

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Regulación de la Diabetes Mellitus tipo 1
(T1DM) por Macrófagos Alternativamente
Activados inducidos por el cestodo
Taenia crassiceps

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. ARLETT FABIOLA ESPINOZA JIMENEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

MEXICO, D.F

ENERO

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

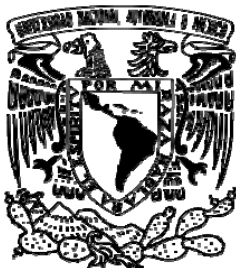


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Regulación de la Diabetes Mellitus tipo 1
(T1DM) por Macrófagos Alternativamente
Activados inducidos por el cestodo
Taenia crassiceps

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. ARLETT FABIOLA ESPINOZA JIMENEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

MEXICO, D.F

ENERO

2010


Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de Septiembre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ESPINOZA JIMÉNEZ ARLETT FABIOLA** con número de cuenta **097332943** con la tesis titulada "**REGULACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 (T1DM) POR MACRÓFAGOS ALTERNATIVAMENTE ACTIVADOS INDUCIDOS POR EL CÉSTODO *Taenia crassiceps*.**", realizada bajo la dirección del **DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS:**

Presidente: DRA. ANA FLISSER STEINBRUCK
Vocal: DRA. LIBIA VEGA LOYO
Secretario: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
Suplente: DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
Suplente: DR. GERARDO GAMBA AYALA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de Noviembre de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A los apoyos recibidos por:

CONACYT 60956-M

PAPIIT IN212909-3

A los miembros del Jurado:

Dra. Ana Flisser Steinbruch

Dra. Libia Vega Loyo

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Dr. Rafael Villalobos Molina

Dr. Gerardo Gamba Ayala

Por sus importantes comentarios en la elaboración de la tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A LA FES, IZTACALA

A LA UNIDAD DE BIOMEDICINA

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por su apoyo, asesoría y conocimientos

A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Luis Ignacio Terrazas V.

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Dr. Rafael Villalobos Molina

Por sus importantes observaciones, sugerencias y supervisión durante el desarrollo de la presente investigación

A mis compañeros y amigos del laboratorio 5 y 8

INDICE GENERAL

	Pagina
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ABREVIACIONES.....	3
INTRODUCCIÓN	
Diabetes Mellitus tipo 1.....	4
Factores Genéticos y Ambientales.....	5
Hipótesis de la Higiene.....	7
Inmunoregulación por helmintos.....	8
Parásitos y Diabetes tipo 1.....	9
Respuesta Inmune a <i>Taenia crassiceps</i>	9
Macrófagos Alternativamente Activados.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	14
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
MATERIALES Y	
MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
APÉNDICE.....	49

RESUMEN

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune causada por la destrucción selectiva de células β productoras de insulina localizadas en los islotes de Langerhans en el páncreas. Cuando la mayoría de las células β son destruidas, la habilidad del páncreas para secretar insulina en respuesta a los niveles de glucosa es deficiente, resultado de la destrucción de la homeostasis. Estudios previos han demostrado que múltiples dosis bajas de estreptozotocina (DB-STZ) inducen diabetes, considerándose una herramienta fácil para entender el mecanismo básico asociado con el origen y modulación de la diabetes tipo 1 inducida. La diabetes tipo 1 se ha correlacionado predominantemente con el fondo genético así como por el perfil de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-12 e IFN- γ . *Taenia crassiceps* al igual que otros helmintos, pueden ejercer efectos reguladores sobre el sistema inmune de sus hospederos. En este estudio, investigamos el efecto de la infección crónica de *T. crassiceps* sobre el modelo de DB-STZ. Ratones previamente infectados o sanos recibieron DB-STZ y los síntomas de la diabetes se evaluaron por 6 semanas posteriores a la inducción de la diabetes. Los ratones infectados con *T. crassiceps* (STZ/Tc) presentaron menores niveles de glucosa en sangre que los ratones diabéticos (STZ). Solamente un porcentaje bajo de los animales STZ/Tc desarrollaron diabetes (50%) en comparación con el grupo con STZ (100%). No hubo insulinitis en los ratones STZ/Tc, en los cuales se presentó un contenido normal de insulina, mientras que los animales con STZ mostraron insulinitis y una dramática reducción del contenido de insulina en los islotes pancreáticos. Los ratones infectados que recibieron DB-STZ no tuvieron un incremento en la población de células T reguladoras, sin embargo, sí presentaron un gran número de macrófagos alternativamente activados (AAM Φ), altos niveles de IL-4 y bajos niveles de TNF- α . Los antígenos de *T. crassiceps* son protectores, aunque requieren una constante administración y no son tan eficientes como la infección. En conclusión, la infección con *T. crassiceps* causa una inmuno-modulación que modifica la incidencia y desarrollo de la diabetes autoinmune con el modelo de DB-STZ.

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease that is caused by the selective destruction of insulin-producing β cells located in pancreatic Langerhans' islets. When the majority of β cells are destroyed, the pancreas' ability to secrete insulin in response to blood glucose levels is impaired, resulting in a disruption of glucose homeostasis. Previous studies have shown that the Multiple Low Dose Streptozotocin-Induced Diabetes (MLDS)-induced diabetes model is a useful tool for understanding the basic mechanisms associated with the origin and modulation of induced T1D. T1D has been correlated predominantly with genetic background as well as pro-inflammatory cytokine profiles for TNF- α , IL-12 and IFN- γ . *Taenia crassiceps*, like other helminths, can exert regulatory effects on the immune system of its host. This study investigates the effect of chronic *T. crassiceps* infection on the outcome of (MLDS). Healthy or previously *T. crassiceps*-infected mice received MLDS, and T1D symptoms were evaluated for 6 weeks following the induction of MLDS. *T. crassiceps*-infected mice displayed lower blood glucose levels throughout the study. A significantly lower percentage of *T. crassiceps*-infected mice (50%) developed T1D compared to the uninfected group (100%). Insulinitis was remarkably absent in *T. crassiceps*-infected mice, which had normal pancreatic insulin content, whereas uninfected mice showed a dramatic reduction in pancreatic insulin. Infected mice that received MLDS did not show an increase in their regulatory T cell population, however, they had a greater number of alternatively activated macrophages, higher levels of interleukine-4, and lower levels of tumor necrosis factor- α . *T. crassiceps* antigens confer protection against diabetes although they require constant administration and are not as efficient as the infection. Therefore, infection with *T. crassiceps* causes an immuno-modulation that modifies the incidence and development of MLDS-induced autoimmune diabetes.

ABREVIACIONES

AAMΦ	Macrófagos Alternativamente Activados
ABTS	2,2'-azino-bis [3-ethylbenziazoline-6-sulfónico
CAMΦ	Macrófagos Clásicamente Activados
DAB	3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato
DB-STZ	Dosis bajas de estreptozotocina
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FACS	Citometría de Flujo
FITC	Fluoresceína
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
i.p	intraperitoneal
LPS	Lipopolisacarido
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NKT	Células T asesinas naturales
ON	Oxido Nítrico
OH	Etanol
PBS	Amortiguador de Fosfatos
PE	Ficoeritrina
p.i	post-inducción
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
STZ	Estreptozotocina
STZ/Tc	Ratones previamente infectados con <i>T. crassiceps</i> y con dosis bajas de
STZ	
Tc	Ratones solamente infectados con <i>T. crassiceps</i>
Th	Células T cooperadoras
TNF-α	Factor de Necrosis tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
T1DM	Diabetes Mellitus tipo 1
NOD	Ratón diabético no obeso (Non-obese diabetic mice)

INTRODUCCIÓN

Diabetes Mellitus tipo 1

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada a disfunción y falla de varios órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. La diabetes se divide en dos categorías principales: tipo 1, que provoca una absoluta deficiencia en la secreción de insulina; y tipo 2, que es la más común y la causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta secretora de insulina compensatoria [1].

