



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**MODULACIÓN DEL DESARROLLO DE LA COLITIS
EXPERIMENTAL POR ANTÍGENOS EXCRETADOS/SECRETADOS
DE *Taenia crassiceps***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

DULCE MARÍA MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio ocho de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Durante la realización de este trabajo se contó con financiamiento parcial por parte del PAPIIT. Número de proyecto: IN213512. Así como una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Número de proyecto: 167799.

DEDICATORIAS

A mis papás, a quienes les agradezco por el apoyo que desde siempre me han brindado, ya que sin ellos no hubiese sido posible llegar hasta donde estoy. A mi Mamá que siempre ha estado cuando la necesito, siempre haciéndome reír, gracias “ma”. A mi Papá que siempre ha sido y seguirá siendo mi mejor ejemplo, ya que siempre me motiva a seguir adelante, gracias.

A mi hermano que a pesar de todo, sé que siempre va a estar ahí para apoyarme en lo que necesite al igual que yo estaré.

Y a mis abuelitos, que aunque ya no estén aquí, siempre han sido un motor para cumplir mis metas.

A mis amigas, que me han acompañado en diferentes etapas de mi vida, sobre todo a Ines que siempre ha estado ahí apoyándome y motivándome a salir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Luis Ignacio Terrazas Valdés por brindarme la oportunidad de participar en el proyecto.

A la Dra. Yadira Ledesma Soto, por ayudarme a realizar este trabajo con sus enseñanzas y apoyo.

A mis sinodales:

Martha Ofelia Salcedo Álvarez
Elvia Manuela Gallegos Neyra
Miriam Rodríguez Sosa
Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Por tomarse el tiempo para la revisión del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por sus consejos y apoyo.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
Respuesta inmune en el intestino	8
Enfermedades inflamatorias intestinales	11
Colitis ulcerativa	13
Modelo de colitis experimental inducida por DSS	14
Hipótesis de la higiene	15
Inmunomodulación por parásitos helmintos	16
<i>Taenia crassiceps</i>	18
Inmunomodulación por <i>Taenia crassiceps</i>	19
Regulación por antígenos excretados/secretados de <i>Taenia crassiceps</i>	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
Objetivo General	25
Objetivos particulares	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Material Biológico de Referencia	26
Inducción de la colitis experimental	26
Obtención y administración del antígeno TcES	26
Evaluación del modelo de colitis experimental	26
Análisis histológico	27
Cuantificación de citocinas en suero	27
Citometría de flujo de células de exudado peritoneal	28
Análisis moleculares	28
Electroforesis	29
Citometría de flujo de células de lámina propia (monocitos y neutrófilos)	29
Análisis Estadístico	30
RESULTADOS	31

Pérdida de peso (%)	31
Índice de actividad de la enfermedad (IAE)	32
Longitud de colon	33
Análisis histológico (H&E y Alcian Blue)	34
Niveles de citocinas en suero	36
Citometría de flujo de células de exudado peritoneal	37
Presencia de MAA por RT-PCR	39
Presencia de monocitos y neutrófilos en intestino por Citometría de flujo	40
Depósito de colágena	42
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	51
ANEXOS	52
REFERENCIAS	55

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
Arg-1	Arginasa-1
Breg's	Células B reguladoras
CD's	Células dendríticas
CDi	Células dendríticas inmaduras
CEI	Células epiteliales intestinales
CI	Colitis indeterminada
CU	Colitis ulcerativa
DSS	Dextran sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
EII	Enfermedades inflamatorias intestinales
IAE	Índice de actividad de la enfermedad
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (sintasa de óxido nítrico inducible)
i.p.	Intraperitoneal
LP	Lámina propia
LPS	Lipopolisacáridos

MAA	Macrófagos alternativamente activados
MCA	Macrófagos clásicamente activados
MDSC's	Myeloid-derived suppressor cells (células mieloides supresoras)
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad II
MLDS	Múltiples dosis bajas de estreptozotocina
MΦ's	Macrófagos
ON	Óxido nítrico
PD-1	Programmed death receptor 1 (receptor de muerte programada)
PD-L1, PD-L2	Programmed death ligand 1 y 2 (ligando del receptor PD-1)
EAE	Encefalomielitis autoinmune experimental
PGE2	Prostaglandina E2
PMAP	Patrones moleculares asociados a patógenos
RAPP	Receptores activados por peroxisomas
Relm-α	Resistin-like molecule alfa (molécula similar a resistina)
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction (transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa)
SM	Submucosa
Tc/ES	Antígeno excretado/secretado de <i>Taenia crassiceps</i>
TFG-β	Transforming growth factor beta (factor de crecimiento transformante beta)
Th1	T helper 1 (células T cooperadoras tipo 1)
Th2	T helper 2 (células T cooperadoras tipo 2)

TLR's	Tol-like receptors (receptores tipo toll)
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha (factor de necrosis tumoral alfa)
Treg's	Células T reguladoras

RESUMEN

Las infecciones por parásitos helmintos inducen una respuesta inmune tipo Th2, la cual se caracteriza por eosinofilia y mastocitosis, así como niveles elevados de IL-4, IL-5, IL-13, IgG1 e IgE; que se han asociado a efectos inmuno-reguladores, tales como una inhibición de la respuesta proliferativa antígeno-específica, polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 con otros antígenos, parásitos o vacunas. Estas infecciones también inducen una población de macrófagos alternativamente activados (MAA) con la capacidad de suprimir la respuesta proliferativa y secreción de citocinas de células T activadas de una manera dependiente de la expresión de las moléculas PD-L1 y PD-L2. Estos mecanismos son utilizados por estos parásitos para evadir la respuesta inmune de su hospedero con el propósito de sobrevivir y así completar su ciclo de vida. Dichos mecanismos son tan fuertes que no sólo permiten el crecimiento de estos parásitos de manera exitosa, sino que también pueden regular o inhibir el desarrollo de enfermedades autoinmunes y/o alérgicas. La colitis ulcerativa es una patología de carácter inflamatorio que se caracteriza por una fuerte respuesta tipo Th1 afectando principalmente la mucosa del colon y recto. Recientemente se ha encontrado que antígenos de *Taenia crassiceps* pueden modular la activación y maduración de las células dendríticas. En el presente trabajo se determinó el efecto inmuno-regulador de los antígenos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* (TcES) durante el desarrollo de la colitis experimental inducida con dextran sulfato de sodio (DSS). Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de ocho a nueve semanas de edad, a los cuales se les indujo colitis experimental mediante la administración oral de DSS al 4%; posteriormente se les inoculó diariamente 200 µg de TcES vía intra-peritoneal durante nueve días. Los resultados muestran que la administración del TcES durante el desarrollo de la colitis experimental, reduce los signos característicos de la enfermedad, como son la pérdida de peso, el sangrado rectal y la diarrea; además se mantiene la longitud del colon y ciego. A nivel histológico se observó un menor infiltrado celular en el grupo tratado con TcES, pero se mantuvo la arquitectura del colon, a diferencia del grupo con DSS. No se observaron diferencias marcadas en depósitos de colágena entre los grupos TcES y el grupo control; mientras que se observó una disminución de células caliciformes en el grupo DSS. Lo anterior se asoció a una disminución de las citocinas pro inflamatorias TNF- α e IL-1 β en el grupo DSS+TcES; además se detectó un aumento significativo en la producción de IL-4 en este mismo grupo de animales, comparado con el grupo control y grupo DSS. Encontramos que el tratamiento con TcES disminuyó el

infiltrado de neutrófilos y de monocitos en el colon. La presencia de MAA se determinó por los marcadores Arg-1 y Ym-1, los cuales fueron detectados por RT-PCR en el tejido del colon del grupo DSS+TcES, además en este grupo se expresó también el marcador IL-10 (Th2). Se concluye que la administración del TcES durante la inducción de la colitis experimental modula su desarrollo mediante la inhibición de una respuesta inflamatoria hacia una anti-inflamatoria o tipo Th2, así como la activación de ciertas poblaciones celulares como los MAA, mientras que disminuye el infiltrado de otras poblaciones celulares como los monocitos y neutrófilos, todo esto como parte de un conjunto de mecanismos de inmuno-regulación.

INTRODUCCIÓN

Respuesta inmune en el intestino

El sistema inmune del intestino comprende una parte importante del sistema inmune general, ya que se encarga de distinguir entre patógenos invasivos y antígenos inocuos de la dieta y de las bacterias comensales, permitiendo la entrada de nutrientes y a su vez bloqueando el paso a agentes patógenos (Ramiro-Puig *et al*; 2008).

Debido a que el intestino se encuentra en una continua interacción con diferentes antígenos, inocuos o no, cuenta con varios mecanismos de defensa para bloquear el paso a agentes dañinos para el organismo.

El principal mecanismo de defensa, es la barrera intestinal, compuesta por una membrana llamada mucosa intestinal, principal barrera mecánica que separa al organismo del ambiente luminal, colonizada por la microbiota bacteriana. Estas bacterias, junto con las células locales del sistema inmune desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal estableciendo una interacción molecular constante; la cual es importante ya que evita una respuesta exacerbada por parte del huésped en contra de antígenos propios de la dieta o de la microbiota, lo cual podría ocasionar procesos de respuesta inmune descontrolados, tales como las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) (Guarner, 2007; Maloy y Powrie, 2011).

El mantenimiento de una respuesta inmune equilibrada depende tanto de células del sistema inmune innato como del adaptativo. Dentro de las células que participan durante la respuesta inmune innata se encuentran principalmente macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, así como diferentes tipos de células epiteliales intestinales (CEI), como enterocitos, células caliciformes, células entero-endocrinas y células de Paneth, respondiendo de manera coordinada para mantener una respuesta equilibrada hacia la microbiota del huésped (Harrison y Maloy, 2011; Maloy y Powrie, 2011).

Esta respuesta, al estar mediada por un conjunto de células especializadas puede distinguir entre las bacterias comensales del tracto gastrointestinal y los patógenos, siendo capaz de inducir una respuesta pro-inflamatoria en contra de estos sin dejar de ser sensibles a la microbiota y a los antígenos propios de la dieta (Kayama *et al.*, 2013).

La mucosa intestinal consiste en una capa de células epiteliales intestinales, las cuales se encuentran cubiertas por una capa espesa de moco, la cual comprende una capa exterior de mucinas y una capa interna llamada glicocáliz, que son mucinas ancladas a la membrana, ambas secretadas por las células caliciformes (Fig.1).

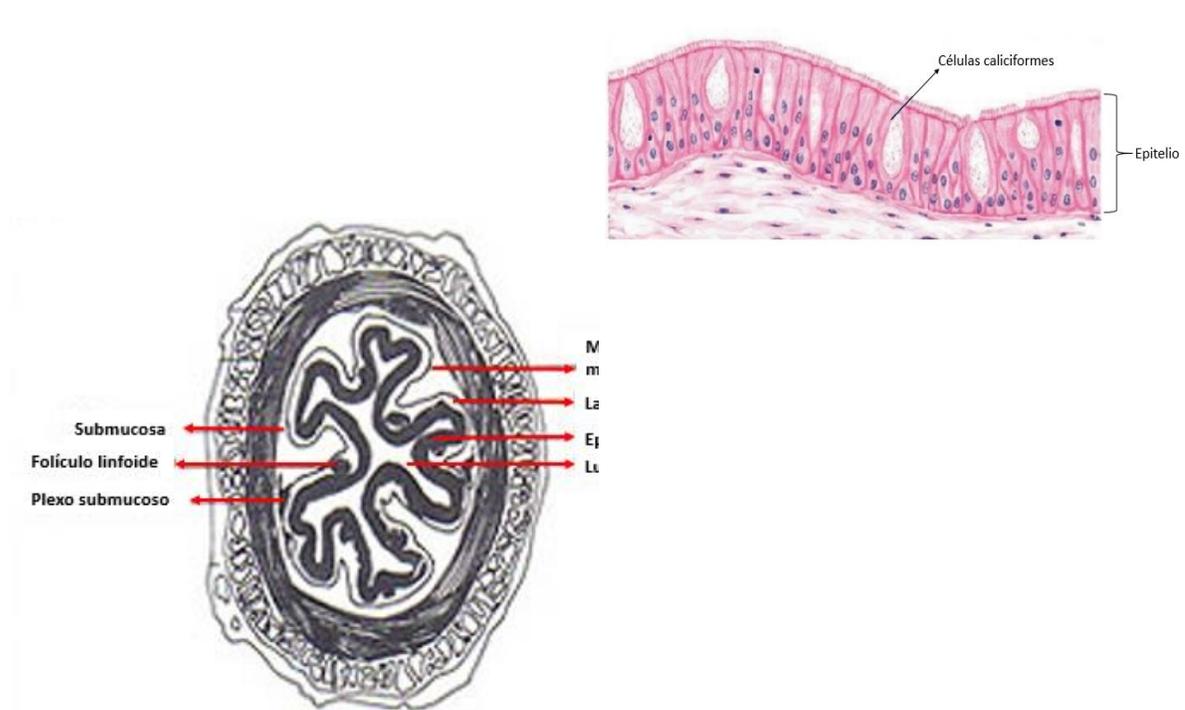


Figura 1. Mucosa intestinal. Consiste en una monocapa de CEI, que incluyen las células de Paneth, células de absorción, células endocrinas, células M y células caliciformes, estas últimas secretan mucinas que recubren al epitelio intestinal.

La capa de mucinas (moco), en conjunto con la actina presente en la superficie de las microvellosidades de las CEI, sirve para lubricar al epitelio gastrointestinal que recubre, protegiéndolo contra el daño mecánico y contra los efectos nocivos del ácido estomacal, además de aislar la carga bacteriana del intestino.

La mucosa intestinal contiene altos niveles de péptidos antimicrobianos secretados por las células de Paneth, así como niveles elevados de inmunoglobulina A (Ig A), secretada por las células plasmáticas sub-epiteliales y traslocada hacia el lumen intestinal por el epitelio intestinal (Harrison y Maloy, 2011).

