beta$ -actina y se les restó a los 6, 14 y 40 dpi, el día 0 (o sin infección). La citocina IL-6 no amplificó correctamente, por lo que no se incluyó en los análisis. Los resultados fueron convertidos en logaritmo en base a 10 para la normalización de los datos.

En la figura 7a, podemos observar que no se encontró incremento significativo en la expresión de ROR $\gamma$ T por efecto de la infección. Mientras que en un estudio realizado por Dreesen et al., en 2014, reportaron que en ratones infectados con *G. muris* aumentó la expresión de ROR $\gamma$ T a los 5 dpi a causa de la enfermedad (Dreesen et al., 2014). Este efecto diferencial puede ser resultado del proceso infeccioso por *G. muris*, el cual la fase de eliminación es tardía en comparación con la *G. lamblia*. Por otro lado, en el grupo suplementado con CLA se elevó la expresión de ROR $\gamma$ T en comparación al control (P=0.04). Por contrario a lo reportado por Draper et al., en 2014, donde exponen que el CLA podría suprimir el direccionamiento hacia las Th17 en un modelo de inflamación inducida por lipopolisacáridos bacterianos, ya que el CLA fue capaz de inhibir citocinas proinflamatorias producidas por las DC (Draper et al., 2014). Estas diferencias con nuestros resultados podrían deberse a que, en el caso de infección causada por *G. lamblia*, se ha encontrado que las Th17 tienen un efecto protector en intestino (Dann et al., 2015). Previamente, en un trabajo realizado por Puebla-Clark (2015), se demostró que el CLA tuvo un efecto en la población de DC, se sugirió que favorecerían a la diferenciación hacia células Treg (Puebla-Clark, 2015). Contrario a esto, nuestros resultados mostraron que el CLA tuvo un efecto en la expresión de ROR $\gamma$ T de las células Th17.