La diabetes tipo 1 aparece en el 90% de los niños con diabetes y en el 5-10% de adultos diabéticos; más de 5.3 millones de personas en todo el mundo tienen diabetes tipo 1, y alrededor de 218 000 personas desarrollan la enfermedad cada año. Europa presenta el número de casos mayor, con 1.6 millones de personas afectadas, seguido por América con ~ de 1 millón. África tiene el número menor de diabéticos, con aproximadamente 100 000 individuos [2, 3]. El desarrollo de dicha enfermedad se debe al ataque agresivo de las células inmunes sobre las células β productoras de insulina de los islotes pancreáticos. La enfermedad sigue dos etapas principales: la insulinitis, en la cual, una mezcla de leucocitos invaden los islotes de Langerhans, promoviendo la muerte de las células β ; y la diabetes, donde una gran cantidad de células β son destruidas y el páncreas no puede producir la suficiente insulina para controlar los niveles de glucosa en sangre [4]. Estudios prospectivos con pacientes prediabéticos con diabetes tipo 1 han mostrado que el proceso de degeneración de las células β puede tomar más de tres años, antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente [5].

Estreptozotocina

La diabetes mellitus tipo 1 en los animales también puede ser inducida y se han utilizado varias estrategias para generar hiperglucemia en el contexto de insulinitis. Un tipo de modelo se basa en la inducción de diabetes por medio de dosis bajas de estreptozotocina (DB-STZ). La STZ es una toxina derivada de *Streptomyces achromogenes* que consiste en una molécula de glucosa con una porción alquilante

nitrosurea. La administración de STZ a cepas susceptibles de ratones puede inducir diabetes. El desarrollo de diabetes inducida por STZ es dependiente de la cepa de ratón, la dosis y frecuencia de administración [6, 7]. Se ha demostrado que la aplicación de dosis bajas múltiples de STZ induce diabetes en ratones de cepas susceptibles, lo que requiere de una reacción inflamatoria dependiente de células Th1. El proceso depende del transportador de glucosa GLUT-2 en las células β , quizá comprende al gen de la polimerasa Poly ADP-ribosa (PARP) y abarca también la vía coestimulante CD28-B7 para activar linfocitos T [8].

La STZ presenta propiedades alcalinas potentes, actúa también como productor de especies reactivas de oxígeno. En dosis altas tiene potencial diabetogénico por su capacidad de promover selectivamente la muerte de las células β por apoptosis o necrosis [8]. A dosis bajas no aparece la toxicidad, aunque la tolerancia inmunológica a antígenos del islote es defectuosa, resultando en el desarrollo de anticuerpos hacia varios antígenos de la célula β como el ácido glutámico descarboxilasa (GAD-65), insulina y la proteína de choque de calor 60 [7].

Factores Genéticos y Ambientales

No está claro que es lo que inicia la cascada que lleva a la autoinmunidad en la diabetes, pero se sabe que se necesitan de factores genéticos y ambientales que contribuyen a la enfermedad [9]. El complejo HLA (Complejo Principal de Histocompatibilidad o MHC) fue la primera región que se encontró asociada con la diabetes tipo 1 [10]. El HLA sobre el cromosoma 6 es el principal locus que está asociado con la enfermedad y se considera que contribuye en más del 40% en la inducción de diabetes tipo 1. Dos combinaciones de genes del HLA son de particular importancia: DR4-DQ8 y DR3-DQ2, que están presentes en el 90% de los niños con diabetes tipo 1; un tercer haplotipo, DR15-DQ6 se encuentra en menos del 1% de los niños con diabetes [11]. La resistencia a la enfermedad está asociada con el locus HLA-DR2 y DQB1* 0602, la gente con dichos alelos raramente desarrollan la enfermedad [9]. Se han reconocido otros genes que se han asociado con la susceptibilidad a la diabetes fuera del HLA como son: el gen de la insulina, el gen CTLA-4, una variante de PTPN22, el gen que codifica LYP, también supresor de la activación de las células T; identificándose por lo menos 15 *loci*, aunque los anteriores son los más importantes [11]. Además de los factores genéticos, la diabetes tipo 1 es el resultado de una

desregulación de la respuesta inmune [12]. La activación anormal del sistema inmune mediado por las células T en individuos susceptibles conduce a una respuesta inflamatoria dentro de los islotes (insulitis), como también de la respuesta humoral, con la producción de anticuerpos contra antígenos de las células β o los autoanticuerpos específicos contra la insulina (IAA), el ácido glutámico descarboxilasa (GADA/GAA) y la proteína tirosina fosfatasa (IA-2AA) son los más conocidos [13]. El número de autoanticuerpos puede usarse para predecir la enfermedad, siendo la probabilidad de desarrollar diabetes del 10% cuando hay presencia de un tipo de autoanticuerpo, del 50% en presencia de dos autoanticuerpos y 60 a 80% cuando hay 3 diferentes autoanticuerpos [14].

Aunado a lo anterior, se conoce que los factores ambientales son importantes en el desarrollo de la diabetes tipo 1; se ha observado que la incidencia cambia en las poblaciones migrantes, y que se ha incrementado rápidamente en todo el mundo, indicando que los factores ambientales juegan un papel muy importante [9, 15]. La exposición a 1 o más factores ambientales alteran la función inmune, iniciando la destrucción de las células β . Entre los factores ambientales se incluyen la infección por virus (por ejemplo: enterovirus, coxsackie, la rubeola congénita), toxinas ambientales (como nitrosaminas) o alimentos (como puede ser la exposición temprana a proteínas de la leche de vaca, cereales o gluten); aunque solamente se ha comprobado una correlación directa entre la infección con rubéola y diabetes [13]. Una hipótesis, es que la respuesta inmunopatogénica es mediada por células Th1 mientras que el efecto protector es mediado por el subtipo Th2 [12]. Las células Th1 y CD8+ específicas a los antígenos del islote aparecen en los nodos linfoides pancreáticos. Estas células migran a los islotes pancreáticos y reclutan macrófagos y células dendríticas [3]. Estas células son, en conjunto con los linfocitos, las que inducen peri-insulitis, insulitis, y también contribuyen a la muerte de las células β productoras de insulina [16]. Estudios previos han demostrado que la generación de células CD4+ Th2 pueden regular el desarrollo de la diabetes autoinmune secretando IL-4 e IL-10 e inhibiendo la diferenciación de las células Th1 [17]. Se ha demostrado que las infecciones con helmintos, por ejemplo, son eficientes para inhibir el desarrollo de patologías autoinmunes en modelos animales y probablemente también en humanos [18].

Hipótesis de la Higiene

La hipótesis de la higiene fue principalmente formulada para explicar el incremento en la prevalencia de las alergias en ciertos países observado en décadas anteriores, y propone que la exposición reducida a infecciones en los primeros años de vida, combinado con la disminución del tamaño de la familia, las mejoras en el nivel de vida e higiene personal mayor, podría generar mayor riesgo de desarrollar enfermedades alérgicas y desordenes autoinmunes [19]. Esta hipótesis propone que la exposición a microbios u otros patógenos y sus productos en los primeros años de vida promueven la respuesta inmune innata que suprime la autoinmunidad. En el mundo desarrollado, este balance entre hospedero-parásito se ha perturbado al erradicar infecciones antiguas que, en parte, pueden ser responsables del incremento observado en enfermedades autoinmunes [3, 11]. La base de datos de la Federación Internacional de Diabetes indica que la diabetes es rara en poblaciones Asiáticas y Africanas. Al contrario, algunos países del norte de Europa (como Finlandia y Suecia) y Norte América, tienen una incidencia alta de diabéticos tipo 1 (Figura 1) [15]. Se ha comprobado, que en modelos animales de enfermedades autoinmunes, reduciendo la exposición a infecciones se incrementa la enfermedad [20].