Además de la barrera intestinal que separa los componentes del lumen intestinal de las células del sistema inmune del huésped, es decir, que aísla al organismo del microambiente luminal, existen otros mecanismos de protección importantes para mantener este equilibrio inmunológico, como el constante patrullaje inmune o inmuno-vigilancia por parte de las CEI, las cuales funcionan como células no profesionales presentadoras de antígeno, muestreando de manera parcial el microambiente, tanto a poblaciones comensales como patógenas, procesando los antígenos desde el lumen y presentándolos a las células T que se encuentran en la lámina propia (Mayer, 2005).

Para poder brindarle protección al huésped, las CEI expresan receptores de reconocimiento de patrones moleculares (RRP), los cuales clásicamente inducen una respuesta pro-inflamatoria contra el patógeno. También expresan receptores de tipo toll (TLR's) para diferenciar entre lo propio y lo extraño, ya que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP).

Otra población celular presente en la mucosa, son los macrófagos ($M\Phi$'s), los cuales regulan la respuesta inmune en el tracto gastrointestinal, se encuentran localizados en la lámina propia, y regulan la respuesta inflamatoria contra agentes ajenos al organismo (Smith *et al.*, 2005).

Todos estos mecanismos confieren al organismo protección contra respuestas agresivas frente a la microbiota y los antígenos provenientes de la dieta; mediando la

relación simbiótica entre los organismos de la microbiota y el huésped. Si este equilibrio se pierde pueden producirse desordenes en la respuesta inmune, provocando patologías de carácter inflamatorio como las EII.

Enfermedades inflamatorias intestinales

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son un grupo de patologías multifactoriales de carácter inflamatorio que engloban la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU); las cuáles afectan principalmente el revestimiento interno del tracto gastrointestinal, lo cual provoca una desregulación inmune y en consecuencia los signos y síntomas intestinales (Karlinger *et al.*, 2000; Dotson *et al.*, 2010).

Aunque se conoce mucho sobre la fisiopatología de estas enfermedades, la etiología directa aún es desconocida, se cree que es el resultado de un desequilibrio del sistema inmune intestinal causado por la flora intestinal, provocando respuestas exacerbadas, las cuales se ven facilitadas por daños del epitelio y del sistema inmune de la mucosa (Podolsky, 2002).

Existen hipótesis que explican la posible etiopatogenia de las EII, una de ellas sostiene que la desregulación del sistema inmune de la mucosa provocada por defectos genéticos en IL-2 e IL-10, provoca una respuesta inmune exacerbada hacia la flora intestinal; y otra sugiere que los cambios en la composición de la microbiota, así como alteraciones a la barrera epitelial provocan respuestas del sistema inmune hacia la mucosa. Por lo que ambas teorías sugieren que una respuesta inmune exacerbada de la mucosa es una característica diacrítica de las EII, y que los factores microbianos, así como los trastornos del epitelio contribuyen a dicha respuesta (Strober *et al.*, 2007; Kostic *et al.*, 2014).

La etiología de estas anomalías aún es incierta, sin embargo, estudios epidemiológicos demuestran diferencias en la incidencia de las EII en cuanto a la edad, el sexo, el tiempo, la zona geográfica y la relación étnico-racial; lo cual sugiere que factores

ambientales como la dieta, el tabaquismo, el uso de ciertas drogas y hormonas, influyen de manera significativa en el desarrollo de estas patologías, también los factores genéticos e inmunológicos son de gran relevancia, sin dejar a un lado las infecciones microbianas (Karlinger *et al.*, 2000; Edward y Loftus, 2004; D'Haens *et al.*, 2014).

En lo que se refiere a los factores genéticos, estudios epidemiológicos sugieren que las EII comprenden un grupo de desórdenes inflamatorios altamente relacionados a susceptibilidad genética, sin embargo, al tratarse de una enfermedad tan compleja, es difícil predecirla genéticamente. Existen ciertos genes relacionados a las EII, como el NOD2/CARD15 (nucleotide-binding oligomerization domain/caspase activating recruitment domain) y los genes SLC22A4 y SLC22A5, el gen DLG5, el gen MDR1, y los receptores activados por peroxisomas (RAPP) (Strober *et al.*, 2007).

Estos diferentes genes se han relacionado a estas patologías a través de estudios de ligamiento genético y de asociación, además que pacientes con EII generalmente presentan familiares con antecedentes clínicos similares. Respecto al gen NOD2/CARD15, localizado en el cromosoma 16q2, se ha reportado una correlación entre ciertas mutaciones y las características fenotípicas de la EC, más que en su susceptibilidad, sin embargo, no presenta mucha asociación con la CU (Economou *et al.*, 2005; Ogura *et al.*, 2001).

Aunque ambas patologías son muy similares, tanto en manifestaciones clínicas digestivas como extra digestivas, pueden diferenciarse en la mayoría de los casos, ya que la CU es una inflamación difusa de la mucosa y submucosa del colon, que se extiende de forma continua y proximal, afectando principalmente el colon y el recto; y la EC se caracteriza por ser una inflamación crónica y trans-mural que afecta la mucosa, submucosa, muscular y serosa, que puede afectar cualquier zona del tracto digestivo, comprometiendo el íleon terminal, colon y región perianal (Añez *et al.*, 2012; Ortigosa, 2005).

En cuanto a la incidencia y prevalencia de las EII, a pesar de que las tasas varían anualmente según la región geográfica, existen reportes que indican una mayor tasa en el norte de Europa, Reino Unido y América del Norte, además se ha registrado un aumento de estas patologías en diferentes regiones del mundo como el centro y sur de Europa, Asia, África y América latina (Loftus, 2004; Molodecky *et al.*, 2012).

Colitis ulcerativa

La colitis ulcerativa (CU) es una enfermedad inflamatoria intestinal que se caracteriza por afectar principalmente la mucosa del colon, se extiende de forma proximal y continua comprometiendo el recto, presenta un infiltrado celular en la lámina propia, así como pérdida total de la estructura de las criptas (Ortigosa, 2005; Monstad *et al.*, 2014).

Los síntomas pueden comenzar de forma repentina o gradualmente, además pueden ser variados, dentro de los más característicos se encuentran la diarrea, la cual puede presentarse con sangrado, fiebre, dolor abdominal, síndrome rectal (tenesmo, urgencia deposicional, esputo rectal de sangre y moco) y pérdida de peso (Carter *et al.*, 2004).

Un estudio realizado en la base de datos de pacientes con EII sometidos a colectomía en México entre 1990 y 2006 demostró que la prevalencia de la colitis indeterminada (CI) en nuestra población es de 8.7 %, asociando una temprana edad y la presencia de megacolon tóxico como los principales factores en pacientes con CI (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2010).

La colitis ulcerativa se caracteriza por ser una enfermedad con una respuesta inmune tipo Th1 con una alta producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β .

La evidencia acumulada de diversos estudios demuestra que la colitis ulcerativa comprende un grupo heterogéneo de patologías inflamatorias, que son el resultado de diferentes mecanismos patogénicos, y en conjunto muestran una expresión común de síntomas, así como un fenotipo característico.

La exposición de la mucosa intestinal a antígenos microbianos, desde la iniciación, perpetuación y la amplificación de la enfermedad es de suma importancia ya que se promueve la generación de anticuerpos hacia estos antígenos, y por consiguiente se produce el daño al tejido, ya que la respuesta que se da es atípica, sin embargo aún se desconoce la forma en que esta respuesta afecta la cascada final de eventos inflamatorios (Targan y Karp, 2005).

Existen diferentes modelos murinos de inducción de la colitis experimental, estos modelos se pueden dividir en: modelos espontáneos, modelos modificados genéticamente, modelos de transferencia adoptiva de células y modelos inducibles (Elson *et al.*, 2005).

Dentro de los modelos inducibles, existen aquellos que se inducen a través de ciertos compuestos químicos, los cuales provocan un daño a la mucosa intestinal, es decir, rompen esta barrera, permitiendo la entrada de patógenos que causan una respuesta inmune exacerbada. Algunos de estos modelos son el tratamiento con ácido acético, oxazolona, ácido dinitrobenceno-sulfónico (DNBS), ácido trinitrobenceno-sulfónico (TNBS) y dextran sulfato de sodio (DSS), entre otros (Yamada *et al.*, 1993; Boirivant *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1999; Neurath *et al.*, 2000).

Modelo de colitis experimental inducida por DSS

Los modelos experimentales de las EII realizados en ratones son de suma importancia ya que ayudan a comprender la complejidad de estas enfermedades, así como a delimitar los mecanismos moleculares que abarcan, y a evaluar posibles terapias para aplicarlas en humanos (Chassaing y Darfeuille-Michaud, 2011)

Dentro de los modelos inducibles, el más utilizado para la inducción de la colitis experimental es el tratamiento con Dextran Sulfato de Sodio (DSS), el cual se realiza por medio de la administración oral de este compuesto químico durante cierto periodo de tiempo, este modelo es muy reproducible y se caracteriza por la aparición de diarrea acompañada de sangre, ulceraciones e infiltrado celular. El DSS es un

polisacárido sulfatado sintetizado, compuesto de dextran y unidades de anhidroglucosa sulfatada. Es claramente tóxico para las células epiteliales del colon, por lo que la integridad de la barrera de la mucosa se ve afectada (Wirtz y Neurath, 2007).

Debido a que la barrera epitelial es dañada, se pierde esa protección física e inmunológica, aumentando así la permeabilidad de la mucosa del colon y permitiendo la entrada de las moléculas del DSS, además se facilita la interacción de las células del sistema inmune del intestino con la microbiota del lumen. Esto provoca un infiltrado masivo de células inflamatorias a la lámina propia y submucosa del colon, y con ello un aumento en la producción de citocinas inflamatorias como IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-1, IL-6, IL-17, así como quimiocinas, y un aumento en la actividad de iNOS y la síntesis de ON.

Este modelo es utilizado con frecuencia para imitar la colitis en humanos, presentando varias características morfológicas y fisiopatológicas similares.

La severidad de la colitis dependerá no sólo de la concentración, el peso molecular y la duración de la exposición al químico, sino también de la cepa de ratones utilizada y la microbiota (Perse y Cerar, 2012; Hakansson *et al.*, 2015).

Hipótesis de la higiene

Debido a que existe una diferencia marcada en la incidencia y prevalencia de las EII entre países desarrollados y en vías de desarrollo, surgió la “hipótesis de la higiene”, la cual sugiere que una exposición disminuida a agentes infecciosos o a condiciones insalubres, es decir, menos infecciones durante la infancia, así como el uso de antibióticos, afecta de forma negativa el desarrollo del sistema inmune, generando un mayor número de células inmunes auto-reactivas en los seres humanos, y por lo tanto la aparición de enfermedades inflamatorias autoinmunes e idiopáticas (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002; Hewitson *et al.*, 2009).

Por otra parte se ha propuesto que la ausencia de parásitos helmintos es un factor ambiental de gran importancia para el desarrollo de las EII, ya que estos organismos tienen la capacidad de regular el sistema inmune de su hospedero y evitar las respuestas exacerbadas (Weinstock *et al.*, 2005).

En el caso de las infecciones con helmintos existen datos que muestran la capacidad de estos organismos para modular la respuesta inmune en sus huéspedes, la infección con estos organismos induce una respuesta tipo Th2, la cual tiene la capacidad de antagonizar o inhibir enfermedades en las que la inmuno-patología es impulsada por una respuesta tipo Th1 o inflamatoria como la colitis ulcerativa (Melon *et al.*, 2009).

Inmunomodulación por parásitos helmintos

Los parásitos helmintos son un grupo no taxonómico que engloba una gran variedad de gusanos que parasitan a todo tipo de animales, como artrópodos, peces, reptiles, aves, mamíferos, entre estos al ser humano.

Evolutivamente estos animales se adaptaron al tipo de vida parasitaria, por lo que la mayoría carece de ciertos sistemas como el circulatorio, en el caso de los cestodos, estos animales carecen del aparato digestivo. El ciclo de vida de la mayoría de los helmintos es complejo, ya que incluyen estadios de vida libre y estadios de vida parasitaria y muchas veces se albergan en más de un hospedero.

La respuesta inmune hacia los parásitos helmintos engloba todos los componentes del sistema inmune, tanto la inmunidad humoral, como la inmunidad celular, además del complemento. Dependiendo del tipo de parásito, es decir, su morfofisiología, así como su nicho dentro del organismo huésped, va a depender el tipo de respuesta inmune.

Las infecciones por parásitos helmintos inducen una respuesta inmune tipo Th2 como parte de ciertos mecanismos de evasión del sistema inmune de sus respectivos hospederos, con el propósito de sobrevivir y completar su ciclo de vida. Esta respuesta tipo Th2 se caracteriza por una alta producción de interleucinas como IL-4, IL-5, IL-

13, inmunoglobulinas del tipo IgG1 e IgE, así como una marcada eosinofilia, basofilia y la presencia elevada de mastocitos (Maizels *et al.*, 2004, Anthony *et al.*, 2007).

Esta respuesta inmune presenta componentes efectores para la eliminación del parásito, como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o no fagocítica, formación de granuloma para evitar la migración del parásito y así su desarrollo, anafilaxia intestinal y la neutralización de enzimas liberadas por el parásito (Fundora *et al.*, 2013).

Dentro de los mecanismos de evasión del sistema inmune por parte del parásito, está el mimetismo antigénico, que consiste en cubrir su superficie con moléculas que presentan reacción cruzada; además la producción de variantes antigénicas de membrana, o la reclusión, localizándose en lugares con difícil acceso; entre otros (Fundora *et al.*, 2013).