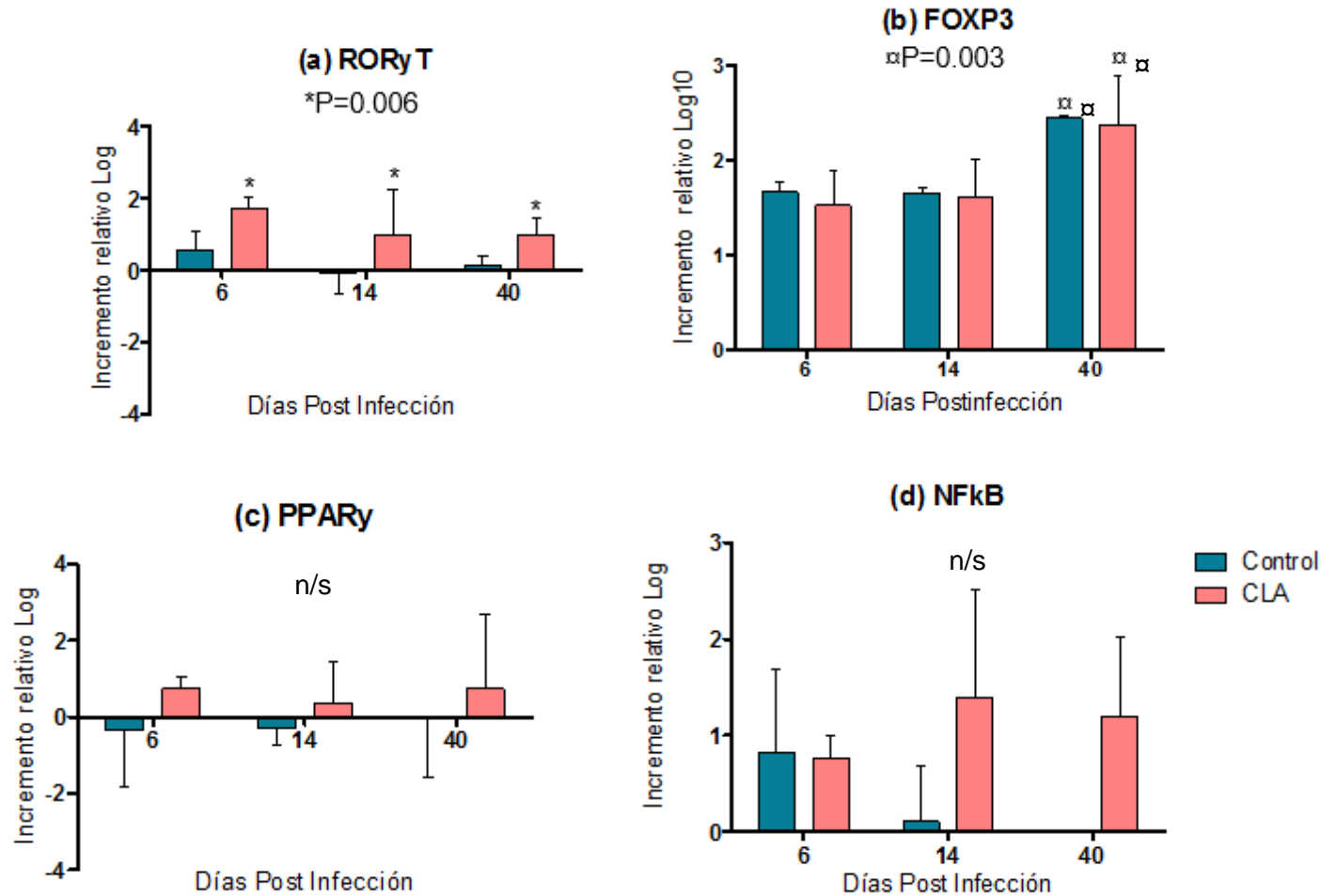


Por otro lado, la expresión de Foxp3 aumentó a los 40 dpi en ambos grupos comparado con el 6 y 14 dpi (figura 7b). De forma similar, el estudio realizado por Yahya et al. (2015), observaron que en humanos infectados con *G. lamblia* la población de células Treg Foxp3+ era mayor en comparación del grupo control. El incremento de la expresión de Foxp3 en nuestro estudio, indica indirectamente que después de la infección se favoreció la proliferación de Treg. Yahya et al. (2015) describieron que debido a esto, la giardiasis induce mínima inflamación en la mucosa intestinal tanto en humanos como en modelos murinos (Yahya et al., 2015). Por otro lado, el CLA no tuvo efecto en la expresión de Foxp3 en nuestro modelo, lo que indica que el transcurso de la infección indujo condiciones de tolerancia en la mucosa intestinal.

Como se observa en la figura 7c, no se encontraron diferencias en la expresión de PPAR $\gamma$  debido al transcurso de la infección, coincidiendo con lo reportado por Dreesen et al. (2014), donde no se observó incremento en la expresión de PPAR $\gamma$  en ratones infectados con *G. muris* durante las 3 semanas postinfección (Dreesen et al., 2014). De igual manera, no se presentó cambio en la expresión de PPAR $\gamma$  por efecto del CLA. Por lo contrario, Bassaganya-Riera et al. (2004), encontraron que la suplementación con CLA aumentó la expresión PPAR $\gamma$  en un modelo murino de colitis inducida con dextrán sulfato de sodio (Bassaganya-Riera et al., 2004). Se ha reportado que las células T que expresan PPAR $\gamma$  favorecen el reclutamiento de Treg en intestino lo que ayudaría a reducir la inflamación (Guri et al., 2010). Pero en este experimento, el desafío inmunológico de giardiasis no fue tan fuerte para inducir la inflamación. Esto concuerda con la falta de efecto de la suplementación con CLA sobre la diferenciación hacia células Treg.

En la figura 7d, encontramos que la expresión de NF $\kappa$ B no cambió significativamente por el transcurso de la infección o efecto del tratamiento. Sin embargo, trabajos previos en modelos de inflamación, han reportado que en ratones suplementados con CLA, se inhibe la expresión de NF $\kappa$ B y citocinas proinflamatorias (Dowling et al., 2013). Según lo reportado por Loschner et al. en

2005, el CLA disminuyó la expresión de NFκB y la producción de citocinas proinflamatorias en células de ratón BALB/c *in vitro* estimuladas con LPS (Loscher et al., 2005). Esto podría deberse al tipo de reto inmunológico al que fueron expuestas las células *in vitro*, mientras que en este trabajo se experimentó *ex vivo* con una suplementación directa al sujeto.



**Figura 7.** Incremento relativo de factores de transcripción (a) PPAR $\gamma$ , (b) ROR $\gamma$ T, (c) FOXP3 y (d) NF $\kappa$ B de células de intestino. Los resultados se compararon vs. día 0 y fueron normalizados a logaritmo. \*Indica diferencia significativa del efecto de tratamiento entre medias  $\pm$ DE ( $P < 0.05$ ). Los datos fueron normalizados a logaritmo en base a 10.

En la expresión de citocinas, se observó que la IL-17A (figura 8a), presentó un efecto marginalmente significativo de la infección al incrementar a los 6 dpi e ir disminuyendo gradualmente a los 14 y 40 dpi en grupo control ( $P=0.07$ ). De acuerdo a lo publicado por Dann et al., en 2015, al igual que en nuestro modelo, ratones infectados con *G. lamblia* alcanzaron el pico de la infección a la primera semana (Bustamante-Córdova, 2016; Puebla-Clark, 2015); concordando con el aumento de la expresión de IL-17A a los 5 dpi, la cual permaneció elevada a los 14 dpi (Dann et al., 2015). Por otro lado, se observó un aumento en la expresión del grupo suplementado con CLA ( $P=0.05$ ). No obstante, en un modelo murino de inflamación se encontró que la suplementación con CLA disminuyó la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL-17 (Draper et al., 2014). Según estudios recientes se ha descubierto que la IL-17A puede actuar como patológica o protectora, ya que es necesaria para el transporte de anticuerpos IgA hacia el lumen intestinal, indispensables para la eliminación de *G. lamblia* (Dann et al., 2015). El hallazgo sobre la inducción de IL-17 por el CLA, podría explicar en parte lo reportado por Bustamante-Córdova, en 2016, donde se demostró un aumento en anticuerpos IgA específicos para *G. lamblia* a los 6 dpi por efecto del CLA, comparado con el grupo control.