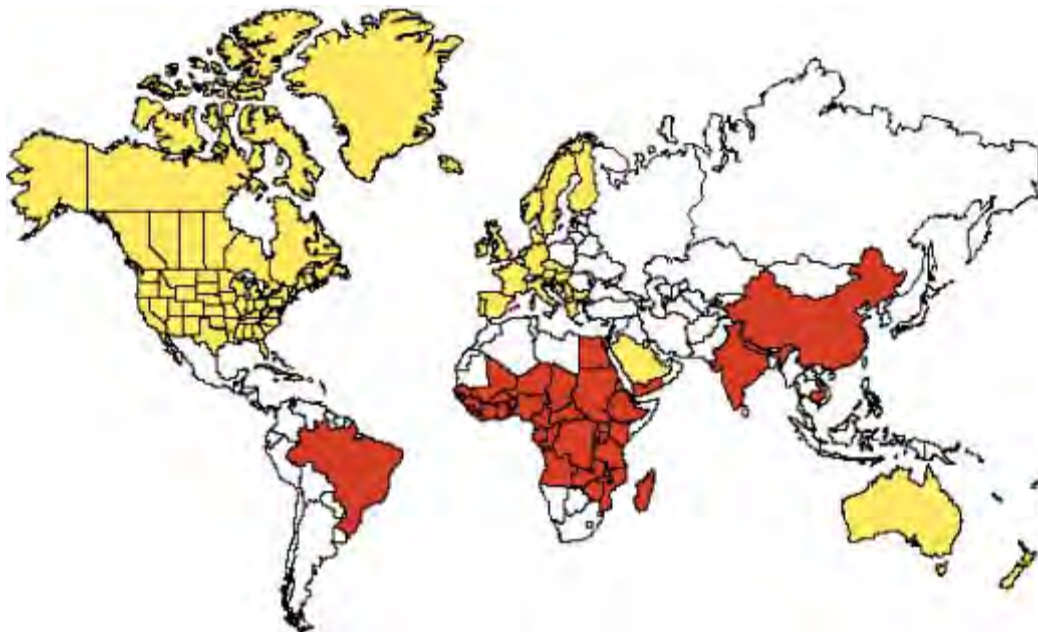


Figura1. Correlación inversa entre Diabetes tipo 1 y enfermedades infecciosas. En rojo las áreas de mayor incidencia de seis enfermedades infecciosas (filariasis, lepra, oncocercosis, esquistosomiasis, helmintos transmitidos por suelo y tracoma). En amarillo las áreas de mayor incidencia de la diabetes tipo 1 (mayor a 8 por 100 000/año) [15].

Inmunoregulación por Helmintos

En modelos murinos de enfermedades autoinmunes, la presencia de infecciones por helmintos ha mostrado un efecto protector contra la respuesta autoinmune (ver tabla 1). Por ejemplo, la infección con *Schistosoma mansoni* o la exposición a sus huevos o al extracto soluble de adultos inhiben el desarrollo de la diabetes tipo 1 en ratones no-obesos (NOD) [21-24]. También pueden ser protectores en ciertos modelos de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) [25-27]. El nematodo *Trichinella spiralis* suprime los síntomas macroscópicos e histológicos de la colitis en ratones [28, 29]. Incluso *Trichuris suis* se ha usado en el tratamiento de pacientes con colitis ulcerativa y enfermedad de Chron y los resultados iniciales son muy prometedores [29, 30]. Estos estudios, ponen a la luz el papel benéfico que podrían tener los parásitos helmintos regulando las enfermedades autoinmunes, aunque son necesarios más estudios a gran escala para determinar qué células y moléculas podrían estar implicadas [31].

Tabla 1. Agentes infecciosos que inhiben enfermedades autoinmunes

Enfermedades Autoinmunes	Helmintos	Citas
Diabetes tipo 1	<i>Schistosoma mansoni</i> (adulto, huevos, SEA, SWA)	<ul style="list-style-type: none"> • [21] • [24] • [22] • [23]
	<i>Trichinella spiralis</i>	• [32]
	<i>Heligmosoides polygyrus</i>	• [32]
	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag recombinante)	• [33]
	<i>Litomosoides sigmodontis</i>	• [34]
Encefalomielitis Autoinmune experimental	<i>Schistosoma mansoni</i> (adulto, huevos)	<ul style="list-style-type: none"> • [35] • [36]
Enfermedad inducida de Graves	<i>Schistosoma mansoni</i>	• [37]
Artritis inducida por colagena	<i>Acanthocheilonema viteae</i> (productos secretados, ES-62)	• [38]
Enfermedad Inflamatoria Intestinal	<i>Trichinella spiralis</i>	• [28]
	<i>Schistosoma mansoni</i> (huevos)	<ul style="list-style-type: none"> • [25] • [26] • [27]
	<i>Heligmosoides polygyrus</i>	• [39]
	<i>Hymenolepis diminuta</i>	• [40]
Enfermedad de Crohn	<i>Trichuris suis</i>	• [29]

Parásitos y Diabetes Tipo 1

Los ratones NOD son el modelo más utilizado para estudiar el desarrollo de la diabetes tipo 1 y los efectos de la infección por helmintos [15]. Las hembras NOD espontáneamente desarrollan diabetes, los ratones infectados con *Schistosoma mansoni* o expuestos a sus huevos o antígenos se protegen contra el desarrollo de la diabetes. Dicha exposición induce IL-10 y una respuesta Th2 que puede ayudar a prevenir la insulinitis. También, aumenta la actividad de las NKT, y de las Treg, que normalmente están disminuidas en los ratones NOD [21, 41]. La infección con *Litosomoides sigmodontis* o la inyección de sus antígenos previene la diabetes en los ratones NOD. La protección se asoció con el incremento en la respuesta Th2 y el número de Treg, más que a la disminución de la respuesta patogénica Th17 [34]. La infección con *Heligmosoides polygyrus* y *Trichinella spiralis*, dos parásitos intestinales, pueden alterar la respuesta que lleva al desarrollo de la diabetes tipo 1 en los ratones NOD. Ambos parásitos producen una respuesta tipo Th2 y alteran la respuesta inmune responsable de la progresión de la diabetes autoinmune [32].

Respuesta Inmune a *Taenia crassiceps*

Los helmintos parásitos son un grupo importante de organismos que infectan innumerables hospederos [42]. Se clasifican en dos principales *Fila*: el de los Platelminetos, que incluyen a los digeneos (o trematodos) y céstodos; y el *Fila* de los Nematodos [30]. Muchos de ellos han desarrollado mecanismos complejos para evadir y modular la respuesta inmune del hospedero. Esta respuesta inmune incluye anergia inmune, elevación de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y más recientemente, de IL-21 e IL-25 (IL-17E). La polarización de las células Th hacia Th2, eosinofilia, basofilia, mastocitosis y niveles elevados de IgE e IgG-1 en suero [42, 43].