También se ha descrito el reclutamiento de poblaciones con capacidad reguladora como las Treg's, células B con alta capacidad de secretar IL-10 (Breg's) y macrófagos alternativamente activados (MAA) (Reyes y Terrazas, 2007).

Recientemente se ha descrito que estos mecanismos de evasión inmune son tan fuertes que no sólo permiten el crecimiento de estos parásitos de manera exitosa, sino que además impiden el desarrollo de enfermedades autoinmunes y alérgicas (Yazdanbakhsh *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2011).

La regulación cruzada entre células Th1 y Th2, también sugiere que la infección por helmintos puede prevenir o reducir los efectos de algunas enfermedades caracterizadas por respuestas tipo Th1 (producción de IL-12, INF gamma y TNF alpha), de hecho algunos datos sugieren que la infección con algunos parásitos helmintos como *Trichinella spiralis*, *Trichuris suis*, *Hymenolepis diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *Heligmosomoides polygyrus* y *Trichuris muris* reducen la patología de la colitis experimental en ratones (Khan *et al.*, 2002; Summers *et al.*, 2005; Melon *et al.*, 2009; Reardon *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2007; Hang *et al.*, 2010). En el caso de *S. mansoni* y de *H. diminuta* reportes previos sugieren que las células responsables de

este fenómeno son una población de macrófagos alternativamente activados (Smith *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2010).

Taenia crassiceps

Taenia crassiceps es un parásito helminto de la clase Cestoda, se desarrolla como gusano adulto en el intestino de cánidos mientras que en su etapa larval (metacestodo) se encuentra en los roedores. Su morfología no es tan compleja, ya que presenta un cuerpo alargado y aplanado dorso-ventralmente, el cual se divide en tres regiones: escólex, cuello y estróbilo.

El escólex es un órgano de fijación, que también tiene funciones de nutrición y sensoriales, el cuello es una región de tejido diferenciado que separa el escólex del estróbilo, este último está compuesto por una serie de segmentos llamados proglótidos. Cada proglótido cuenta con uno o más juegos de órganos de reproducción. Existen tres tipos de proglótidos, los inmaduros que son los más cercanos al cuello, los maduros sexualmente que son los que se encuentran en la parte central y los grávidos que son aquellos llenos de huevecillos que están en el extremo posterior.

El ciclo de vida consiste en la liberación de los proglótidos grávidos junto con las heces de los cánidos (hospedero definitivo), las cuales son ingeridas por el hospedero intermediario, en este caso los roedores, donde se desarrolla la fase larvaria o metacestodo, y a su vez cuando el roedor es devorado por otro cánido, el cisticerco o larva invagina en el intestino donde se ancla y se desarrolla como adulto, cerrando así el ciclo de vida de este parásito (Fig.2).



Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. Durante su etapa larvaria parasita a los roedores, mientras que en su etapa adulta se encuentra en cánidos.

Una de las ventajas de este parásito es que además de crecer, también se reproduce de forma asexual por gemación dentro de las cavidades corporales o subcutáneamente en roedores, por lo que ha sido utilizado ampliamente como un modelo experimental que ayuda a estudiar a fondo la biología de la cisticercosis, así como la interacción huésped-parásito (Maillard *et al.*, 1998; Willms y Zurabian, 2010).

Además este modelo es útil para el inmuno-diagnóstico en humanos infectados por *Taenia solium*, ya que se ha comprobado la similitud antigénica con *Taenia crassiceps*, debido a que los sueros de humanos con neurocisticercosis reconocen de forma positiva los antígenos de *Taenia crassiceps* (Terrazas *et al.*, 1998).

Inmunomodulación por *Taenia crassiceps*

Se ha observado que la infección con *Taenia crassiceps* induce una respuesta tipo Th1 rápida y transitoria durante las dos primeras semanas, que conforme avanza el tiempo se vuelve más difícil de detectar; mientras que a partir de la semana cuatro genera una respuesta tipo Th2 (Terrazas *et al.*, 1998).

La infección con *Taenia crassiceps* puede intervenir en la respuesta de su hospedero, volviéndolo más resistente o más susceptible a una infección secundaria, en el caso de la infección con *Trypanosoma cruzi*, se ha reportado mayor susceptibilidad (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1999).

Durante la etapa aguda de la infección con *Taenia crassiceps* se recluta una población de macrófagos alternativamente activados (MAA), los macrófagos son células del sistema inmune innato con gran capacidad pleiotrópica, dentro de sus funciones se encuentran: fagocitosis, presentación de antígenos y reparación de tejidos entre otras. Se denominan alternativamente activados ya que se inducen por citocinas distintas a las que inducen a los macrófagos de manera clásica, como la IL-4 y la IL-13.

Los macrófagos clásicamente activados (MCA) son inducidos por citocinas pro inflamatorias como IFN γ , TNF α , así como por moléculas microbianas como lipopolisacáridos (LPS), se caracterizan por su capacidad de producir óxido nítrico (ON) a partir de la L-arginina.

Los MCA que se reclutan en la cavidad peritoneal durante la infección con *T. crassiceps*, sufren alteraciones en el transcurso de la infección, ya que durante la etapa aguda producen niveles elevados de IL-12 y ON, y escasa IL-6 y prostaglandina E2(PGE2), y tienen la capacidad de inducir mayor proliferación de células T CD4+; mientras que durante la etapa crónica de infección modifican su perfil al de MAA, produciendo un patrón distinto de citocinas y quimiocinas, como un aumento en la expresión de MHCII,CD40,CD86,CD32 y CCR5, además de una baja producción de IL-12 tanto en respuestas a LPS y en co-cultivos con células T CD4+ más antígeno (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002).

Estos MAA juegan un papel importante en la inmuno-modulación por parte de *Taenia crassiceps*, ya que se ha reportado la presencia de esta población celular en cepas susceptibles a la infección, mientras que en cepas resistentes el perfil cambia a los MCA (Reyes *et al.*, 2009).

Los MAA secretan niveles bajos de citocinas pro-inflamatorias y niveles elevados de IL-10 y TGF- β , también expresan la enzima Arg-1, la cual compite con mayor afinidad que iNOS por el sustrato en común L-arginina y produce urea, poliamidas y L-ornitina. También expresan Ym-1, RELM α , Ligando 1 de muerte programada (PD-L1), PD-L2 y juegan un papel en diferentes aspectos de las inmuno-respuestas tales como la diferenciación de linfocitos Th2, el reclutamiento de IL-4, e inducción primaria de bajas respuestas proliferativas de células T.

Además se ha reportado otro grupo de marcadores moleculares elevados en la población de MAA provenientes de ratones infectados con *Taenia crassiceps* como MMR, mMGL1, y mMGL2, Arg1, Fizz1, Ym1 y TREM-2, lo cual confirma que estos M Φ ' se encuentran alternativamente activados (Raes *et al.*, 2005).

Estos M Φ 's tienen capacidad supresora ya que inhiben la respuesta proliferativa de las células T CD4+, al parecer este efecto es contacto dependiente y es causado principalmente por la interacción PD-1/PD-L's (Terrazas *et al.*, 2005).

Todos estos cambios que se producen durante la infección con *Taenia crassiceps* así como con otros parásitos helmintos, son considerados como mecanismos para sobrevivir dentro de su hospedero, sin embargo, esta modulación del sistema inmune tiene efectos protectores contra ciertas patologías inflamatorias y autoinmunes.

En el caso de *Taenia crassiceps*, se ha reportado que la infección crónica de este organismo modifica la incidencia y el desarrollo de la diabetes autoinmune inducida con MLDS (múltiples dosis bajas de streptozotocina), mostrando bajos niveles de glucosa en sangre, y un aumento de la población de MAA, así como niveles elevados de IL-4 y niveles disminuidos de TNF- α , y finalmente un menor daño en las células del islote pancreático (Espinoza-Jiménez *et al.*, 2010).

Datos similares se observaron en la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), donde se encontró que la inmuno-modulación inducida por *Taenia crassiceps* disminuye la severidad de la EAE mediante la reducción de la activación de las células T, su proliferación y migración al sistema nervioso central (Reyes *et al.*, 2011).

Mientras que recientemente se observó que la infección con *Taenia crassiceps* modula el desarrollo de la colitis ulcerativa experimental, observándose una disminución de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-17, y un aumento de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10, además de observarse un menor infiltrado celular en la submucosa y lámina propia del colon, conservándose la estructura normal (Callejas, 2013).

Regulación por antígenos excretados/secretados de *Taenia crassiceps*

Se ha reportado que las infecciones con parásitos helmintos polarizan la respuesta inmune hacia un perfil tipo Th2 (anti-inflamatorio), como parte de ciertos mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero; el perfil Th2 se caracteriza por la producción de altos niveles de citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13 así como el reclutamiento de diversas poblaciones celulares (MAA, MDSC, CDi, Treg's).

Esta infección conlleva la producción de antígenos excretados/secretados por parte del parásito, los cuales intervienen en la regulación de la respuesta inmune para propiciar la permanencia del parásito dentro del hospedero (Gómez-García *et al.*, 2006, Hewitson *et al.*, 2009).

Para determinar el efecto que tienen estos antígenos sobre las poblaciones celulares del sistema inmune, se han realizado estudios *in vitro*, tanto de este parásito helminto como de otros.

Respecto a *Taenia crassiceps* se ha reportado el reclutamiento de células mieloides supresoras (MDSC) después de la inoculación vía *i.p* del TcES (18 h post-inoculación), con capacidad de inhibir la proliferación de células T activadas (Gómez- García *et al.*, 2005).

También se ha observado que células dendríticas expuestas a TcES mostraron respuestas deficientes a diversos agonistas de los TLRs (LPS, CPG y Ag de *Toxoplasma gondii*), conocidos por inducir citocinas pro-inflamatorias en estas células. Este efecto es dependiente de carbohidratos presentes en el TcES (Terrazas *et al.*, 2010).

Por otro lado, la estimulación con el TcES de este cestodo modula la activación y maduración de las células dendríticas humanas, induciendo un fenotipo tolerogénico, además, estos antígenos son capaces de alterar la respuesta pro-inflamatoria de estas células ante estímulos con LPS, modulando su maduración y con ello la secreción de citocinas inflamatorias (Terrazas *et al.*, 2011).

Es decir, que estos antígenos tienen importantes efectos inmuno-reguladores sobre el organismo hospedero y específicamente sobre ciertas poblaciones celulares del sistema inmune.

Diversos estudios sugieren que la principal actividad inductora del perfil Th2 por la inoculación de antígenos depende de la estructura intacta de los carbohidratos en el antígeno (Okano *et al.*, 1999). Por lo cual se sugiere que estas glicoproteínas inmuno-reguladoras son de gran importancia para la inducción de un perfil tipo Th2 durante la infección con helmintos. Esta idea ha sido comprobada usando diferentes tipos de antígenos helmínticos, tales como *Brugia*, *Echinococcus*, *Ascaris*, *Caenorhabditis*, *Hymenolepis* y *Taenia crassiceps* (Thomas y Harn, 2004).

En el caso de *Taenia crassiceps* se ha demostrado que las glicoproteínas presentes en el TcES juegan un papel crítico en la inmuno-modulación por parte de este parásito, ya que al modificar su estructura pierden la capacidad de reclutar MDSCs y de modular la maduración de las CD (Terrazas *et al.*, 2010).

HIPÓTESIS

La administración de antígenos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* modulará el desarrollo de la colitis experimental inducida por DSS (dextran sulfato de sodio) al inducir una respuesta anti-inflamatoria, disminuyendo de manera significativa la severidad de la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si la administración de antígenos excretados/secretados de *Taenia crassiceps* (TcES) disminuye el desarrollo o la severidad de la colitis experimental inducida con dextran sulfato de sodio (DSS).

Objetivos particulares

- Inducir la colitis experimental a través del compuesto químico Dextran Sulfato de Sodio (DSS).
- Evaluar el desarrollo de la colitis experimental en presencia y ausencia del antígeno excretado/secretado de *Taenia crassiceps* (Tc ES).
- Determinar el perfil de citocinas presentes durante el desarrollo la colitis experimental, tanto en el grupo tratado con Tc ES como en el grupo que recibe DSS únicamente.
- Valorar y comparar el daño histopatológico en los diferentes grupos experimentales.
- Determinar la presencia de macrófagos alternativamente activados (MAA) a nivel sistémico y en muestras de colon por RT-PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico de Referencia

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 8 a 9 semanas de edad, los cuales se dividieron en cuatro grupos experimentales: Control, DSS (administración con DSS al 4%), DSS+TcES (administración con DSS al 4% e inoculación del TcES (200µg)) y TcES (inoculación con el TcES (200µg)).

Inducción de la colitis experimental

Para la inducción de la colitis experimental se utilizó el compuesto químico Dextran Sulfato de Sodio (DSS) previamente reportado (P.M. 35000-50000 kD, MP Biomedicals), el cual se colocó al 4% en los bebederos con agua estéril para beber durante un periodo de 10 días, administrado vía oral.

Obtención y administración del antígeno TcES

Se obtuvieron en condiciones estériles metacestodos de la cavidad peritoneal de ratones con 8 semanas de infección, los cuales se lavaron con solución salina estéril. Posteriormente se incubaron por 24 h en solución salina y se recuperó el sobrenadante con las excreciones y secreciones de los parásitos. Posteriormente se filtró en tubos de corte Merck Millipore de 50 kDa, se le agregó inhibidor de proteasas y se pasó a través de un filtro de 0,22 micras. Para cuantificar la cantidad de proteína se utilizó el método Bradford.

Los ratones del grupo DSS+TcES y TcES fueron inyectados vía i.p. con 200 µg de TcES diariamente durante el periodo de inducción de la colitis experimental.

Evaluación del modelo de colitis experimental

Para determinar la severidad de la colitis experimental, diariamente se registró el peso por ratón de cada grupo, y se realizó el índice de actividad de la enfermedad (IAE) para lo cual se utilizaron los siguientes criterios: pérdida de peso, consistencia de las heces/diarrea y sangrado rectal (siendo 12 el valor máximo del IAE), además se

les extrajo el colon, registrando su longitud así como la longitud del ciego intestinal, finalmente se realizaron cortes histológicos de la porción distal del colon.