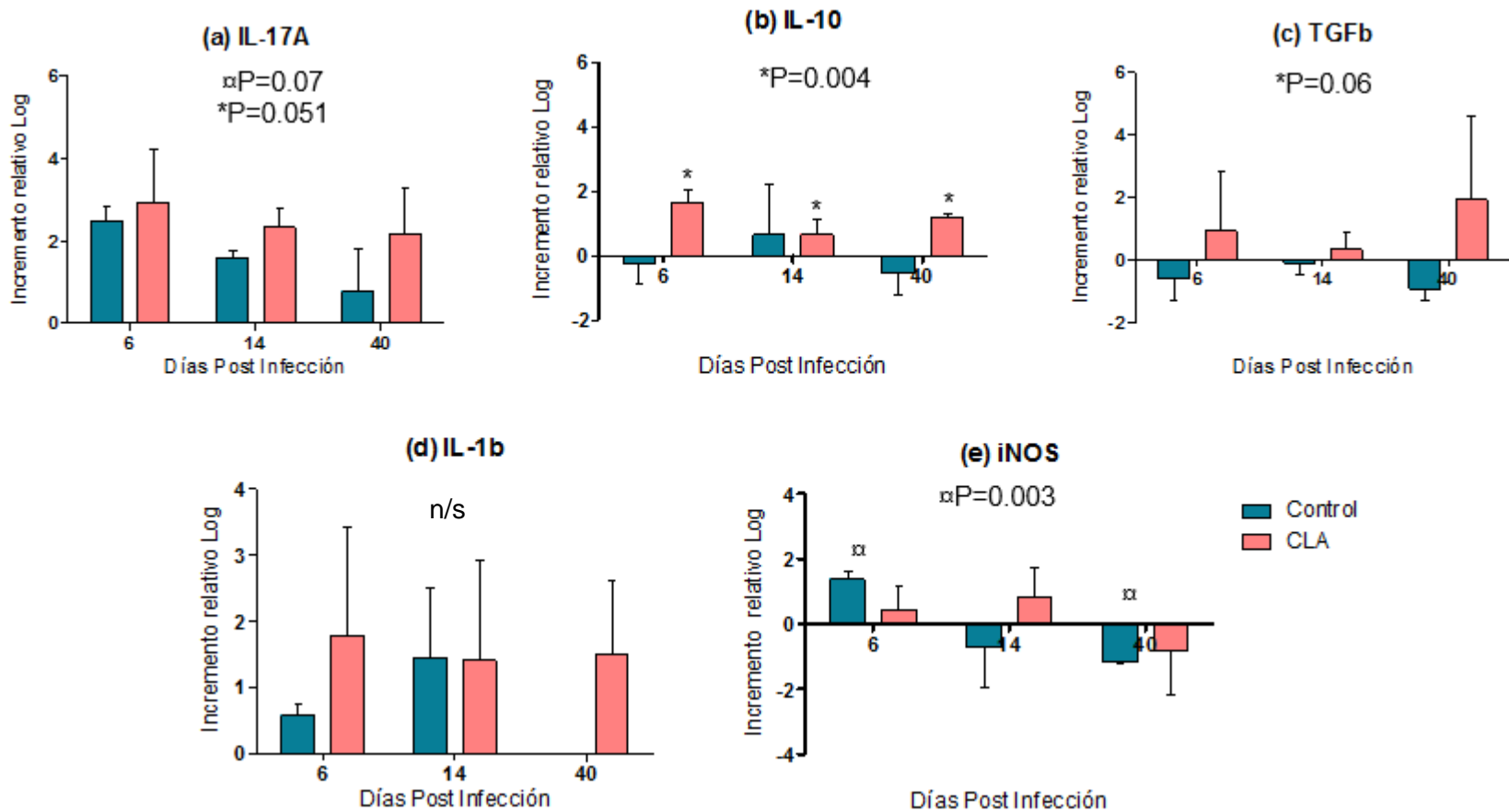
Con respecto al ARNm de IL-10, la infección no tuvo efecto significativo en su infección (figura 8b). Lo anterior coincide con Dressen, et al. (2014), quienes tampoco observaron un aumento en IL-10 en ratones infectados con *G. muris*, durante las 3 semanas postinfección. En cambio, en ratones suplementados con CLA de nuestro estudio, se observó un aumento en la expresión de IL-10 comparado con el grupo control ( $P=0.004$ ). Esto coincide con Reynolds et al., en 2009, donde se encontró que en ratones con inflamación intestinal inducida por LPS, a los que se les suministró una dieta alta en CLA c9-t11, aumentó la expresión de IL-10 a las 12 horas postestimulación (Reynolds et al., 2009). Se ha reportado que la IL-10 contrarresta la producción de citocinas proinflamatorias. En este caso, aunque el CLA aumentó la expresión de IL-17A, de igual manera indujo la producción de IL-10 para mantener el balance funcional

entre estas dos citocinas. Como se ha mencionado en otros estudios, también pueden existir otras fuentes de IL-17 en la mucosa intestinal (Dann et al., 2015).