La infección por *Taenia crassiceps* parece ser un buen ejemplo experimental que revela algunos de los mecanismos de la relación hospedero-parásito en la cisticercosis y un muy buen ejemplo de la ambigüedad de los mecanismos inmunes efectores de la salud y sobrevivencia del hospedero. La cisticercosis causada por *T. crassiceps* afecta roedores y el hospedero final son caninos. Es importante recalcar, que la etapa de metacestodo de *T. crassiceps* se reproduce asexualmente, este fenómeno es una buena herramienta para generar infecciones a corto plazo en animales de laboratorio

[40]. La respuesta de citocinas en ratones infectados con *T. crassiceps* es una mezcla de respuesta Th1 al inicio de la infección, durante la infección Th1-Th2 y en infecciones crónicas, por último, domina una respuesta Th2 [44]. También inducen anergia de esplenocitos en respuesta al estímulo antígeno-específico y policlonal. Además de incrementar la susceptibilidad a *Trypanosoma cruzi*, Leishmaniosis y a virus [45]. Esto es, que además de activar una respuesta tipo Th2, la infección por *T. crassiceps* puede regular otras funciones de los linfocitos *in vivo*, sugiriendo que puede inducir una fuerte modulación de la respuesta inmune [45]. La infección por helmintos también es responsable de la liberación de ciertas células con funciones reguladoras que en el presente han tomado cierto interés. Tal es el caso de los Macrófagos Alternativamente Activados (AAMΦ) [18].

Macrófagos Alternativamente Activados

Los macrófagos son células pleiotrópicas del sistema inmune con una variedad de funciones biológicas, que incluyen la fagocitosis y actividades pro y/o anti-inflamatorias. Además, su respuesta induce una variedad de citocinas, moléculas coestimuladoras y presentación de antígeno. Se ha reconocido que antígenos microbianos junto con células T efectoras, como Th1, Th2, Th3 y T reguladoras (Treg) y sus productos influyen en la heterogeneidad y el estado de activación de los macrófagos. En consecuencia, se han descrito distintos subtipos de macrófagos: los mejor caracterizados son los clásicamente activados (o como sus siglas en inglés lo indican Classically Activated Macrophages o CAMΦ), los cuales se activan por moléculas microbianas proinflamatorias como lipopolisacárido (LPS) en un ambiente Th1 con producción de IFN- γ , TNF- α y liberación de productos microbicidas e inflamatorios. Estas células pueden ser identificadas por su habilidad de producir óxido nítrico (ON), incrementar la expresión de MHC clase II y CD86, y el aumento en su capacidad presentadora de antígeno [46, 47].

Los CAMΦ juegan un papel importante en la protección contra patógenos intracelulares [48]. Se ha demostrado que la IL-23, una citocina con propiedades inflamatorias y que es producida por células dendríticas y CAMΦ induce una producción alta de IL-17, TNF- α e IFN- γ en los islotes de Langerhans en el páncreas, lo cual se asoció a una mayor severidad en la diabetes tipo 1 [8], sugiriendo así que los CAMΦ podrían estar relacionados con la patogénesis de la T1DM. Algunos estudios han comprobado la

participación de los CAM Φ por medio de su eliminación con inyecciones i.p. de liposomas con clodronato, dichas células son importantes en el desarrollo de la insulinitis y la diabetes, ya que son los contribuyentes principales para la creación de un ambiente inmune propicio para el desarrollo y activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ que causan la diabetes autoinmune en ratones NOD [49, 50].

Avances recientes sobre las capacidades inmunoregulatoras de las infecciones por helmintos indican que los macrófagos tienen un papel central, ya que desarrollan un fenotipo diferente cuando el hospedero se expone a una infección crónica con helmintos [42]. Dicha población de AAM Φ aparece durante las primeras semanas de infección, expresan algunos marcadores de membrana como CD23 y CCR5, así como un incremento en la expresión de algunos genes conocidos como marcadores de un estado de activación alterna como son arginasa 1, RELM- α , YM1 y MMR [51].

Arginasa-1 hidroliza L-arginina a urea y L-ornitina, la cual promueve la síntesis de poliaminas y prolinas que están relacionadas con la proliferación celular y producción de colágena. RELM- α es una proteína secretora parecida a resistina, y su expresión aumenta durante la inflamación pulmonar. YM-1 es una lectina secretora que forma cristales en espacios alveolares y en macrófagos pulmonares. El receptor de manosa (o MMR) es una glicoproteína transmembranal con ocho dominios de reconocimiento de carbohidrato tipo lectina-C y un dominio rico en cisteína. Es expresado por macrófagos, células dendríticas y endoteliales selectas. Tras la unión del ligando manosil glicoconjugado, el receptor está implicado en mediar la endocitosis y fagocitosis de micobacterias y también disminuye las funciones efectoras de los macrófagos [52].

Los AAM Φ s son antagonísticamente regulados por citocinas Th1 y se puede especular que pueden secretar moléculas anti-inflamatorias como IL-10 ó TGF- β , disminuyendo los procesos inflamatorios iniciados por los CAM Φ . En consecuencia, los AAM Φ s ejercen funciones inmunosupresoras selectivamente e inhiben la proliferación de las células T. Su presencia en la placenta de individuos sanos, pulmones y sitios inmuno-privilegiados, como también en enfermedades inflamatorias crónicas, sugiere que dichos macrófagos protegen contra una respuesta inmune perjudicial. También producen niveles incrementados de factores relacionados con la remodelación del tejido. Además, los AAM Φ s incrementan la actividad fibrinogénica de los fibroblastos humanos y promueven la angiogenesis durante la etapa aguda y crónica de la enfermedad

inflamatoria [48]. Los AAMΦs se han observado en una amplia variedad de infecciones por helmintos que inducen una respuesta Th2, como son *Schistosoma mansoni*, *Heligmosoides polygyrus*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Taenia crassiceps*, *Trichinella spiralis*, *Fasciola hepatica*, *Ascaris suum* y filarias parásitas [43].

En vista de sus efectos anti-inflamatorios y su posible papel en procesos de reparación, ciertos autores han propuesto que los AAMΦs pueden contribuir en un rango amplio de procesos inflamatorios y no inflamatorios. Entre ellos se incluyen tolerancia fetal, reparación de tejido (incluyendo del sistema nervioso central) aterosclerosis y tumores (interacciones estroma-hospedero-tumor) [46, 47].

La infección crónica con *T. crassiceps* induce una población de AAMΦs (ver figura 2), que producen niveles altos de PGE₂ e IL-6, y niveles bajos de ON e IL-12. Estos macrófagos exhiben una expresión alta de arginasa, un incremento en la expresión de MHC clase II, CD40, CD86, CD23 y CCR5. Son capaces de presentar antígenos pero inducen una respuesta proliferativa defectuosa [48]. Otra observación es la habilidad de estos AAMΦs aislados de ratones infectados con *T. crassiceps* de inhibir la respuesta proliferativa de las células T "vírgenes". Aparentemente, este efecto involucra una ruta contacto dependiente, asociada con el incremento en la expresión de PDL-1 y PDL-2 en los AAMΦs. La participación de la vía PD-1 fue examinada bloqueando PDL-1 y PDL-2, o PD-1 por adición de anticuerpos específicos a co-cultivos con células T con AAMΦs de ratones infectados con *T. crassiceps* y se observó que bloqueando PD-1 se reduce la actividad supresora de los macrófagos. Estos datos probaron que PDL-1 y PDL-2 están directamente involucrados en la actividad supresora de los AAMΦs [53].