Análisis histológico

Transcurrido el periodo de inducción de la colitis experimental, se sacrificaron los ratones de cada grupo y se les extrajo el colon y el ciego intestinal, los cuales se midieron longitudinalmente. Posterior a esto, fueron lavados con solución salina estéril (PISA) y se cortaron porciones distales del colon de aproximadamente 1 cm., las cuales se fijaron en paraformaldehído y se mantuvieron a 4°C durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo, los tejidos se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos de 5µm de grosor, las cuales se montaron en laminillas, para que el tejido se extendiera, se utilizó Ruyter.

Para quitar el exceso de parafina, las laminillas se incubaron a 60°C durante 24 h, lo cual ayudó a una mejor adherencia del tejido.

Se realizó la tinción Hematoxilina-Eosina (H&E), con la cual se determinó la arquitectura del colon, observándose el infiltrado celular, el grosor de la lámina propia, la estructura de las criptas, las vellosidades y microvellosidades.

También se hizo la tinción Tricrómica de Masson (Sigma) la cual distingue los depósitos de colágena como un producto de reacción azul y la tinción Alcian Blue para observar las células caliciformes.

Las laminillas se montaron con Entellan (Baker) y se observaron en el microscopio óptico (Zeiss), se utilizó el programa Axio Vision Rel 4.6n (Zeiss) y las fotos se tomaron con cámara Axiocam ICc3 (Zeiss).

Cuantificación de citocinas en suero

Para la obtención del suero, los ratones fueron sangrados al finalizar la administración del DSS, las muestras se centrifugaron a 6500 rpm durante 10 minutos, el suero obtenido se mantuvo en congelación a -70°C hasta su posterior uso. Para la cuantificación de citocinas en suero (TNF- α , IL-1 β e IL-4) se aplicó el método de ELISA sándwich.

Citometría de flujo de células de exudado peritoneal

Se aislaron células de la cavidad peritoneal para determinar la presencia de MAA, las cuales se incubaron durante 10 minutos a 4 °C para bloquear los receptores FC, posteriormente se marcaron con anti-F4/80 (APC), anti-PDL-2 (PE) y anti-MMR (FITC) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Además se marcaron células de exudado peritoneal con CD11b y Gr1 para observar la presencia de células mieloides supresoras las cuales pueden dar origen a la formación de MAA. Estas poblaciones de células se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACS Calibur.

Análisis moleculares

Se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR de la porción distal del colon después de los 10 días de administración del DSS, para lo cual se cortaron porciones de aprox. 1 cm. y se maceraron en 1 ml de trizol (Invitrogen). El RNA total se obtuvo con el método de Fenol-cloroformo y se cuantificó en un espectrofotómetro utilizando una dilución 1:1000. Posteriormente se obtuvo el cDNA utilizando 5mg de RNA total y el kit II superstrand synthesis (Invitrogen), una vez obtenido el cDNA se cuantificó con una dilución 1:100 y se realizaron los ensayos de PCR para la identificación de los siguientes genes: citocinas: TNF- α , e IL-10, marcadores de activación alternativa: Arg-1, Ym-1 y Fizz-1. Se utilizó un termociclador Corbett Research y las siguientes concentraciones:

Mezcla de Reacción

Buffer 10x	2.5 μ l
MgCl 20x	1.25 μ l
dNTP mix 10mM	1 μ l
Primer F 50pM	* μ l
Primer R 50pM	* μ l
Taq Polimerasa 5U/ μ l	0.3 μ l

*Los μl de Primer variaron según el marcador

A cada mezcla se le agregó la cantidad de cDNA según los datos obtenidos en la cuantificación, y se llevaron a un volumen final de 25 μl con agua molecular.

Electroforesis

Para observar los productos de los ensayos de RT-PCR se llevaron a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X y Midori Green en una cámara molde. Una vez que gelifico, se agregó 1 μl de amortiguador de carga juice (Invitrogen) por cada 5 μl de DNA y se colocaron 10 μl de la dilución a partir del segundo pozo, ya que al primero se le agregaron 8 μl de marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen). Las muestras se corrieron durante a 20 minutos a 100 volts, finalmente se observaron en un trans-iluminador con luz UV y las imágenes se capturaron con el programa BioSens SC 645.

Citometría de flujo de células de lámina propia (monocitos y neutrófilos)

Para aislar las células de la lámina propia se obtuvo una porción distal del colon de los diferentes grupos experimentales la cual se lavó con solución salina, posteriormente se abrió longitudinalmente y se lavaron con DMEM, se cortaron en pequeñas porciones y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en agitación a 50 g. con HBSS, con 2% de SFB y 2mM de EDTA, para eliminar las células epiteliales y el moco. Lo siguiente fue disgregar el tejido, para lo cual se incubó durante 2 horas a 37°C en agitación a 250 rpm con medio DMEM que contenía 2mg/ml de colagenasa (Sigma) y 40ug/ml de DNase (Invitogen). Transcurridas las dos horas, la suspensión se lavó con DMEM con 10% de SFB y se filtró en coladores de 100 y 40 micras respectivamente. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos y las células precipitadas se separaron mediante un gradiente de Percoll.

Las células obtenidas se marcaron con CCR-2(FITC) y Ly6C (PERcP) para determinar la presencia de monocitos y con CD11b (APC) y Ly6G (Cy7) para marcar a los neutrófilos.

Análisis Estadístico

Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA seguido de la prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los grupos experimentales. Se usó el programa GraphPad Prisma 6.

RESULTADOS

Pérdida de peso (%)

Se registró el peso de cada grupo experimental diariamente durante el periodo de inducción de la colitis experimental (8-9 días), determinando así el porcentaje de pérdida o ganancia de peso. Se observó que a partir del tercer y cuarto día de la administración del DSS, el grupo DSS comenzó a bajar de peso de manera significativa, mientras que el grupo de animales que recibió DSS más el tratamiento diario con +TcES no presentó una pérdida de peso considerable. Los resultados mostrados corresponden a cuatro experimentos independientes (Fig.3).

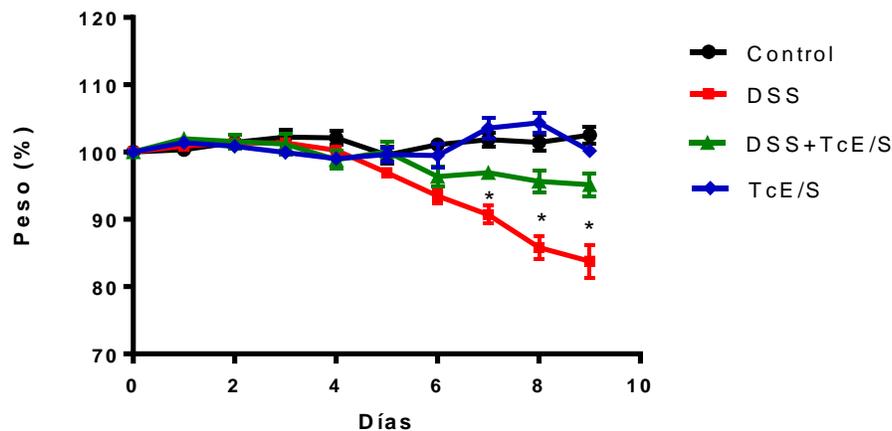


Figura 3. Pérdida de peso. Los ratones de los diferentes grupos experimentales se pesaron diariamente durante la inducción de la colitis experimental (8-9 días). El grupo DSS+TcES no mostró pérdida de peso, mientras que el grupo de DSS mostró una pérdida de peso significativa comparado con el grupo control. Análisis estadístico por ANOVA y prueba Tukey para determinar las diferencias significativas entre los grupos experimentales. * <math>P < 0.05</math>

Índice de actividad de la enfermedad (IAE)

El índice de actividad de la enfermedad se determinó mediante la puntuación de ciertos parámetros característicos de la enfermedad en humanos (Cooper *et al.*, 1993).

Los parámetros fueron los siguientes:

-Pérdida de peso: (0 puntos =0 % de pérdida de peso, 1 punto = 1 a 5% de pérdida de peso, 2 puntos = 5 a 10 % de pérdida de peso, 3 puntos = 10 a 15% de pérdida de peso y 4 puntos =más del 15% de pérdida de peso).

-Consistencia de las heces/diarrea: (0 puntos =consistencia normal, 2 puntos = heces sueltas, 4 puntos = diarrea acuosa).

-Sangrado:(0 puntos = sin sangrado, 2 = sangrado leve y 4 puntos = sangrado severo).

La suma de estos parámetros nos indica el Índice de Actividad de la Enfermedad, siendo 12 la puntuación máxima, lo cual nos indica una colitis severa (Philip *et al.*, 2009). El grupo DSS comenzó a presentar un mayor IAE a partir del sexto día (Fig.4).

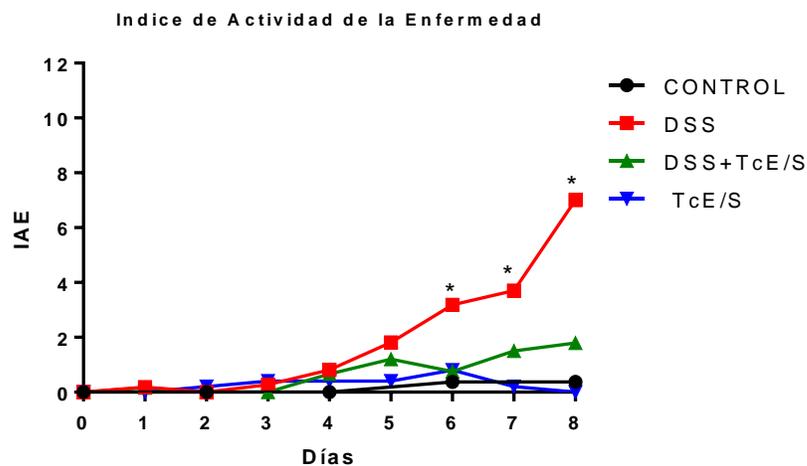


Figura 4. Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE). Se determinó el índice de actividad de la enfermedad mediante los siguientes parámetros: pérdida de peso, consistencia de las heces y sangrado rectal, evaluando diariamente los grupos experimentales. Se observó que el grupo DSS presentó un mayor índice de enfermedad comparado con el grupo DSS+TcES, por lo que la presencia del TcES promueve el mantenimiento de estos parámetros dentro de un rango normal durante la colitis experimental. * <math>P < 0.05, n=4</math>

Longitud de colon

Un aspecto importante para evaluar el daño provocado por la colitis experimental es la alteración de la longitud del colon; en este caso se observó que al término del periodo de administración del DSS los colon extraídos sufrieron cambios en cuanto apariencia y tamaño, ya que el grupo DSS mostró una reducción significativa en el tamaño del colon comparado con el grupo DSS+TcES, además se observaron diferencias entre el grupo DSS respecto al grupo Control y al grupo TcES (Fig. 5).