A diferencia de lo observado por Dreesen et al., en 2014, en el presente estudio los niveles de expresión de TGF- $\beta$  no se modificaron significativamente en el transcurso de la infección (figura 8c). Sin embargo, los ratones suplementados con CLA mostraron una tendencia en el aumento de TGF- $\beta$  ( $P=0.06$ ). TGF- $\beta$  es importante para la diferenciación celular hacia Th17 (acompañada de IL-6) o de Treg por sí sola. Previamente se ha demostrado que la presencia de TGF- $\beta$  induce plasticidad en las células Th17 volviéndolas Treg<sup>exTh17</sup> productoras de IL-10 (Gagliani et al., 2015). Nuestros resultados sugieren que el CLA incrementó la expresión de TGF- $\beta$ , aunque el direccionamiento favoreciera la producción de IL-17, podría haber provocado la conversión de Th17 y la producción de IL-10 aun expresando ROR $\gamma$ t, esto podría explorarse en futuros estudios.

La infección no tuvo efecto sobre la expresión de IL-1 $\beta$  (figura 8d). La presencia de respuesta inflamatoria en giardiasis es controversial, estudios como el de Chen et al., 2013, observaron un incremento de IL-1 $\beta$  a los 35 dpi en intestino de ratones infectados por *G. lamblia* (Chen et al., 2013). Sin embargo, otros autores tampoco han encontrado aumentos de citocinas proinflamatorias en la etapa de eliminación del parásito (Dreesen et al., 2014).

En el caso de la enzima iNOS, los niveles de expresión disminuyeron a los 40 dpi en comparación de 6 dpi ( $P=0.003$ ), pero no se encontraron diferencias entre tratamiento con CLA y grupo control. Pinelli-Saavedra et al. (2015) en un modelo de infección viral con suplementación de CLA, no encontraron cambios en la expresión de iNOS, pero sí aumentó NF- $\kappa$ B y aumento en la producción de IL-10 por efecto del CLA, lo que coincide con nuestros hallazgos (Pinelli-Saavedra et al., 2015).

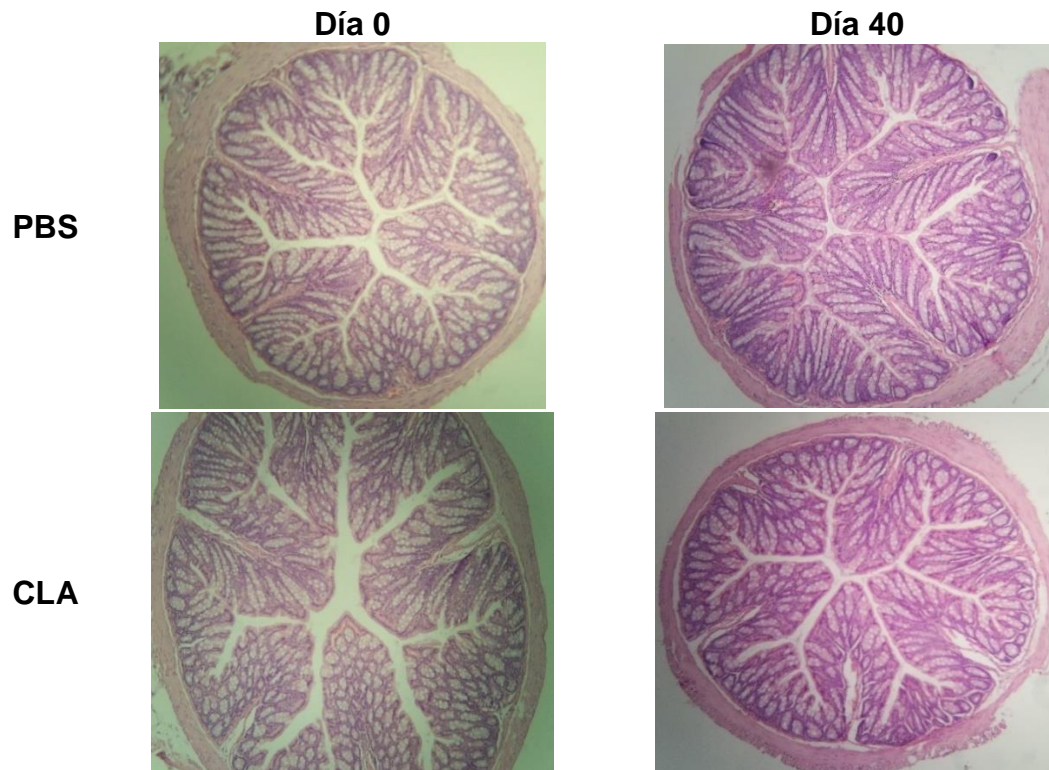


**Figura 8.** Incremento relativo de citocinas (a) IL-17A, (b) IL-10, (c) TGF- $\beta$ , (d) IL-1 $\beta$  y enzima iNOS (e) en células de intestino. Resultados comparados vs. día 0. \* Indica diferencia significativa del efecto de tratamiento entre medias  $\pm$ DE  $\alpha$ Diferencia entre tiempo postinfección ( $P < 0.05$ ). Los datos fueron transformados en logaritmo base a 10.

## VI. 4 Análisis Histológicos

Se tomaron muestras de colon ascendente al día 0 (preinfección) y a los 40 dpi (posteliminación) para evaluar los cambios en mucosa después de la expulsión de *G. lamblia*. El análisis del colon indica que ambos grupos de ratones no presentaron daños histológicos (figura 9). Del mismo modo, no se encontraron cambios significativos en mucosa colónica por efecto de la infección. Coincidiendo con lo reportado por Chen et al., en 2013 donde tampoco encontraron cambios en la morfología de la mucosa a los 35 dpi en ratones infectados con *G. lamblia*. En el estudio de Chen et al. (2013), para asegurarse de que no existiera daño en colon midieron la ocludina, componente esencial que otorga permeabilidad a las células epiteliales, la cual no presentó cambios entre ratones infectados y no infectados. No obstante, encontraron aumento en la permeabilidad del epitelio intestinal y otros marcadores de inflamación no evaluados en nuestro estudio (Chen et al., 2013).