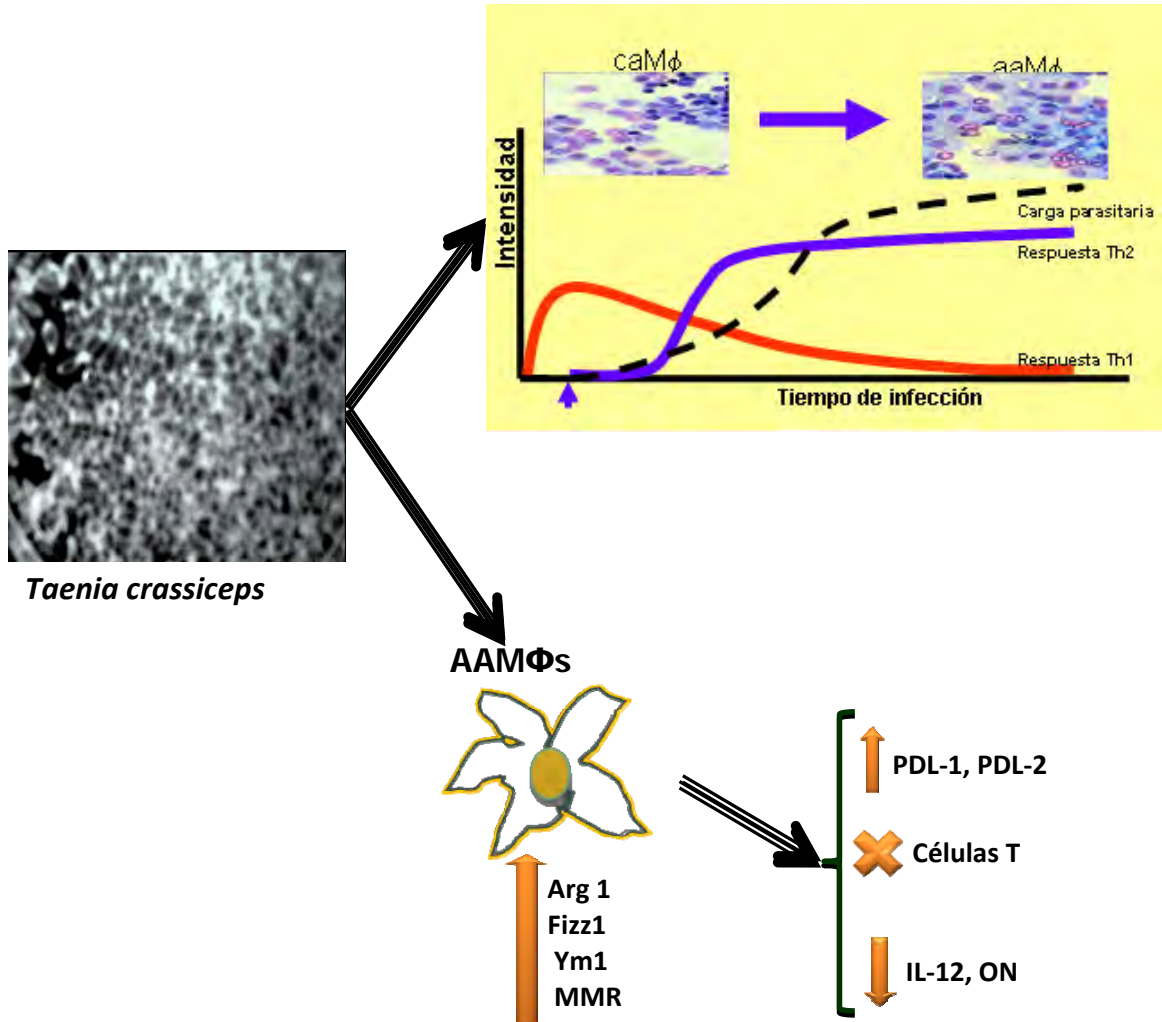


Figura 2. La infección con *T. crassiceps* generan una población AAMφs, los cuales presentan marcadores de membrana como CD23 y CCR5, aumentando la expresión de Arg-1, Fizz-1, Ym-1 y MMR. También presentan PDL-1 y PDL-2, impidiendo la proliferación de células T. Producen bajos niveles de IL-12 y ON.

JUSTIFICACIÓN

En la diabetes tipo 1, se manifiesta una respuesta inmune Th1 con producción de citocinas proinflamatorias, principalmente TNF- α e IFN- γ y las células principales que infiltran los islotes y atacan a las células β son células T y se ha mostrado que CAM Φ s están relacionados con la enfermedad. En contraste, la infección con *Taenia crassiceps* promueve una respuesta Th2 en sus hospederos e induce AAM Φ s, los cuales expresan PDL-1 y PDL-2 que están relacionados con la inhibición de la respuesta de las células T. Hasta el momento, se desconoce si dicha infección pueda regular enfermedades autoinmunes, como la diabetes tipo 1.

HIPÓTESIS

La infección por *Taenia crassiceps* al inducir una respuesta tipo Th2 con producción de citocinas anti-inflamatorias, y AAM Φ s, puede modular el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 experimental al disminuir la respuesta inmune Th1 e inducir un daño menor en el páncreas y por lo tanto, menor incidencia de la enfermedad.

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar si la infección previa con *Taenia crassiceps* puede alterar el inicio y el desarrollo de la diabetes tipo 1 experimental, y establecer el papel que juegan los AAMΦs.

Objetivos particulares:

- Demostrar si existen diferencias entre las dos cepas de ratones C57Bl/6 y Balb/c en la susceptibilidad a la diabetes experimental tipo 1.
- Señalar si la infección previa con *T. crassiceps* altera el inicio y desarrollo de la diabetes tipo 1 y si existen diferencias entre las dos cepas de ratones.
- Comparar el infiltrado celular en los islotes pancreáticos de ratones infectados con *T. crassiceps*.
- Comprobar si la infección con *T. crassiceps* modifica la producción de insulina.
- Analizar si la infección con *T. crassiceps* modifica la cantidad de Treg.
- Comprobar si la infección de *T. crassiceps* en animales diabéticos altera la población de AAMΦs.
- Probar si la administración del antígeno de *T. crassiceps* altera el desarrollo de la diabetes tipo 1 experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Se utilizaron ratones de las cepas Balb/c y C57BL/6 machos de 6 a 8 semanas de edad. Los animales se encuentran en condiciones libres de patógenos en el bioterio de la FES Iztacalade acuerdo con las normas institucionales y nacionales. Se separaron en 4 grupos: diabéticos (STZ); infectados/diabéticos (STZ/Tc); solamente infectados (*Tc*) y el grupo sano (Control).

Infección de los Ratones

Los metacestodos de *T. crassiceps* (de la cepa ORF) se obtuvieron de ratones previamente infectados de 4-6 semanas de infección de las mismas cepas, los parásitos se lavaron con solución salina esteril (Pisa) dos veces, fueron seleccionados (~ de 2.0 mm de diámetro y sin gemación). Los ratones de la cepa C57BL/6 se inyectaron i.p con 40 larvas y los de la cepa Balb/c con 20 larvas.

Inducción de Diabetes

Posterior a las 6 semanas de infección, se indujo diabetes en todos los grupos (excepto el control y el de *T. crassiceps*), con dosis bajas de estreptozotocina (DB-STZ, Sigma) de 40 mg/kg durante 5 días consecutivos diluida en 0.1 ml de solución amortiguadora de citrato a pH 4.5. Se obtuvo sangre de la cola de los ratones y se cuantificó la glucosa con ayuda de un glucómetro (Accu-Chek), después de 4-6 h de ayuno. Los ratones se monitorearon semanalmente para observar el desarrollo de la diabetes. Los ratones con glucemia superior al promedio más dos veces la desviación estándar en dos mediciones consecutivas se consideraron diabéticos. Se registró la incidencia de diabetes en todos los grupos de ratones.

Preparación del Antígeno de *T. crassiceps*

Los metacéstodos de *T. crassiceps* se obtuvieron en condiciones estériles de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c hembra con 2-4 meses de infección y se lavaron exhaustivamente con solución salina esteril (Pisa). El antígeno de *T. crassiceps* (AgTc) se preparó por homogenizado de todos los metacéstodos obtenidos en un volumen de 10ml por medio de un sonicador en esterilidad (de una amplitud de 13-15 volts) durante 2-5 min. Se agregaron 25ul de un inhibidor de proteasas para que no se degradara las proteínas por cada 10ml. Posteriormente, se centrifugaron las muestras

a 10000 rpm por 30 min a 4°C, recuperando el sobrenadante para obtener el antígeno soluble. Por último, se determinó la concentración de las proteínas por el método de Lowry y se congelaron las muestras a -80° C.