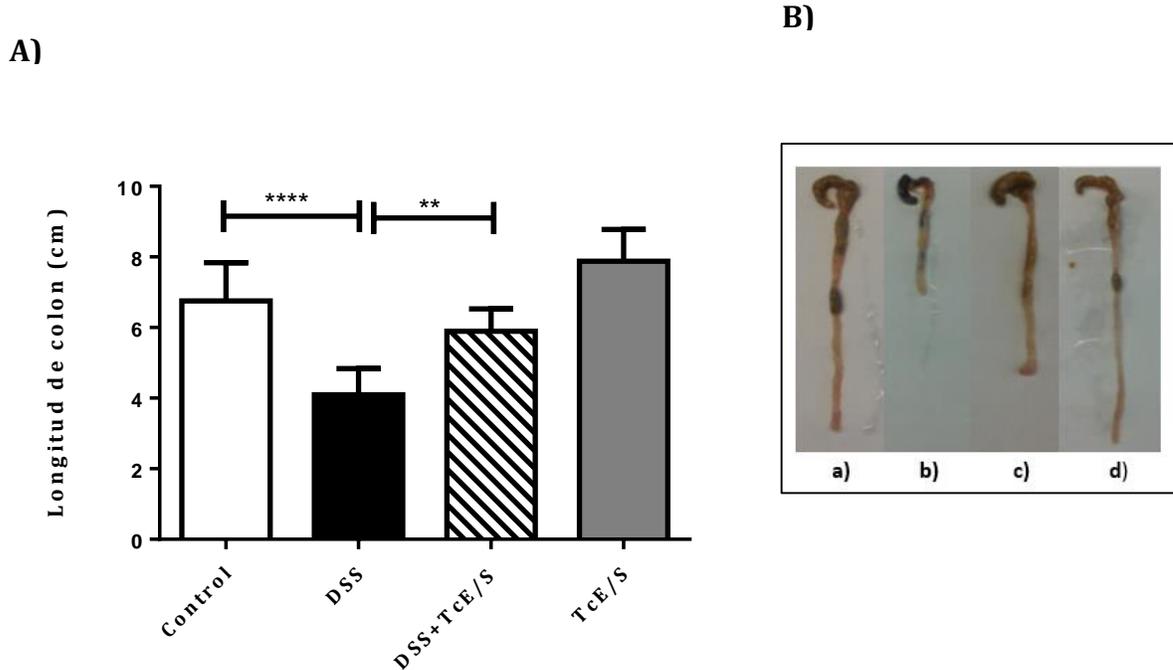


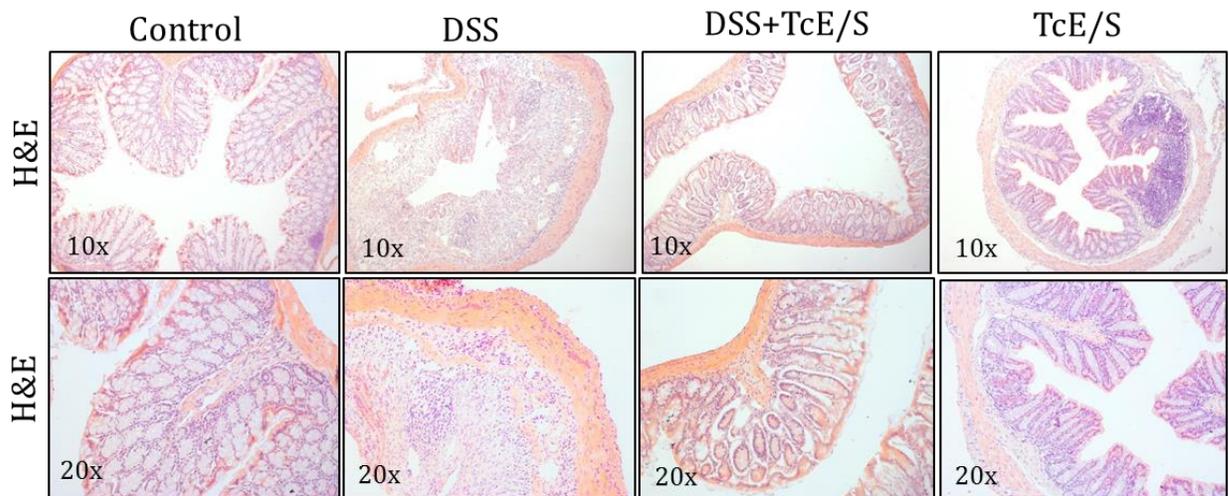
Figura 5. Longitud de colon. **A)** Comparación de los diferentes grupos experimentales, se observa una diferencia significativa entre el grupo Control y el grupo DSS, así como entre el grupo DSS y el grupo DSS/TcES. * < P 0.05 **B)** Imagen representativa del colon de los diferentes grupos experimentales: **a)**Control, **b)**DSS, **c)**DSS+TcES y **d)**TcES.

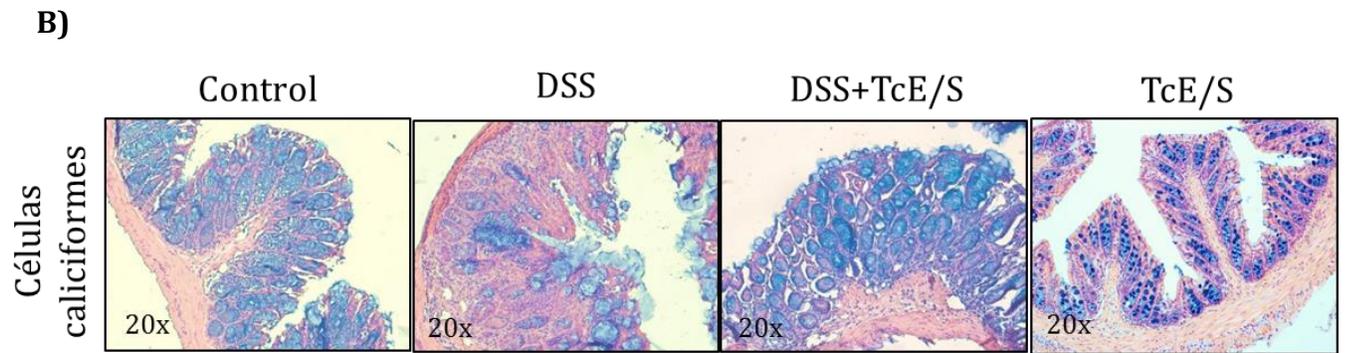
Análisis histológico (H&E y Alcian Blue)

Para determinar el daño producido a nivel histológico así como el infiltrado celular, se realizaron cortes de la parte distal del colon y se tiñeron con H&E. El grupo control, así como el grupo TcES mostraron un colon aparentemente sano, sin alteración en la estructura, sin embargo el grupo con colitis experimental (DSS) presentó una alteración de la estructura del colon, perdiéndose la barrera que protege de la entrada de la microbiota al colon, además se muestra un infiltrado celular de carácter inflamatorio, ya que se observó un engrosamiento de la submucosa y lamina propia. Respecto al grupo DSS+TcES, no se observó pérdida de la estructura del colon, ya que se distinguen las estructuras con facilidad (Fig.6 A)

En relación a la tinción Alcian Blue, la cual se realizó para determinar la presencia de las células caliciformes, observamos una disminución de estas células en el grupo DSS, mientras que el grupo DSS+TcES no presenta alteración alguna, comparado con el grupo Control (Fig.6 B y C).

A)





C)

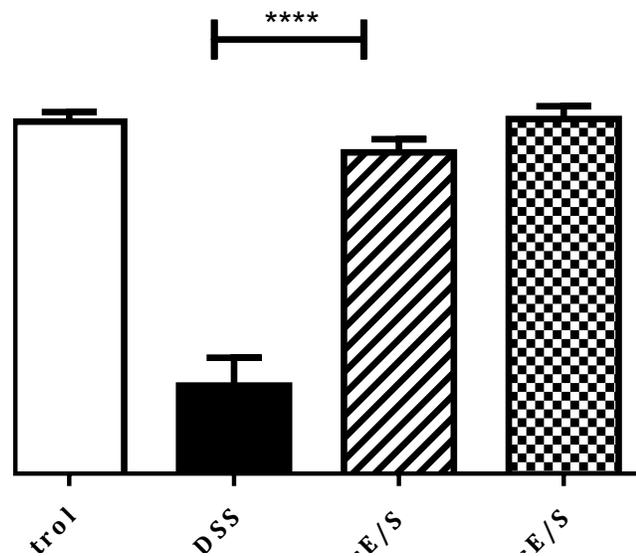


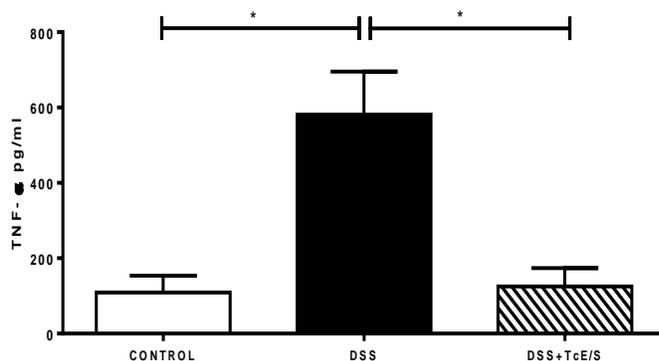
Figura 6. Histología del tejido de colon. A. Tinción con H&E a 10X y 20X, donde se muestra la inflamación del colon del grupo DSS, mientras que el grupo DSS+TcES conserva una estructura aparentemente sana. B. Células caliciformes teñidas con Alcian Blue a 20X, donde se observa una disminución de estas células en el grupo DSS. C. Células caliciformes cuantificadas en cinco campos.

Niveles de citocinas en suero

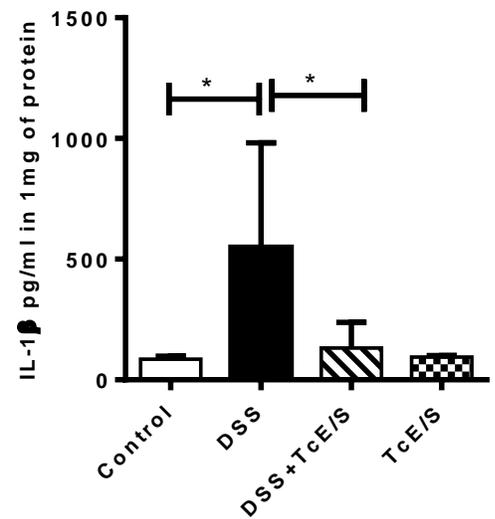
Debido a que se observó un daño en el colon a nivel histológico en el grupo DSS, decidimos medir TNF- α e IL-1 β , la primera a nivel sistémico y la segunda en el tejido (colon), ambas citocinas pro-inflamatorias, de las cuales se han reportado niveles elevados en biopsias intestinales de pacientes con colitis ulcerativa, así como en modelos de colitis experimental (Strober y Fuss 2011; Kwon, *et al.*, 2005). Como se puede observar en la figura 7A y 7B, en el grupo que recibió sólo DSS hubo un aumento significativo en la producción de estas citocinas, sin embargo, el tratamiento con TcES disminuyó la producción de estas citocinas pro-inflamatorias.

Además de estas citocinas pro-inflamatorias, también decidimos medir la producción de IL-4, una citocina anti-inflamatoria, la cual es importante en nuestro modelo, ya que se ha observado expresada en la infección con *Taenia crassiceps* y en este caso se trata del TcES, que proviene de este parásito. Se observó que el TcES indujo la producción de IL-4, ya que se encontró más elevada en el suero de los animales tratados con DSS más TcES respecto a los otros grupos (Fig.7C).

A)



B)



c)

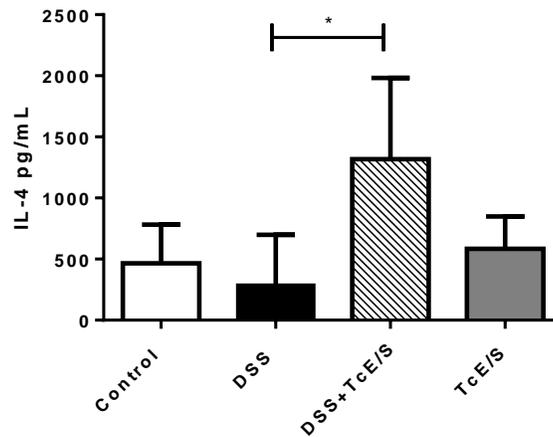


Figura 7. Niveles de citocinas en suero (TNF- α e IL-4) y en colon (IL-1 β). El grupo DSS muestra un incremento de las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β), mientras que en presencia del TcES estos niveles disminuyen y aumenta la citocina anti-inflamatoria IL-4. * < P 0.05

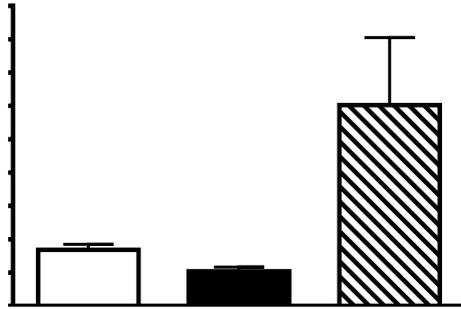
Citometría de flujo de células de exudado peritoneal

La infección con *Taenia crassiceps* induce la producción de IL-4 así como de IL-13, estas citocinas son importantes para la inducción de MAA. Los macrófagos alternativamente activados cuentan con un fenotipo de tipo Th2, que se caracteriza por tener efectos anti-inflamatorios y supresores (capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T por la presencia de PDL's), además se han relacionado con la reparación de tejidos (Correa y López, 2007).

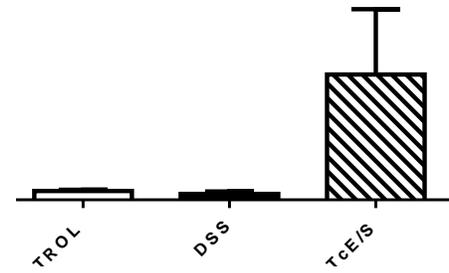
Por lo tanto, al observar que el TcES, aumentaba la producción de IL-4 a nivel sistémico, decidimos determinar si era capaz de generar una población de MAA, para esto realizamos la Citometría de flujo de células de exudado peritoneal, midiendo la población de MAA mediante la expresión de sus marcadores (F4/80+, PDL-2+, MMR+). Observamos que el grupo DSS, respecto al grupo Control no mostró diferencia significativa, sólo cierta tendencia a disminuir esta población celular, sin embargo, en el grupo DSS+TcES se encontró un aumento en el porcentaje de los MAA. Además observamos que la inyección de TcES reclutó un porcentaje mayor de células

mieloides supresoras (CD11b+, Gr1+) las cuales pueden dar origen a la formación de MAA (Fig.8 A-C).

A)



B)



C)

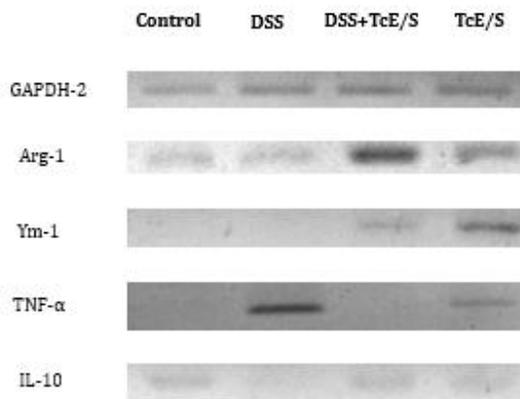


Figura 8. Citometría de flujo de células de exudado peritoneal. Se determinó la presencia de MAA mediante sus marcadores (F4/80+, PDL2+ y MMR+), así como la presencia de Células mieloides (CD11b, Gr1).