Asimismo, con respecto a la arquitectura en la mucosa del colon no se encontraron cambios debido a la infección, ni al tratamiento entre ambos grupos en la etapa posteliminación. Las vellosidades intestinales mostraron un arreglo normal (Figura 9), sin cambios patológicos en la longitud de las mismas. En diversos estudios donde se han evaluado los cambios histológicos tanto en modelos murinos de colitis como en humanos suplementados con CLA, han encontrado que este posee un potente efecto antiinflamatorio (Bassaganya-Riera, et al., 2012; Evans et al., 2010). Considerando que, en ratones, el desafío inmunológico de colitis inducida promueve un estado inflamatorio severo en comparación con lo observado en la giardiasis, es muy probable que por esta razón no se mostraran cambios mayores en la mucosa de colon de nuestro modelo.



**Figura 9.** Microfotografías de cortes histológicos de colon en la etapa preinfección y posteliminación de ratones infectados con *G. lamblia* del grupo control comparado con suplementado con CLA a 10x (tinción con hematoxilina-eosina). (Realizada por el Dr. Guillermo López Cervantes).

Finalmente, encontramos que, en nuestro modelo de infección, *Giardia lamblia* indujo una respuesta intestinal local, con una activación temprana en la fase aguda que condujo a la expresión de iNOS e IL-17A y, en la etapa post eliminación, de FOXP3. La respuesta en bazo, evidenció la capacidad de las células de producir IL-6 y TNF- $\alpha$  posteriores a una reestimulación ex vivo, no así de IL-10. Por otra parte, la suplementación del CLA causó un aumento en la expresión de IL-17A, IL-10 y TGF- $\beta$  en intestino. Aunque no se observaron daños en la arquitectura del colon, el CLA tuvo efecto sobre la polarización de la respuesta de células T, la relación entre la expresión de citocinas tanto pro como antiinflamatoria, que pueden explicar su efecto antiparasitario. Se recomienda evaluar si estos hallazgos tienen relevancia clínica o fisiológica en la salud intestinal en la etapa post eliminación, y definir la contribución de las diversas poblaciones celulares en la producción de las citocinas evaluadas.



## VII. CONCLUSIÓN

El CLA promovió la expresión de un perfil transcripcional mixto Th17/Treg. Los niveles de expresión de FOXP3 fueron superiores a los de ROR $\gamma$ t por efecto de la infección por *Giardia*. El CLA moduló la expresión de ROR $\gamma$ t, IL-17A, IL-10 y TGF- $\beta$  en células de intestino, importantes para la eliminación de la *G. lamblia*. No se presentaron cambios patológicos en la mucosa en la etapa posteliminación, sin embargo, el CLA favoreció la producción de citocinas reguladoras, pudiendo esto contribuir al balance intestinal después de la respuesta inmune para eliminar al parásito.

## VIII. REFERENCIAS

1. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767
2. Bassaganya-Riera, J., Hontecillas-Magarzo, R., Bregendahl, K., Wannemuehler, M. J., & Zimmerman, D. R. (2001). Effects of dietary conjugated linoleic acid in nursery pigs of dirty and clean environments on growth, empty body composition, and immune competence. *J Anim Sci*, 79(3), 714-721.
3. Bassaganya-Riera, J., & Hontecillas, R. (2010). Dietary conjugated linoleic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13(5), 569-573. doi: Doi 10.1097/Mco.0b013e32833b648e
4. Bassaganya-Riera, J., Hontecillas, R., & Beitz, D. C. (2002). Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. *Clinical Nutrition*, 21(6), 451-459. doi: DOI 10.1054/clnu.2002.0594
5. Bassaganya-Riera, J., Hontecillas, R., Horne, W. T., Sandridge, M., Herfarth, H. H., Bloomfeld, R., & Isaacs, K. L. (2012). Conjugated linoleic acid modulates immune responses in patients with mild to moderately active Crohn's disease. *Clinical Nutrition*, 31(5), 721-727. doi: 10.1016/j.clnu.2012.03.002
6. Bassaganya-Riera, J., Reynolds, K., Martino-Catt, S., Cui, Y., Hennighausen, L., Gonzalez, F., Rohrer, J., Benninghoff, A. U., & Hontecillas, R. (2004). Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 127(3), 777-791.
7. Bassaganya-Riera, J., Viladomiu, M., Pedragosa, M., De Simone, C., Carbo, A., Shaykhtudinov, R., Jobin, C., Arthur, J. C., Corl, B. A., Vogel, H., Storr, M., & Hontecillas, R. (2012). Probiotic Bacteria Produce Conjugated Linoleic Acid Locally in the Gut That Targets Macrophage PPAR gamma to Suppress Colitis. *PLoS One*, 7(2). doi: ARTN e31238
8. DOI 10.1371/journal.pone.0031238
9. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., & Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235-238. doi: 10.1038/nature04753
10. Bluestone, J. A., & Abbas, A. K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, 3(3), 253-257.
11. Bustamante-Córdova. (2016). Efecto del Ácido Linoleico Conjugado en la Respuesta Inmune Adaptativa contra Giardia lamblia en ratones C3H/HEN. *Tesis de Maestría CIAD, A.C.*, 54.
12. Byrd, L. G., Conrad, J. T., & Nash, T. E. (1994). Giardia lamblia infections in adult mice. *Infect Immun*, 62(8), 3583-3585.

13. Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T. R., & Elson, C. O. (2009). A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(46), 19256-19261. doi: 10.1073/pnas.0812681106
14. Chen, Chen, S., Wu, H. W., Lee, T. C., Lu, Y. Z., Wu, L. L., Ni, Y. H., Sun, C. H., Yu, W. H., Buret, A. G., & Yu, L. C. (2013). Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice. *Gut Pathog*, *5*(1), 26. doi: 10.1186/1757-4749-5-26
15. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, *198*(12), 1875-1886. doi: 10.1084/jem.20030152
16. Chin, S. F., Storkson, J. M., Liu, W., Albright, K. J., & Pariza, M. W. (1994). Conjugated linoleic acid (9,11- and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. *J Nutr*, *124*(5), 694-701.
17. Dai, Y., Su, W., Ding, Z., Wang, X., Mercanti, F., Chen, M., Raina, S., & Mehta, J. L. (2013). Regulation of MSR-1 and CD36 in macrophages by LOX-1 mediated through PPAR-gamma. *Biochem Biophys Res Commun*, *431*(3), 496-500. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.029
18. Dann, S. M., Manthey, C. F., Le, C., Miyamoto, Y., Gima, L., Abraham, A., Cao, A. T., Hanson, E. M., Kolls, J. K., Raz, E., Cong, Y., & Eckmann, L. (2015). IL-17A promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite *Giardia*. *Exp Parasitol*, *156*, 68-78. doi: 10.1016/j.exppara.2015.06.003
19. Dowling, J. K., McCoy, C. E., Doyle, S. L., BenLarbi, N., Canavan, M., O'Neill, L. A., & Loscher, C. E. (2013). Conjugated linoleic acid suppresses IRF3 activation via modulation of CD14. *J Nutr Biochem*, *24*(5), 920-928. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.06.010
20. Draper, E., DeCoursey, J., Higgins, S. C., Canavan, M., McEvoy, F., Lynch, M., Keogh, B., Reynolds, C., Roche, H. M., Mills, K. H., & Loscher, C. E. (2014). Conjugated linoleic acid suppresses dendritic cell activation and subsequent Th17 responses. *J Nutr Biochem*, *25*(7), 741-749. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.03.004
21. Draper, E., Reynolds, C. M., Canavan, M., Mills, K. H., Loscher, C. E., & Roche, H. M. (2011). Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF-kappaB independent of PPARgamma. *J Nutr Biochem*, *22*(8), 784-790. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.06.009
22. Dreesen, L., De Bosscher, K., Grit, G., Staels, B., Lubberts, E., Bauge, E., & Geldhof, P. (2014). *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective interleukin 17A response and induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Infect Immun*, *82*(8), 3333-3340. doi: 10.1128/IAI.01536-14
23. Duhon, R., Glatigny, S., Arbelaez, C. A., Blair, T. C., Oukka, M., & Bettelli, E. (2013). Cutting edge: the pathogenicity of IFN-gamma-producing Th17 cells is independent of T-bet. *J Immunol*, *190*(9), 4478-4482. doi: 10.4049/jimmunol.1203172
24. Evans, N. P., Misyak, S. A., Schmelz, E. M., Guri, A. J., Hontecillas, R., & Bassaganya-Riera, J. (2010). Conjugated Linoleic Acid Ameliorates Inflammation-Induced Colorectal Cancer in Mice through Activation of PPAR gamma. *Journal of Nutrition*, *140*(3), 515-521. doi: DOI 10.3945/jn.109.115642
25. Faubert, G. (2000). Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*, *13*(1), 35-54. doi: 10.1128/cmr.13.1.35-54.2000
26. FDA. GRN 232. Conjugated linoleic acid isomers, filed by Lipid Nutrition B.V. and Cognis. Date of disclosure, July11, 2008.