Administración de Antígeno

Se administró antígeno de *T. crassiceps* a diferentes grupos de ratones diabéticos vía i.p. (50 µg/ratón). Una semana antes de la administración de DB-STZ y durante todo el experimento tres veces por semana (AgC); ó solo una semana antes de la administración de DB-STZ 3 veces por semana (AgA).

Tolerancia a la Glucosa

En la sexta semana después de la inducción de la diabetes, los ratones se dejaron sin comer por un lapso mínimo de seis hrs, y posteriormente se inyectaron i.p. con 1.5 g glucosa/Kg (deshidratada; J. T. Baker). Se monitoreó la glucosa en sangre hasta los 120 min por periodos de 30 min.

Obtención de Macrófagos Peritoneales

Los ratones se sacrificaron a la semana 6 posterior a la inducción de la diabetes. Se les inyectaron 10 ml de solución salina (Pisa) i.p. dando un ligero masaje para poder extraer las células del exudado peritoneal de todos los grupos de ratones. Las células se colocaron en tubos cónicos estériles de 15 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se decantó y el botón se resuspendió. Las células viables se cuantificaron por el método de exclusión de azul de tripano. Se ajustó la concentración celular a 1×10^6 células/ml en medio RPMI. Las células se cultivaron en placas de 6 pozos por 2 h a 37° C y 5% de CO₂ para la adherencia de los macrófagos a la placa. Posteriormente se lavaron las células no adherentes con medio RPMI.

Citometría de Flujo

Los macrófagos peritoneales obtenidos se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min, se decantaron y se obtuvo la pastilla. Se emplearon anticuerpos monoclonales F4/80-FITC, MMR-APC, F4/80-APC, PDL-1-PE que se diluyeron a una concentración de 0.2 µg/1x10⁶ células y se incubaron por 30 min a 4° C en oscuridad. Se lavaron con 1 ml de solución amortiguadora para FACs y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min para eliminar los anticuerpos no adheridos. Se fijaron con 500 µl de paraformaldehído. Las células se

analizaron en un citometro de flujo FACs Calibur utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson).

Análisis de Treg

Los ganglios linfoides fueron macerados usando dos portaobjetos estériles. Las células se contaron y ajustaron a $0.5-1 \times 10^6$ células y por citometría de flujo se determinó la presencia de Treg usando el kit Mouse Treg Flow Kit, Biolegend. Brevemente, a las células se les agregó 40 μ l de CD4/CD25 por cada 10 muestras y se incubaron por 20 min a 4° C en oscuridad, se lavaron y centrifugaron a 2500 rpm por 8 min. Aparte, se preparo FoxP3 fix/perm 4X (Biolegend) en una dilución 1:3 en PBS. Se añadió 1 ml de FoxP3 fix/perm por tubo y se mezcló, se incubó en oscuridad por 20 min. Posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min, se removió el sobrenadante. Se añadió 1 ml de solución amortiguadora para FACs y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min. Se preparo aparte de la solución FoxP3 Perm (10X) (Biolegend) una dilución 1:9 en PBS, y esa solución se agregó 1 ml en cada tubo y nuevamente se incubaron por 15 min a 4° C. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 μ l de FoxP3 Perm (10X). Se añadió 5 ml de Foxp3 y 5 ml de Alexa Fluor 488 y se incubó por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, se lavo con solución amortiguadora de FACs y se centrifugo a 2500 rpm por 5 min. Se resuspendieron en 500 μ l de paraformaldehído. Las células se analizaron en un citometro de flujo FACs Calibur utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson).

Carga Parasitaria

En los ratones infectados se contó el número de metacístodos en la cavidad peritoneal.

ELISA (sandwich)

Todos los ratones se sangraron una vez por semana por medio de una incisión caudal, la sangre se colectó en tubos eppendorf de 1.8 ml. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min (dos veces), obteniendo suero, el cual se mantuvo en congelación hasta su uso.

Los niveles de TNF- α e IL-4 se evaluaron por medio de la técnica de ELISA-sandwich de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Pharmigen, Preprotech).

El anticuerpo de captura se diluyó a una concentración de 2 μ g/ml en solución de

pegado (Na_2HPO_4 0.1M a pH 9.0, Baker) adicionando 50 μl /pozo a placas de 96 pozos para ELISA (Nunc Maxisorp), se cubrieron y se dejaron reposar toda la noche a 4° C. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado (PBS-tween-20 al 0.05%, Sigma) y se les agregaron 200 μl de solución amortiguadora de bloqueo (PBS 1X con suero fetal bovino al 10%) dejando incubar a 37° C durante 2 h. Al término del tiempo de incubación, las placas se enjuagaron con solución de lavado dos veces y se colocaron 20 μl de muestra por duplicado. Para la curva de calibración se utilizó la citocina recombinante de nuestro interés y se realizaron diluciones a la mitad en solución amortiguadora de bloqueo. Las placas se incubaron a 4° C durante toda la noche.

A continuación, las placas se reposaron a temperatura ambiente por 10 min y se lavaron en solución de lavado 4 veces, se les agregó el anticuerpo de detección marcado con biotina correspondiente para cada citocina a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución amortiguadora de bloqueo y se incubaron a 37° C por 1 h. Por 5 veces se lavaron en solución y se adicionaron 5 μl / pozo del conjugado de estreptoavidina peroxidada (Biorad) a una dilución de 1:2000 en solución amortiguadora de bloqueo y se incubaron a 37° C por 45 min. Se lavaron 6 veces y se agregaron 100 μl /pozo de sustrato ABTS (0.5% ABTS en 0.1 M ácido cítrico a pH 4.5 con NaOH más 1% de H_2O^2 al 30%, Sigma). La densidad óptica se determinó entre los primeros 30 minutos en un lector de microplacas (SpectraMax 250, Molecular Devices) a 405 nm.

Histología

Se removieron los páncreas de los ratones de cada grupos, se fijaron en paraformaldehído al 4% y se mantuvieron a 4° C por al menos 2 h. Posteriormente los páncreas se lavaron con agua corriente durante 30 min, seguido de deshidratación en etanoles graduales (comenzando por el OH-70%, OH-80%, OH-90% y OH-100% por 30 min en cada uno) y por último en butanol por 2 h. Los órganos se fijaron en parafina (Kendall) y se cortaron en secciones de 5 μ de grosor (el tejido se extendió con Ruyter, ver apéndice I).

Las laminillas reposaron por al menos 30 minutos a 60° C para mejorar el pegado, seguido de un tren de tinción: Xilol 10 min, OH-xilol 3 min, OH 100% 3 min, OH 90% 2 min, OH-80% 2 min, OH-70% 1 min, H₂O 3 min, Hematoxilina de Harris 2-5 min,

H2O 5 min, OH-Acido lavado, H2O 3 min, Eosina alcoholica 1-3 min, H2O 5 min, OH-70% 1 min, OH-80% 1 min, OH-90% 1 min, OH-100% 5 min, y Xilol 10 min. El montaje de las laminillas fue con Entellan (J. T. Baker) para posteriormente observarlas en el microscopio óptico (Zeiss).

Se registró el grado de infiltración en los islotes de cada ratón usando la siguiente escala: 0, normal; 1, peri-insulitis (células mononucleares alrededor de los islotes y ductos, pero sin infiltrado); 2, moderada insulitis (infiltración celular <50% del islote); 3, severa insulitis (>50% de infiltración celular de los islotes y pérdida de arquitectura de los mismos). Se tomaron fotografías con ayuda de una cámara (Zeiss) y se visualizaron por el programa Axio Vision Rel 4.6 (Zeiss).

Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica en cortes de páncreas de 5 μ usando el siguiente anticuerpo primario: Insulina Ab-6 (INS04 + INS05) y el kit comercial DakoEnVision + System HRP (DAB). Las laminillas se dejaron en Xilol por 4 min y se hidrataron con etanoles graduales: OH-100% 1 min, OH-90% 1min, OH-80 1min, OH-70 1 min, Agua destilada 3 min y PBS 1X 1min. Se prosiguió con el paso de recuperación antigénica, para lo cual, las laminillas se bañaron con solución amortiguadora de citratos (a 0.01 M y con pH de 6) y se calentaron en una olla de presión hasta que llegó al punto de ebullición. Se dejaron enfriar y se lavaron con PBS. Posteriormente seguimos las instrucciones del kit comercial DakoEnVision + System HRP (DAB), este sistema de dos pasos utiliza un polímero acoplado a HRP el cual se une al anticuerpo secundario, anti-IgG HRP (conejo/ratón). Posteriormente se realizó la contra-tinción para lo cual se siguió el siguiente tren de tinción: hematoxilina de Harris durante 1-2 min, lavado con agua corriente, OH 70% 1 min, OH-90% 1 min, OH-100% 6 min, y Xilol 10 min. El montaje se hizo con Entellan (J. T. Baker).

Para la interpretación de los resultados se necesitó de 1 control negativo, el cual se trata con suero no inmune en lugar de tratarse con el anticuerpo primario. La tinción de dicho control es debida a la unión no específica de proteína o de otros agentes.

Se tomaron fotografías con ayuda de una cámara (Zeiss) y se visualizaron por el programa Axio Vision Rel 4.6 (Zeiss).

RT-PCR

Se extrajo el RNA total de macrófagos peritoneales. Se les agregó 1 ml de Trizol por cada muestra. Posteriormente se dejó reposar y se le agregaron 200 µl de cloroformo. Se agitó fuertemente durante 15 seg y se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. Se extrajo la fase transparente (donde se encuentra el RNA) y se colectó en otro tubo eppendorf, al que se le agregó 500 µl de isopropanol frío. Se mantuvo durante 10 min a -20° C, y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos. Se decantó el contenido y a la pastilla se le agrega 1ml de etanol al 75%, mezclando por inversión de 5 a 10 seg, y centrifuga a 8000 rpm por 10 min. Se decantó el OH-75% sin perder la pastilla y se dejó secar durante 10-20 min. Se resuspende en H₂O DEPC (20-40 µl). El cDNA se preparó utilizando el kit First Strand Synthesis Superscript II (Invitrogen) utilizando de 3 µg de RNA. Las reacciones de PCR contenían (en un volumen final de 25 µl) 5x de solución amortiguadora de PCR azul, 10 mM dNTP, 40 nM de cada sonda (sentido y reversa), 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Sacace Biotechnologies, Italy) y 2 µl de cDNA. El programa usado para amplificación de cada gen fue: desnaturalización inicial a 95° C por 5 min, 35 ciclos de 95° C por 40 seg, el tiempo indicado de alineación de cada primer por 50 seg, y 72°C por 40 seg y una extensión final de 72° C por 4 min. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (Corbett Research, Australia). Finalmente, para observar la amplificación de los productos, se preparó un gel de agarosa al 1.5% con buffer de blue juice con SYBR Green (Invotrogen). Los geles se visualizaron en un escaner FujiFilm FLA 5000 (Fuji, Japón) y se capturó la imagen con el programan FLA 5000 V2.1.

Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba de t de Student de dos colas para comparar entre grupos en todas las graficas. Se consideró estadísticamente significativo valores $p < 0.05$.

RESULTADOS

Glucosa en sangre e Incidencia de Diabetes

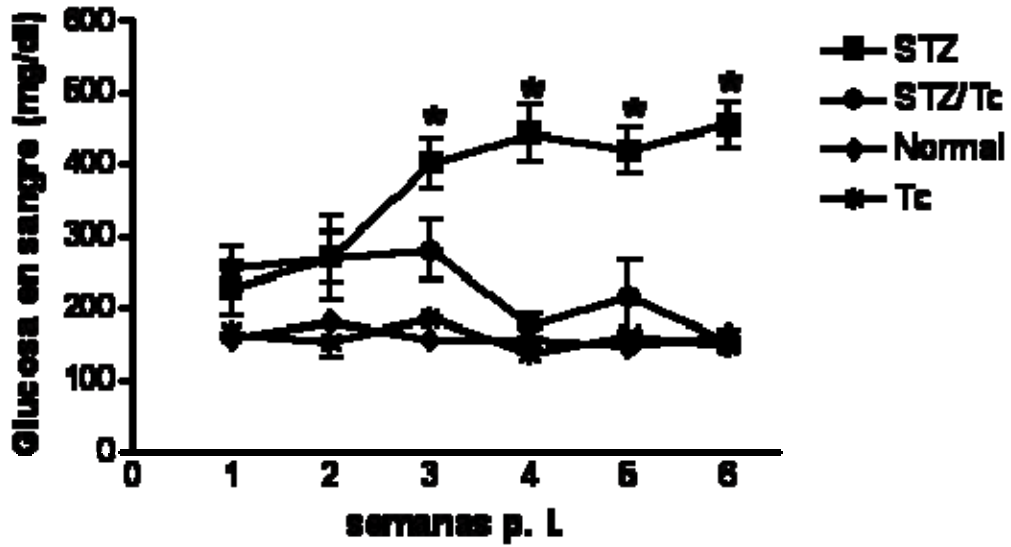
Para comprobar si la infección con *T. crassiceps* modifica la glucosa en sangre, se monitoreó semanalmente durante 6 semanas posterior a la inducción de diabetes experimental en las dos cepas de ratones. La sangre se obtuvo de la cola de los ratones y con ayuda de un glucómetro Accu-Check se midió la glucosa en todos los grupos de estudio en ayuno de 4 a 5 horas. Considerando a un ratón diabético con glucosa en sangre superior a la glucosa normal más dos desviaciones estándar, que en la cepa C57BL/6 fue de 224.4 mg/dl y en la cepa Balb/c de 159 mg/dl de glucosa en sangre. Además se evaluó el porcentaje de diabéticos (incidencia), para comprobar si la infección con *T. crassiceps* modificaba el número de animales diabéticos.

Como se observa en la figura 3, los ratones C57BL/6 con STZ presentaron hiperglucemias con niveles superiores a 400 mg/dl, mientras que los ratones STZ/Tc tuvieron valores menores de glucemia (< a 300 mg/dl) y posteriores a la cuarta semana p.i., los niveles de glucosa fueron muy similares a los controles, al igual que los solamente infectados (Tc). Este último grupo, se comportó muy similar a los sanos, por tanto, la infección con *T. crassiceps* no influyó en la glucemia inducida. La incidencia de diabetes (figura 3B) en los ratones C57BL/6 el grupo con STZ a la semana 3 todos son diabéticos, mientras que el grupo infectado (STZ/Tc), solo el 80% de los ratones fueron diabéticos, aunque posterior a la semana 4, la mayoría de los animales se recuperó, y menos del 20% de ellos tuvieron hiperglucemia, manteniéndose así hasta la semana 6.

En los ratones Balb/c, figura 4, los animales con STZ presentaron valores mayores a 300 mg/dl de glucosa desde la semana 2 y se mantuvieron así hasta la semana 6; mientras que el grupo que se encontraba infectado (STZ/Tc) presentó niveles < a 200 mg/dl en todas las semanas. En cuanto, los grupos sanos y solamente infectados (Tc) los valores oscilaron en 100 mg/dl de glucosa en sangre. La incidencia (figura 4B) en los animales con STZ fue del 100% desde la semana 2, mientras que solo el 50% de los ratones STZ/Tc fueron diabéticos.