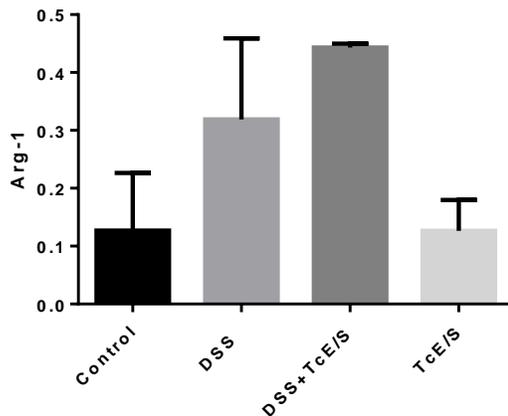
Presencia de MAA por RT-PCR

Al observar la presencia de MAA en cavidad peritoneal, decidimos determinar la expresión de ciertos genes asociados a esta población de células en el tejido del colon, que es donde se lleva a cabo el daño tisular producido por el DSS. Para esto realizamos la técnica de RT-PCR en el colon de los diferentes grupos experimentales, usando la porción distal del colon previamente lavado, el cual posteriormente se trató con Trisure para extraer el RNA y constituir el cDNA. Se determinó la presencia de Arg-1 y Ym-1, marcadores específicos de MAA (Fig. 9 B y C), así como TNF α e IL-10 (Fig. 9 D y E). Se observó la expresión de Arg-1 y Ym-1 en el grupo DSS+TcES, así como la expresión de IL-10; mientras que el grupo DSS se observó una mayor expresión de TNF- α , a diferencia del grupo DSS+TcES (Fig. 9 A).

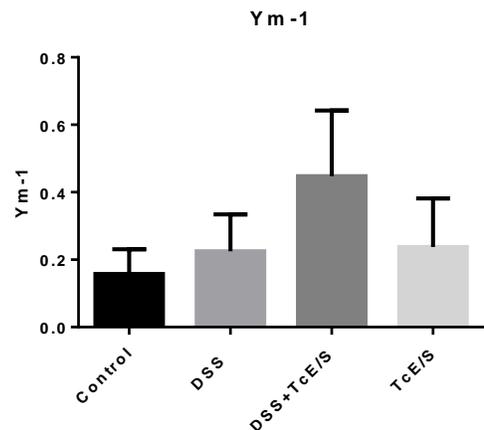
A)



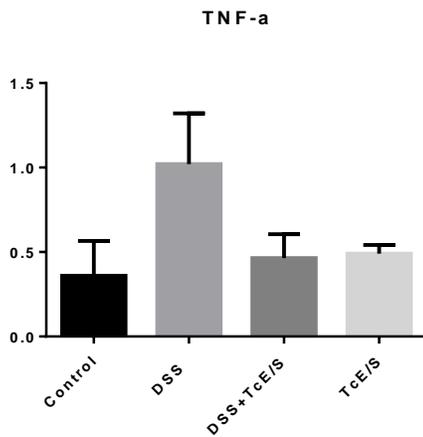
B)



C)



D)



E)

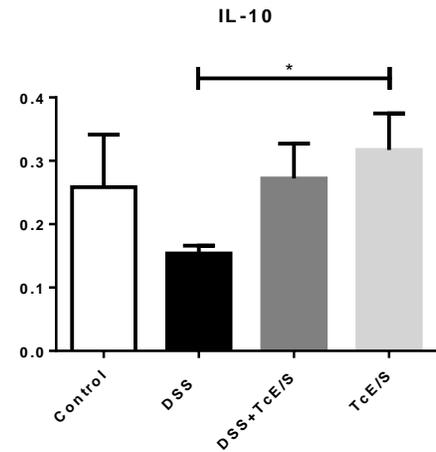


Figura 9. Presencia de MAA por RT-PCR. Se determinó la presencia de dos marcadores específicos de MAA (Arg-1 y Ym-1). * <math>P < 0.05</math>

Presencia de monocitos y neutrófilos en intestino por Citometría de flujo

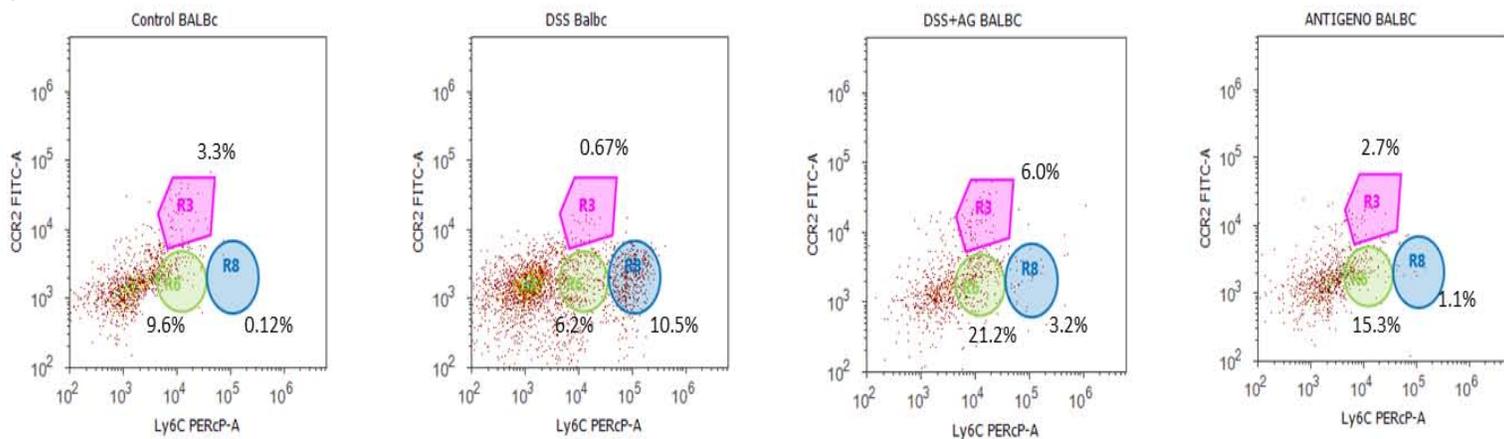
Con base a que se observó un aumento de la presencia de MAA a nivel del peritoneo en el grupo DSS+TcES, así como la expresión de genes de esta población en el intestino (colon), decidimos medir también en el intestino, poblaciones de precursores de macrófagos, como son los monocitos, mediante Citometría de flujo.

Encontramos un aumento en el porcentaje de la población de monocitos inflamatorios en el grupo DSS, comparado con el grupo Control, mientras que en el grupo DSS+TcES disminuyó este porcentaje (Fig. 10 A)

Otra población de células importantes durante el proceso inflamatorio son los neutrófilos, los cuáles son una fuente importante de TNF- α . Como habíamos visto en la gráfica de producción de citocinas en suero, esta citocina se ve elevada en el grupo DSS y disminuida en el grupo DSS+TcES, así que los neutrófilos podrían ser una de las fuentes importantes de TNF- α . Por lo tanto decidimos evaluar esta población en el

intestino y efectivamente encontramos que se ven aumentados en el grupo DSS, mientras que en presencia del TcES disminuyen (Fig. 10 B).

A)



B)

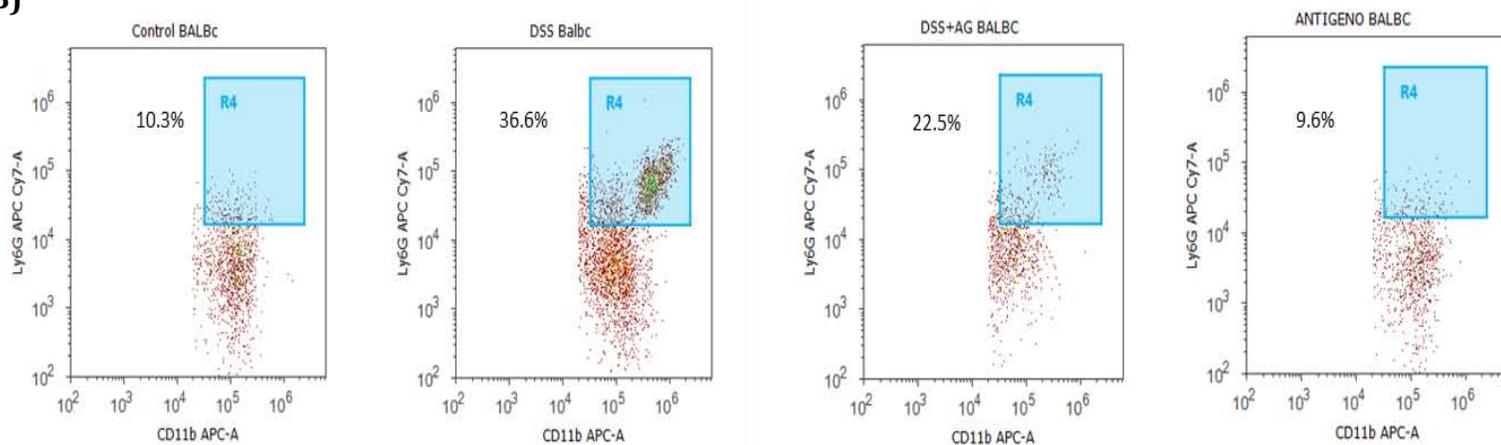


Figura 10. Presencia de monocitos (A) y neutrófilos B) en la lámina propia. Se aislaron células de la lámina propia, las cuales se marcaron con Ly6C (PercP) y CCR-2 (Fits) para determinar la presencia de monocitos y con Ly6G (Cy7) y CD11b (APC) para neutrófilos.

Depósito de colágena

Debido a que encontramos que los MAA aumentaban en presencia del TcES, y estos macrófagos se encuentran relacionados con procesos de reparación de tejidos, decidimos observar si la presencia de estos inducía algún tipo de fibrosis, que en lugar de beneficiar al tejido, lo dañara. Para esto se realizó la tinción con Tricrómica de Masson para observar las fibras de colágena del tejido muscular, las cuales se tiñen de color azul, se observó que no existen depósitos de colágena fuera de lo normal, en los grupos DSS+TcES y TcES, comparados con el grupo Control (Fig. 11).

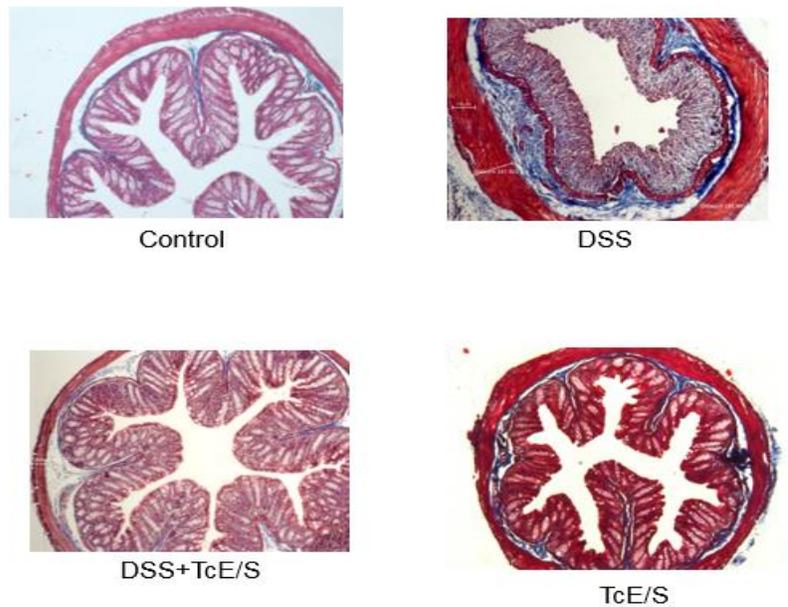


Figura 11. Depósito de colágena (Tricrómica de Masson). El grupo DSS+TcES no muestra depósitos de colágena, lo que indica que el TcES no induce ningún tipo de fibrosis.

DISCUSIÓN

Las infecciones por parásitos helmintos inducen una respuesta inmune tipo TH2, la cual se caracteriza por la producción de interleucinas como IL-4, IL-5, IL-13, inmunoglobulinas de tipo IgG1 e IgE, así como una eosinofilia y basofilia muy marcadas y la presencia elevada de mastocitos (Maizels *et al.*, 2004, Anthony *et al.*, 2007).

Esta respuesta es utilizada por el parásito como un mecanismo de evasión del sistema inmune del hospedero para lograr su supervivencia, sin embargo, estos mecanismos son tan fuertes que no sólo permiten el crecimiento y permanencia de estos parásitos de manera exitosa, sino que también impiden el desarrollo de enfermedades autoinmunes y alérgicas (Reyes *et al.*, 2011; Yazdanbakhsh *et al.*, 2001).

Existen reportes sobre el aumento en la incidencia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias tales como diabetes tipo I, esclerosis múltiple, enfermedades celíacas, asma, rinitis alérgica y EII en países en desarrollo (Weinstock *et al.*, 2005). Lo cual, según la hipótesis de la higiene, puede deberse a una menor exposición a agentes patógenos durante la infancia, ya que en estos países existen mejores condiciones de higiene y saneamiento, así como mejores medidas por parte del sector de salud y por lo tanto menos infecciones y parasitosis.

La colitis ulcerativa es una enfermedad inflamatoria intestinal multifactorial que afecta el revestimiento interno del colon y el recto (Monstand *et al.*, 2014).

Se ha reportado que las infecciones con helmintos protegen o disminuyen los efectos de algunas enfermedades caracterizadas por respuestas tipo Th1 (producción de IL-12, IFN gamma y TNF alpha), y algunos datos sugieren que la infección con algunos parásitos helmintos como *Trichinella spiralis*, *Trichuris suis*, *Hymenolepis diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *Heligmosomoides polygyrus* y *Trichuris muris* disminuyen la patología de la colitis murina experimental (Khan *et al.*, 2002; Summers *et al.*, 2005 ; Melon *et al.*, 2009; Reardon *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2007; Hanget *al.*, 2010). En el caso

de *S. mansoni* y de *H. diminuta* reportes previos sugieren que las células responsables de este fenómeno es una población de macrófagos alternativamente activados (Smith *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2010).

Otro reporte reciente sugiere que la infección con *Taenia crassiceps* inhibe el desarrollo de la colitis experimental en ratones, ya que disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias y promueve el aumento de citocinas anti-inflamatorias, además de que reduce el daño a nivel histológico y la inducción de MAA en el colon (Callejas, 2013, Ledesma-Soto, Y., et al 2015).