27. Fonseca, D., Benevides, L., Souza, M. D., Bonfa, G., Solano-Dias, M., Basso, A., Silva, N., Mineo, T., Ryffel, B., & Silva, J. (2012). Th17, Th22 and regulatory T cells are essential for controlling parasite burden and mucosal inflammation during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol*, *188*.
28. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-336.
29. Gagliani, N., Vesely, M. C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N. W., de Zoete, M. R., Licona-Limon, P., Paiva, R. S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L. X., Cotton, M. J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., Stockinger, B., Esplugues, E., Huber, S., & Flavell, R. A. (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*. doi: 10.1038/nature14452
30. Guri, A. J., Mohapatra, S. K., Horne, W. T., 2nd, Hontecillas, R., & Bassaganya-Riera, J. (2010). The role of T cell PPAR gamma in mice with experimental inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol*, *10*, 60. doi: 10.1186/1471-230X-10-60
31. Ha, Y. L., Grimm, N. K., & Pariza, M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, *8*(12), 1881-1887.
32. Haribhai, D., Lin, W., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Salzman, N. H., Carlson, M. R., Li, S. H., Simpson, P. M., Chatila, T. A., & Williams, C. B. (2009). A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J Immunol*, *182*(6), 3461-3468. doi: 10.4049/jimmunol.0802535
33. Haribhai, D., Williams, J. B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E. G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S. H., Relland, L. M., Wise, P. M., Chen, A., Zheng, Y. Q., Simpson, P. M., Gorski, J., Salzman, N. H., Hessner, M. J., Chatila, T. A., & Williams, C. B. (2011). A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity*, *35*(1), 109-122. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.029
34. Hayek, M. G., Han, S. N., Wu, D., Watkins, B. A., Meydani, M., Dorsey, J. L., Smith, D. E., & Meydani, S. N. (1999). Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice. *J Nutr*, *129*(1), 32-38.
35. Hermann-Kleiter, N., & Baier, G. (2010). NFAT pulls the strings during CD4(+) T helper cell effector functions. *Blood*, *115*(15), 2989-2997. doi: 10.1182/blood-2009-10-233585
36. Hirota, K., Martin, B., & Veldhoen, M. (2010). Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol*, *32*(1), 3-16. doi: 10.1007/s00281-009-0187-y
37. Inigo-Figueroa, G., Mendez-Estrada, R. O., Quihui-Cota, L., Velasquez-Contreras, C. A., Garibay-Escobar, A., Canett-Romero, R., & Astiazaran-Garcia, H. (2013). Effects of dietary zinc manipulation on growth performance, zinc status and immune response during *Giardia lamblia* infection: a study in CD-1 mice. *Nutrients*, *5*(9), 3447-3460. doi: 10.3390/nu5093447
38. Iwami, D., Nonomura, K., Shirasugi, N., & Niimi, M. (2011). Immunomodulatory effects of eicosapentaenoic acid through induction of regulatory T cells. *Int Immunopharmacol*, *11*(3), 384-389. doi: 10.1016/j.intimp.2010.11.035
39. Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, *20*, 197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
40. Jimenez, J. C., Fontaine, J., Creusy, C., Fleurisse, L., Grzych, J. M., Capron, M., & Dei-Cas, E. (2014). Antibody and cytokine responses to *Giardia* excretory/secretory proteins in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Parasitol Res*, *113*(7), 2709-2718. doi: 10.1007/s00436-014-3927-4

41. Kamda, J. D., Nash, T. E., & Singer, S. M. (2012). Giardia duodenalis: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Exp Parasitol*, 130(3), 288-291. doi: 10.1016/j.exppara.2012.01.003
42. Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J. I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., & Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 66(3), 390-402. doi: 10.1002/ana.21748
43. Kepler, C. R., Hirons, K. P., McNeill, J. J., & Tove, S. B. (1966). Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem*, 241(6), 1350-1354.
44. Keswani, T., & Bhattacharyya, A. (2014). Differential role of T regulatory and Th17 in Swiss mice infected with Plasmodium berghei ANKA and Plasmodium yoelii. *Exp Parasitol*, 141, 82-92. doi: 10.1016/j.exppara.2014.03.003
45. Kimura, A., & Kishimoto, T. (2011). Th17 cells in inflammation. *Int Immunopharmacol*, 11(3), 319-322. doi: 10.1016/j.intimp.2010.10.004
46. Langrish, C. L., McKenzie, B. S., Wilson, N. J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A., & Cua, D. J. (2004). IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*, 202, 96-105. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00214.x
47. Li, J., Lai, X., Liao, W., He, Y., Liu, Y., & Gong, J. (2011). The dynamic changes of Th17/Treg cytokines in rat liver transplant rejection and tolerance. *Int Immunopharmacol*, 11(8), 962-967. doi: 10.1016/j.intimp.2011.02.010
48. Loscher, C. E., Draper, E., Leavy, O., Kelleher, D., Mills, K. H., & Roche, H. M. (2005). Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *J Immunol*, 175(8), 4990-4998.
49. Luján, H. D., & Svärd, S. (2011). *Giardia : a model organism*. Wien ; New York: Springer.
50. McCarthy, C., Duffy, M. M., Mooney, D., James, W. G., Griffin, M. D., Fitzgerald, D. J., & Belton, O. (2013). IL-10 mediates the immunoregulatory response in conjugated linoleic acid-induced regression of atherosclerosis. *Faseb Journal*, 27(2), 499-510. doi: 10.1096/fj.12-215442
51. Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819-826. doi: 10.1038/nature06246
52. Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R., & Heath, W. R. (2013). Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol*, 31, 137-161. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095954
53. O'Shea, M., Bassaganya-Riera, J., & Mohede, I. C. M. (2004). Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 1199s-1206s.
54. Pang, N., Zhang, F., Ma, X., Zhu, Y., Zhao, H., Xin, Y., Wang, S., Chen, Z., Wen, H., & Ding, J. (2014). TGF-beta/Smad signaling pathway regulates Th17/Treg balance during Echinococcus multilocularis infection. *Int Immunopharmacol*, 20(1), 248-257. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.038
55. Pinelli-Saavedra, A., Peralta-Quintana, J. R., Sosa-Castaneda, J., Moya-Camarena, S. Y., Burgara-Estrella, A., & Hernandez, J. (2015). Dietary conjugated linoleic acid and its effect on immune response in pigs infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Res Vet Sci*, 98, 30-38. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.12.007
56. Puebla-Clark, L. d. C. (2015). Efecto Inmuno-Modulador del Ácido Linoleico Conjugado en la Respuesta Inmune Innata Intestinal en un Modelo Murino de Giardiasis. *Tesis de Maestría CIAD, A.C.*, 54.
57. Ramirez-Santana, C., Castellote, C., Castell, M., Rivero, M., Rodriguez-Palmero, M., Franch, A., & Perez-Cano, F. J. (2009). Long-term feeding of the cis-9,trans-11