Debido a que varios parásitos helmintos liberan antígenos en su huésped y que éstas moléculas pueden tener efectos moduladores *in vitro* e *in vivo*, en el presente trabajo se planteó determinar el efecto modulador del TcES sobre el desarrollo de la colitis experimental inducida con DSS, ya que probablemente los efectos inmuno-reguladores que se observan en la infección pueden ser mimetizados por los productos que excreta y/o secreta el parásito.

Existen diferentes modelos experimentales para inducir el desarrollo de la colitis experimental, sin embargo, el más utilizado es el que emplea Dextran Sulfato de Sodio (DSS), un polisacárido sulfatado sintetizado compuesto de dextran y unidades de anhidroglucosa sulfatada. (Chassaing *et al.*, 2014)

Este modelo experimental está basado en el daño causado a la mucosa intestinal a través del compuesto químico DSS, ya que es claramente tóxico para las células epiteliales del colon (Perse y Cerar, 2012). Por lo que la integridad de la barrera de la mucosa se ve afectada (Wirtz y Neurath, 2007). Esto provoca un desequilibrio en la homeostasis intestinal, la entrada de ciertos antígenos y la exposición a la microbiota y por lo tanto una respuesta inflamatoria exacerbada.

La colitis experimental inducida con DSS muestra un cuadro clínico similar a la colitis ulcerativa en humanos, ya que se presentan signos como la diarrea, el sangrado rectal y la pérdida de peso, así como una reducción en la movilidad como resultado de la diarrea y la anemia (Okayasu *et al.*, 1990, Chassaing, 2014). En este trabajo se logró

montar este modelo de colitis experimental inducido con DSS, ya que observamos los signos clínicos ya mencionados, los cuales corresponden al IAE realizado por Alex en 2009.

A nivel histológico, al igual que reportó Perse y Cerar en 2012 (referencia), se observó pérdida de la estructura del colon, causada por el daño a la barrera epitelial, así como un engrosamiento de la lámina propia y deformación de las criptas, lo cual se asoció a un intenso infiltrado celular.

Este daño producido por el DSS conlleva daño a la mucosa intestinal la cual es una barrera que protege al organismo del ambiente luminal, ya que en este no sólo se encuentran nutrientes sino que también existen agentes patógenos para el organismo. Esta barrera contribuye al mantenimiento de la homeostasis intestinal (Zangh, *et al.*, 2015).

Dentro de las células que conforman esta barrera se encuentran las células caliciformes, las cuales se encargan de secretar mucina, uno de los principales componentes estructurales de la capa de moco, la cual contribuye a la protección de la mucosa intestinal, ya que contiene abundantes carbohidratos que enlazan a las bacterias, previniendo una colonización en el epitelio. Además de ser una de las primeras líneas de defensas que protege al organismo de una gran variedad de patógenos (Dharmani, *et al.*, 2009).

Por lo tanto estas células son relevantes en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, ya que si las células caliciformes son dañadas o se encuentran disminuidas, se perdería parte de esta barrera intestinal permitiendo la entrada de agentes patógenos al organismo y generando un desequilibrio en la respuesta inmune.

En nuestro modelo de colitis inducida con DSS, al realizar la tinción con Alcian Blue la cual tiñe tejidos que contienen grupos aniónicos tales como mucinas con ácido y otros carbohidratos ácidos, observamos una disminución de las células caliciformes en el grupo de DSS, comparado con el grupo Control, lo cual sugiere que durante la colitis experimental, la ausencia de estas células productoras de mucina contribuye al

deterioro del colon generando un mayor daño tisular. Sin embargo, al tratar a los animales con DSS+TcES, observamos que la presencia de mucina secretada por las células caliciformes se mantuvo prácticamente a niveles normales lo que sugiere que el TcES induce la producción de mucina por parte de estas células para mantener esa barrera de protección frente a posibles daños.

Como se mencionó anteriormente el modelo de la colitis experimental mostró además de la disrupción de la mucosa, un engrosamiento de la lámina propia y deformación de las criptas, esto se debe a la inflamación causada por el infiltrado celular hacia el tejido dañado (Qin, 2012).

Estas diferencias a nivel histológico posiblemente se encuentran asociadas con algún mediador inflamatorio, así que decidimos medir dos citocinas en suero que son importantes para determinar las diferencias presentes en los diferentes grupos, la primera fue TNF- α ya que existen reportes que confirman la presencia de esta citocina en niveles elevados en biopsias intestinales de pacientes con colitis ulcerativa, así como en modelos de colitis experimental (Strober y Fuss 2011). La segunda citocina que medimos fue IL-4, ya que al tratarse de una citocina anti-inflamatoria podríamos determinar el contraste respecto a TNF- α . Además, esta citocina al encontrarse elevada durante la infección con *Taenia crassiceps* es importante para determinar si la presencia del antígeno de este parásito también la aumenta. Además la citocina IL-4 es un factor que promueve la activación alternativa de los macrófagos (Van Dyken y Locksley, 2013).

Al analizar los resultados encontramos que en el grupo DSS hubo un aumento de TNF- α respecto al grupo Control, tal como lo reportaron Strober y Fuss en el 2011, este aumento se correlaciona al daño histopatológico causado durante la colitis ulcerativa (Akazawa, 2002). En contraste en el grupo DSS+TcES no existió un aumento significativo de esta citocina, lo que sugiere que la presencia del TcES inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias, evitando una inflamación exacerbada; en cuanto a los niveles en la producción de IL-4, encontramos niveles elevados de ésta

citocina en el grupo DSS+TcES respecto al grupo DSS, lo cual indica que el TcES promueve la producción de IL-4.

Otra citocina que medimos fue IL-1 β , ya que se trata de una citocina pro-inflamatoria asociada con las EII, producida principalmente por los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos. Se sabe que la estimulación con IL-1 β promueve las funciones de activación y efectoras de las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos (Dinarello, 1996). Además esta citocina es capaz de promover neutrofilia así como la migración de los neutrófilos al sitio de inflamación (Dinarello, 2009).

En nuestro modelo experimental se observó un aumento de esta citocina en el tejido del colon, tal como lo reportó Autschbach y colaboradores en el 2002. Esta citocina se encuentra presente de forma activa durante las EII aumentando el grado de afectación de la mucosa del colon.

Como se mencionó anteriormente, el TcES induce la producción de IL-4 la cual es una citocina de gran importancia ya que además de promover la diferenciación de linfocitos hacia un perfil de tipo th2 y la proliferación y diferenciación de linfocitos B, promueven la presencia de MAA (Stein et al 1992). Además, *Taenia crassiceps* y sus antígenos, al igual que otros parásitos helmintos tienen la capacidad de modular las respuestas inmunes de sus hospederos, generalmente polarizando hacia una respuesta tipo Th2 (Peón, Espinoza-Jiménez, y Terrazas, 2012).

Por lo tanto decidimos determinar la presencia de esta población en muestras de exudado peritoneal, observando la presencia de MAA de manera elevada en el grupo DSS+TcES y posiblemente la concentración elevada de IL-4 sea una de la principales causas.

Otra población que encontramos aumentada en comparación con el grupo control fueron las células mieloides supresoras, por lo que el TcES tiene la capacidad de inducir la presencia de estas células, las cuales a su vez pudieran estar dando origen a los MAA que como mencionamos anteriormente, se encontraron elevados en el grupo DSS+TcES.

Debido a que esto fue a nivel sistémico, y el principal daño se produce en el tejido del colon, decidimos determinar si los MAA estaban presentes in situ, midiendo la expresión de ciertos genes asociados a estos macrófagos en el colon (Arg-1 y Ym-1) mediante la técnica de RT-PCR con tejido del colon, ya que se ha reportado la presencia de esta población celular en la respuesta inmune tipo Th2 (Rodríguez-Sosa, et al 2002, Kreider. T, *et al.*, 2007, Reyes J.L. Terrazas L.I. 2007). El hecho que los niveles de Arg-1 y Ym-1 se encontraran elevados es un indicio de que el tratamiento con TcES induce la diferenciación y reclutamiento de MAA al sitio de daño inflamatorio, donde probablemente el papel de éstas células sea el de reparar rápidamente el tejido y evitar la proliferación celular dañina para el colon, estos datos concuerdan con lo reportado por Melon en el 2009.

Sin embargo, no se sabe si los TcES reclutan a estas células hacia el tejido dañado o actúa de forma directa sobre los macrófagos que ahí se encuentran (residentes), modificando su perfil hacia uno de tipo alternativo.

La presencia de estos macrófagos juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune por parte del hospedero, ya que se ha reportado su capacidad de inhibir la respuesta proliferativa de las células TCD4+, este efecto es contacto dependiente y es causado principalmente por la interacción PD-1/PD-L's (Terrazas *et al.*, 2005). Por lo tanto estos MAA al tener una capacidad supresora, influyen de manera significativa en la regulación de sucesos inmunológicos pro-inflamatorios, suprimiendo estas respuestas. Estos macrófagos además de tener capacidad supresora, están relacionadas en el proceso de reparación de tejidos y cicatrización (Rodero y Khosrotehrani, 2010).

Otros marcadores que decidimos medir en el colon fueron TNF- α e IL-10, la primera ya que estaba aumentada en el suero del grupo DSS, por tratarse de una citocina pro-inflamatoria; y la segunda por tratarse de una citocina reguladora importante, que actúa de forma directa sobre la proliferación y diferenciación de los linfocitos T. Además se ha reportado en la regulación inmune de ciertos helmintos, protegiendo a su vez al huésped (Melon 2009).

La primera se encontró elevada, como era de esperarse por tratarse de una citocina pro-inflamatoria, en el grupo de DSS, mientras que en el grupo DSS+TcES se encontró disminuida. Con respecto a IL-10, se encontró disminuida en el grupo DSS y elevada en el grupo DSS+TcES, al igual que lo reportó Callejas en el 2013, con la infección, sin embargo al tratarse del mismo parásito, podemos deducir que sus antígenos excretados/secretados son los responsables de dicha regulación inmune.

Otras poblaciones de importancia para nuestro modelo experimental, son los monocitos y los neutrófilos, los primeros por tratarse de los precursores de los macrófagos y los segundos por ser una población importante en los procesos inflamatorios, como la inflamación del colon durante la colitis experimental, además de ser una fuente importante de TNF- α , la cual encontramos elevada en los animales con colitis.

Dentro de los monocitos, existen dos sub-poblaciones, los llamados monocitos inflamatorios (Ly6C) y los monocitos anti-inflamatorios (Ly6G) (Bain y Mowat 2014). Se ha reportado que los monocitos inflamatorios se encuentran presentes cuando existe algún daño, contribuyendo a la eliminación de los patógenos que originan dicho daño. Sin embargo, no en todos los modelos ocurre lo mismo, ya que en las EII esta población al estar elevada favorece a un mayor daño en el tejido, produciendo una inflamación exacerbada.

En este trabajo encontramos niveles elevados de monocitos inflamatorios en el grupo DSS, mientras que en el grupo de DSS+TcES esta población se redujo de manera significativa, lo cual nos indica que la presencia del Tc ES favorece a la modulación de estas células durante la colitis experimental, reduciendo el daño ocasionado.

Por otro lado, los neutrófilos se encontraron aumentados en el grupo DSS (colitis experimental), comparados con el grupo DSS+TcES, lo cual sugiere que el TcES inhibe el reclutamiento de esta población.

Por último decidimos medir los depósitos de colágena presentes en el colon, ya que se ha reportado que los MAA se encuentran relacionados con procesos de reparación de

tejidos, y al encontrarse elevados en el grupo DSS+TcES decidimos observar si esta población pudiera estar causando algún tipo de fibrosis en el colon. Para esto realizamos la tinción Tricrómica de Masson, la cual tiñe los depósitos de colágena, sin embargo observamos que no existen características en el tejido que indiquen fibrosis, ni exceso de colágena, lo cual nos indica que la inoculación repetida de TcES no tiene efectos secundarios como una posible fibrosis.

En conjunto estos datos apoyan la idea que las moléculas liberadas o excretadas por la fase larvaria de *T. crassiceps* promueven una protección frente al daño causado por el DSS, induciendo una población de macrófagos activados de manera alternativas y disminuyendo a los monocitos inflamatorios los cuales favorecen una inflamación exacerbada en el colon. Estos mecanismos de regulación inmune por TcES, están acompañados con la regulación de citocinas presentes durante la patogenia, ya que se presenta un aumento de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10, inhibiendo la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β , lo cual contribuye al proceso de modulación del desarrollo de la colitis experimental; además comprobamos que TNF- α es un factor importante que promueve el inicio y desarrollo de la inflamación en la colitis experimental.

Todas estas observaciones indican el potencial que tiene el TcES como un modulador sobre la respuesta inmune inflamatoria del huésped, polarizando esta respuesta hacia un perfil tipo Th2 y su vez evitando una respuesta inmune inflamatoria exacerbada ayudando a prevenir y a controlar una patología como la colitis experimental.

CONCLUSIONES

El tratamiento con TcES disminuye los signos asociados a la colitis experimental.

En presencia del TcES existe un menor infiltrado inflamatorio en el colon, tanto en la submucosa como en la lámina propia.

La inyección continua de TcES promueve el mantenimiento de las células caliciformes durante la colitis experimental.

El TcES disminuye los niveles de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL- β , mientras que aumenta el de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10, a nivel RNA mensajero y proteína.

La exposición constante a TcES recluta una población de MAA, incrementa el porcentaje de células mieloides supresoras, y reduce el infiltrado de neutrófilos y de monocitos inflamatorios en el colon.

La inoculación del TcES no genera fibrosis en el colon.

La aplicación diaria de TcES inhibe el desarrollo de la colitis experimental.

ANEXOS

Tinción Hematoxilina-Eosina (H&E)

Xilol 10'

Alcohol-Xilol 3'

OH 100% 3'

OH 90% 2'

OH 80% 2'

OH 70% 1'

Hematoxilina de Harris 10''

Agua corriente-enjuague

Eosina alcohólica 30''

Agua corriente-enjuague

OH 70% 1'

OH 80% 1'

OH 90% 1'

OH 100% 2'

Xilol 5'

Tinción Alcian Blue

Xilol 10'

Alcohol-Xilol 3'

OH 100% 3'

OH 90% 2'

OH 80% 2'

OH 70% 2'

Agua corriente 3'

Alcian blue 30''
Agua corriente (lavar)
Hematoxilina 3' 30''
Agua corriente (Lavado)
HCL 0.25% 5''
Agua corriente (Lavado)
Agua amoniaca 0.25% 3''
Agua corriente (Lavado)
OH 70% 1'
Eosina 30'' (sumergir y sacar constantemente)
OH 95% 1'
OH 100% 1'
Xilol 5'
Montar con Entellan y dejar secar

Extracción de RNA por la técnica Fenol-Cloroformo

Agregar 200 µl de cloroformo
Agitar en vortex 30''
Dejar reposar durante 5' a temperatura ambiente
Centrifugar a 13500 rpm durante 15'
Recuperar la fase transparente en tubos de 1.5 ml
Agregar 500ul de Isopropanol
Invertir y meter durante 15 ' a -20°C
Agitar levemente en vortex

Centrifugar a 13500 rpm durante 15'

Retirar exceso de Isopropanol

Agregar 1 ml de etanol al 75%

Centrifugar a 10000 rpm durante 10'

Decantar etanol

Dejar secar durante 5-10'

Hidratar con 25 μ l de agua inyectable

REFERENCIAS

- Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T. E., Conklin, L. S., ...& Li, X. (2009). Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 15(3), 341-352.
- Akazawa, A., Sakaida, I., Higaki, S., Kubo, Y., Uchida, K., & Okita, K. (2002). Increased expression of tumor necrosis factor- α messenger RNA in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease, particularly in patients with disease in the inactive phase. *Journal of gastroenterology*, 37(5), 345-353.
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Stadecker, M. J., & Gause, W. C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, 7(12), 975-987.
- Añez, M., Fuenmayor, M., & Romero, G. (2012). Enfermedad inflamatoria intestinal: rectocolitis úlceroidea idiopática y enfermedad de Crohn. *Gen*, 66(3), 197-206.
- Autschbach, F., Giese, T., Gassler, N., Sido, B., Heuschen, G., Heuschen, U., ... & Meuer, S. C. (2002). Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Archiv*, 441(5), 500-513.
- Bain, C. C., & Mowat, A. M. (2014). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological reviews*, 260(1), 102-117.
- Baird, M., Fuss, I. J., Chu, A., & Strober, W. (1998). Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *The Journal of experimental medicine*, 188(10), 1929-1939.
- Callejas, B. E. 2013. Modulación de la colitis experimental por la infección con *Taenia crassiceps*. (Tesis de licenciatura). UNAM. Facultad de estudios superiores Iztacala. Los Reyes Iztacala.
- Carter, M. J., Lobo, A. J., & Travis, S. P. (2004). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 53(suppl 5), v1-v16.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Current Protocols in Immunology*, 15-25.
- Chassaing, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2011). The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1720-1728.
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., & Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 69(2), 238-249.
- Correa, M. D., & López, M. R. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, 26(2), 73-86.

- D'Haens, G. R., Sartor, R. B., Silverberg, M. S., Petersson, J., & Rutgeerts, P. (2014). Future directions in inflammatory bowel disease management. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(8), 726-734.
- Dharmani, P., Srivastava, V., Kissoon-Singh, V., & Chadee, K. (2009). Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of innate immunity*, 1(2), 123-135.
- Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6), 2095-2147.
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology*, 27, 519-550.
- Dotson, J. L., Hyams, J. S., Markowitz, J., LeLeiko, N. S., Mack, D. R., Evans, J. S., ... & Crandall, W. (2010). Extraintestinal manifestations of pediatric inflammatory bowel disease and their relation to disease type and severity. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 51(2), 140-145.
- Economou, M., Zois, C., & Tsianos, E. V. (2005). Advances in genetics of IBD: the NOD2/CARD15 gene. *Annals of Gastroenterology*, 18(4), 395-401.
- Elson, C. O., Cong, Y., McCracken, V. J., Dimmitt, R. A., Lorenz, R. G., & Weaver, C. T. (2005). Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological reviews*, 206(1), 260-276.
- Espinoza-Jiménez, A., Rivera-Montoya, I., Cárdenas-Arreola, R., Morán, L., & Terrazas, L. I. (2010). *Taenia crassiceps* infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *BioMed Research International*, 2010.
- Fundora Hernández, H., Menocal Heredia, L. T., Rosado García, F. M., Venero Fernández, S. J., & Rodríguez Bertheau, A. M. (2013). Geohelminthiasis, asma y enfermedad alérgica. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(3), 320-330.
- Gómez- García, L., López Marín, L. M., Saavedra, R., Reyes, J. L., Rodríguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2005). Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite immunology*, 27(10-11), 395-405.
- Gómez-García, L., Rivera-Montoya, I., Rodríguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2006). Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitology research*, 99(4), 440-448.
- Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, 22, 14-19.
- Håkansson, Å., Tormo-Badia, N., Baridi, A., Xu, J., Molin, G., Hagslätt, M. L., ... & Ahrné, S. (2014). Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice. *Clinical and experimental medicine*, 15(1), 107-120.

- Hang, L., Setiawan, T., Blum, A. M., Urban, J., Stoyanoff, K., Arihiro, S., ...& Weinstock, J. V. (2010). *Heligmosomoides polygyrus* infection can inhibit colitis through direct interaction with innate immunity. *The journal of immunology*, *185*(6), 3184-3189.
- Harrison, O. J., &Maloy, K. J. (2011). Innate immune activation in intestinal homeostasis. *Journal of innate immunity*, *3*(6), 585-593.
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R., & Maizels, R. M. (2009). Helminth immuno regulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and biochemical parasitology*, *167*(1), 1-11.
- Hunter, M. M., Wang, A., Parhar, K. S., Johnston, M. J., Van Rooijen, N., Beck, P. L., & McKay, D. M. (2010). In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. *Gastroenterology*, *138*(4), 1395-1405.
- Itoh, H., Beck, P. L., Inoue, N., Xavier, R., &Podolsky, D. K. (1999). A paradoxical reduction in susceptibility to colonic injury upon targeted transgenic ablation of goblet cells. *Journal of Clinical Investigation*, *104*(11), 1539-1547.
- Karlinger, K., Györke, T., Makö, E., Mester, Á.,&Tarján, Z. (2000). The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European journal of radiology*, *35*(3), 154-167.
- Kayama, H., Nishimura, J., &Takeda, K. (2013). Regulation of intestinal homeostasis by innate immune cells. *Immune network*, *13*(6), 227-234.
- Khan, W. I., Blennerhasset, P. A., Varghese, A. K., Chowdhury, S. K., Omsted, P., Deng, Y., & Collins, S. M. (2002). Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infection and immunity*, *70*(11), 5931-5937.
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., &Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*, *146*(6), 1489-1499.
- Kreider, T., Anthony, R. M., Urban, J. F., &Gause, W. C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current opinion in immunology*, *19*(4), 448-453.
- Kwon, K. H., Murakami, A., Hayashi, R., &Ohigashi, H. (2005). Interleukin-1 β targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochemical and biophysical research communications*, *337*(2), 647-654.
- Ledesma-Soto, Y., Callejas, B. E., Terrazas, C. A., Reyes, J. L., Espinoza-Jiménez, A., González, M. I., ...&Terrazas, L. I. (2015). Extraintestinal Helminth Infection Limits Pathology and Proinflammatory Cytokine Expression during DSS-Induced Ulcerative Colitis: A Role for Alternatively Activated Macrophages and Prostaglandins. *BioMed Research International*, 2015.
- Loftus, E. V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, *126*(6), 1504-1517.
- Maillard, H., Marionneau, J., Prophette, B., Boyer, E., &Celierier, P. (1998). *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *Aids*, *12*(12), 1551-1552.

- Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., & Allen, J. E. (2004). Helminth parasites—masters of regulation. *Immunological reviews*, 201(1), 89-116.
- Maloy, K. J., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 298-306.
- Mayer, L.. 2005. Mucosal immunity. *Immunological Review*. 206:1595-1600.
- Melon, A., Wang, A., Phan, V., & McKay, D. M. (2009). Infection with *Hymenolepis diminuta* is more effective than daily corticosteroids in blocking chemically induced colitis in mice. *BioMed Research International*, 2010.
- Molodecky, N. A., Soon, S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., ...& Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), 46-54.
- Monstad, I., Hovde, Ø., Solberg, I. C., & Moum, B. A. (2014). Clinical course and prognosis in ulcerative colitis: results from population-based and observational studies. *Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 27(2), 95-104.
- Neurath, M., Fuss, I., & Strober, W. (2000). TNBS-colitis. *International reviews of immunology*, 19(1), 51-62.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., ...& Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 603-606.
- Okano, M., Satoskar, A. R., Nishizaki, K., Abe, M., & Harn, D. A. (1999). Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *The Journal of Immunology*, 163(12), 6712-6717.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694-702.
- Ortigosa, L. (2005). Concepto actual y aspectos clínicos de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. *Colombia Médica*, 36(2 Supl 1), 16-24.
- Peón, A. N., Espinoza-Jiménez, A., & Terrazas, L. I. (2012). Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *BioMed research international*, 2013.
- Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *BioMed Research International*, 2012.
- Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, 347(6), 417-29.
- Qin, X. (2012). Etiology of inflammatory bowel disease: a unified hypothesis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 18(15), 1708.

- Raes, G., Brys, L., Dahal, B. K., Brandt, J., Grooten, J., Brombacher, F., ... & Ghassabeh, G. H. (2005). Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(3), 321-327.
- Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A., & Castell, M. (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(1), 29-34.
- Reardon, C., Sanchez, A., Hogaboam, C. M., & McKay, D. M. (2001). Tapeworm infection reduces epithelial ion transport abnormalities in murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *Infection and immunity*, 69(7), 4417-4423.
- Reyes, J. L., Espinoza-Jiménez, A. F., González, M. I., Verdin, L., & Terrazas, L. I. (2011). *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular immunology*, 267(2), 77-87.
- Reyes, J. L., Terrazas, C. A., Vera-Arias, L., & Terrazas, L. I. (2009). Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1115-1127.
- Reyes, J. L., y Terrazas, L. I. (2007). The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite immunology*, 29(12), 609-619.
- Rodero, M. P., & Khosrotehrani, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *International journal of clinical and experimental pathology*, 3(7), 643-653.
- Rodríguez, M., Terrazas, L. I., Marquez, R., & Bojalil, R. (1999). Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite immunology*, 21(4), 177-185.
- Rodríguez-Sosa, M., Satoskar, A. R., Calderón, R., Gomez-Garcia, L., Saavedra, R., Bojalil, R., & Terrazas, L. I. (2002). Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infection and Immunity*, 70(7), 3656-3664.
- Smith, P. D., Ochsenbauer-Jambor, C., & Smythies, L. E. (2005). Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunological reviews*, 206(1), 149-159.
- Smith, P., Mangan, N. E., Walsh, C. M., Fallon, R. E., McKenzie, A. N., van Rooijen, N., & Fallon, P. G. (2007). Infection with a helminth parasite prevents experimental colitis via a macrophage-mediated mechanism. *The journal of immunology*, 178(7), 4557-4566.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine*, 176(1), 287-292.
- Strober, W., Fuss, I., & Mannon, P. (2007). The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 514-521.

- Strober, W., y Fuss, I. J. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1756-1767.
- Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F., Thompson, R. A., & Weinstock, J. V. (2005). Trichuris therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 128(4), 825-832.
- Targan, S. R., & Karp, L. C. (2005). Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunological reviews*, 206(1), 296-305.
- Terrazas, C. A., Gómez-García, L., & Terrazas, L. I. (2010). Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: a critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *International journal for parasitology*, 40(9), 1051-1062.
- Terrazas, C. A., Sánchez-Muñoz, F., Mejía-Domínguez, A. M., Amezcua-Guerra, L. M., Terrazas, L. I., Bojalil, R., & Gómez-García, L. (2011). Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. *International journal of biological sciences*, 7(9), 1391-1400.
- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T., & Larralde, C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of parasitology*, 74-81.
- Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C. A., Reyes, J. L., & Rodríguez-Sosa, M. (2005). Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *International journal for parasitology*, 35(13), 1349-1358.
- Thomas, P. G., & Harn, D. A. (2004). Immune biasing by helminth glycans. *Cellular microbiology*, 6(1), 13-22.
- Van Dyken, S. J., & Locksley, R. M. (2013). Interleukin-4-and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annual review of immunology*, 31, 317-343.
- Weinstock, J. V., Summers, R. W., & Elliott, D. E. (2005, June). Role of helminths in regulating mucosal inflammation. In *Springer seminars in immunopathology* 27(2):249-271.
- Willms, K., & Zurabian, R. (2010). *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology*, 137(03), 335-346.
- Wirtz, S., & Neurath, M. F. (2007). Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced drug delivery reviews*, 59(11), 1073-1083.
- Yamada, T., Deitch, E., Specian, R. D., Perry, M. A., Sartor, R. B., & Grisham, M. B. (1993). Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation*, 17(6), 641-662.

Yamamoto-Furusho, J., Rodríguez-Bores, L., González-Contreras, Q., & Martínez-Benítez, B. (2010). Prevalence and clinical features of indeterminate colitis in Mexico: A 17-year study. *Rev GastroenterolMex*, 75, 30-5.

Yazdanbakhsh, M., Kreamsner, P. G., & van Ree, R. (2002). Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, 296(5567), 490-494.

Zhang, K., Hornef, M. W., & Dupont, A. (2015). The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cellular microbiology*.