- isomer of conjugated linoleic acid reinforces the specific immune response in rats. *J Nutr*, 139(1), 76-81. doi: 10.3945/jn.108.097428
58. Reynolds, C. M., Draper, E., Keogh, B., Rahman, A., Moloney, A. P., Mills, K. H., Loscher, C. E., & Roche, H. M. (2009). A conjugated linoleic acid-enriched beef diet attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in mice in part through PPARgamma-mediated suppression of toll-like receptor 4. *J Nutr*, 139(12), 2351-2357. doi: 10.3945/jn.109.113035
  59. Rohrer, L., Winterhalter, K. H., Eckert, J., & Kohler, P. (1986). Killing of *Giardia lamblia* by human milk is mediated by unsaturated fatty acids. *Antimicrob Agents Chemother*, 30(2), 254-257.
  60. Saghaug, C. S., Sornes, S., Peirasmaki, D., Svard, S., Langeland, N., & Hanevik, K. (2016). Human Memory CD4+ T Cell Immune Responses against *Giardia lamblia*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(1), 11-18. doi: 10.1128/Cvi.00419-15
  61. Scott, C. L., Aumeunier, A. M., & Mowat, A. M. (2011). Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol*, 32(9), 412-419. doi: 10.1016/j.it.2011.06.003
  62. Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., & Pamer, E. G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, 19(1), 59-70.
  63. Singer, S. M., & Nash, T. E. (2000). T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*, 68(1), 170-175.
  64. Solaymani-Mohammadi, S., & Singer, S. M. (2010). *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp Parasitol*, 126(3), 292-297. doi: 10.1016/j.exppara.2010.06.014
  65. Travis, M. A., & Sheppard, D. (2014). TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*, 32, 51-82. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120257
  66. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179-189. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001
  67. Wang, Xiang, Y., Cui, Y. L., Lin, K. M., & Zhang, X. F. (2012). Dietary blue pigments derived from genipin, attenuate inflammation by inhibiting LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the NF-kappaB inactivation. *PLoS One*, 7(3), e34122. doi: 10.1371/journal.pone.0034122
  68. Wang, Z., Friedrich, C., Hagemann, S. C., Korte, W. H., Goharani, N., Cording, S., Eberl, G., Sparwasser, T., & Lochner, M. (2014). Regulatory T cells promote a protective Th17-associated immune response to intestinal bacterial infection with *C. rodentium*. *Mucosal Immunol*, 7(6), 1290-1301. doi: 10.1038/mi.2014.17
  69. Weaver, C. T., Elson, C. O., Fouser, L. A., & Kolls, J. K. (2013). The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annu Rev Pathol*, 8, 477-512. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130318
  70. Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., & Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24(6), 677-688. doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.002
  71. Williamson, A. L., O'Donoghue, P. J., Upcroft, J. A., & Upcroft, P. (2000). Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice. *Int J Parasitol*, 30(2), 129-136.
  72. Wu, R. Q., Zhang, D. F., Tu, E., Chen, Q. M., & Chen, W. (2014). The mucosal immune system in the oral cavity-an orchestra of T cell diversity. *Int J Oral Sci*, 6(3), 125-132. doi: 10.1038/ijos.2014.48

73. Xu, S., & Cao, X. (2010). Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol*, 7(3), 164-174. doi: 10.1038/cmi.2010.21
74. Yahya, R. S., Fahmida, K., Awad, S. I., Abousamra, N. K., Hanan, A., Gehan, A., El-Baz, H. A., Rokaiah, A., & Mona, A. (2015). Natural Regulatory T Cells in Some Parasitic Diseases. *Bacteriology & Parasitology*, 6(1), 4.
75. Zhang, H., Guo, Y., & Yuan, J. (2005). Effects of conjugated linoleic acids on growth performance, serum lysozyme activity, lymphocyte proliferation, and antibody production in broiler chicks. *Arch Anim Nutr*, 59(5), 293-301. doi: 10.1080/17450390500247808
76. Zhang, H., Hu, X., Liu, X., Zhang, R., Fu, Q., & Xu, X. (2012). The Treg/Th17 imbalance in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice. *Am J Reprod Immunol*, 67(2), 112-121. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01065.x
77. Zheng, S. G., Wang, J., Wang, P., Gray, J. D., & Horwitz, D. A. (2007). IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol*, 178(4), 2018-2027.
78. Zhou, P., Li, E., Zhu, N., Robertson, J., Nash, T., & Singer, S. M. (2003). Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*, 71(3), 1566-1568.