C57BL/6

A



B

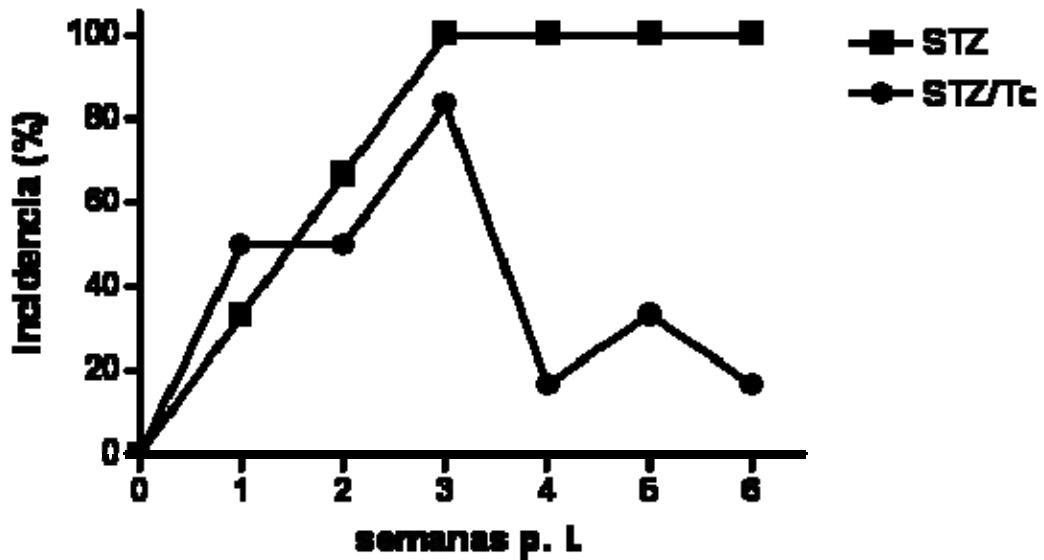
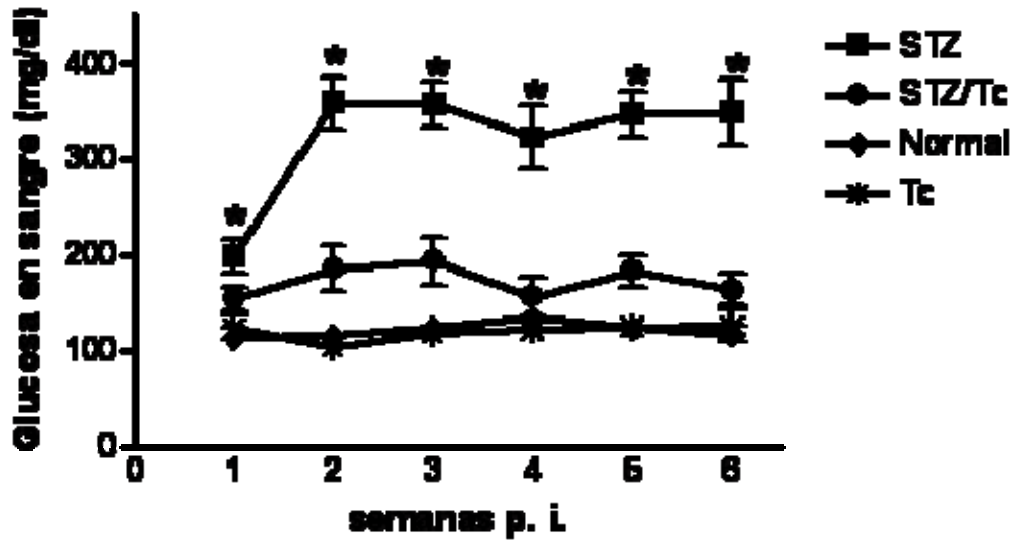


Figura 3. Glucosa en sangre e Incidencia de diabetes de ratones C57BL/6.. La glucosa en sangre se monitoreo durante 6 semanas p.i., con 4 a 5 h de ayuno. Se graficó el porcentaje de diabéticos por grupos (se considera diabético si la glucemia es superior al promedio de glucosa normal +2 desviaciones estándar). A) Glucosa en sangre de 6 semanas p.i.; B) Incidencia de ratones diabéticos. Se expresan los datos de tres experimentos independientes con 5 ratones por grupo. *p<0.05 t de student (Graphpad).

Balb/c

A



B

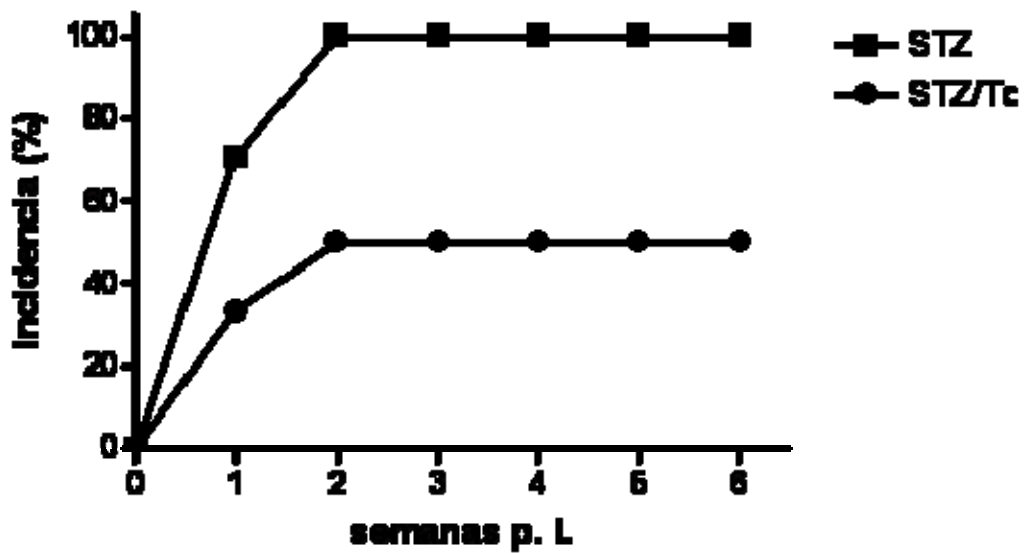


Figura 4. Glucosa en sangre e Incidencia de diabetes. Ratones Balb/c. La glucosa en sangre se monitoreo durante 6 semanas p-i, posterior a 4 a 5 h de ayuno. Se graficó el porcentaje de diabéticos por grupos (se considera diabético si la glucemia es superior al promedio de glucemia normal+2 desviaciones estándar). A) Glucosa en sangre de 6 semanas p.i.; B) Incidencia de ratones diabéticos. Se expresan los datos de tres experimentos independientes con 5 ratones por grupo; * $p < 0.05$ t de student (Graphpad).

Tolerancia a la Glucosa

Para comprobar el tiempo que tardan los ratones infectados en reestablecer los niveles basales de glucosa en sangre, realizamos la prueba de tolerancia a la glucosa en los animales de 6 semanas p.i., inyectando 1.5 g/kg glucosa i.p. y midiendo la glucosa en sangre cada 30 min, durante 2 h. Como se observa en la figura 5, ambos grupos de ratones (STZ y STZ/Tc) en ambas cepas reestablecieron sus niveles de glucosa posterior a las 2 h de la administración de glucosa externa, aunque con diferentes niveles. El grupo STZ que en el tiempo 0 tenía niveles de glucosa mayores a 300 mg/dl en ambas cepas, mientras que los ratones STZ/Tc presentaban niveles ~100 mg/dl. Cuando se inyectó la glucosa, la glucemia aumento, no obstante a las 2 h se reestableció a los niveles basales.

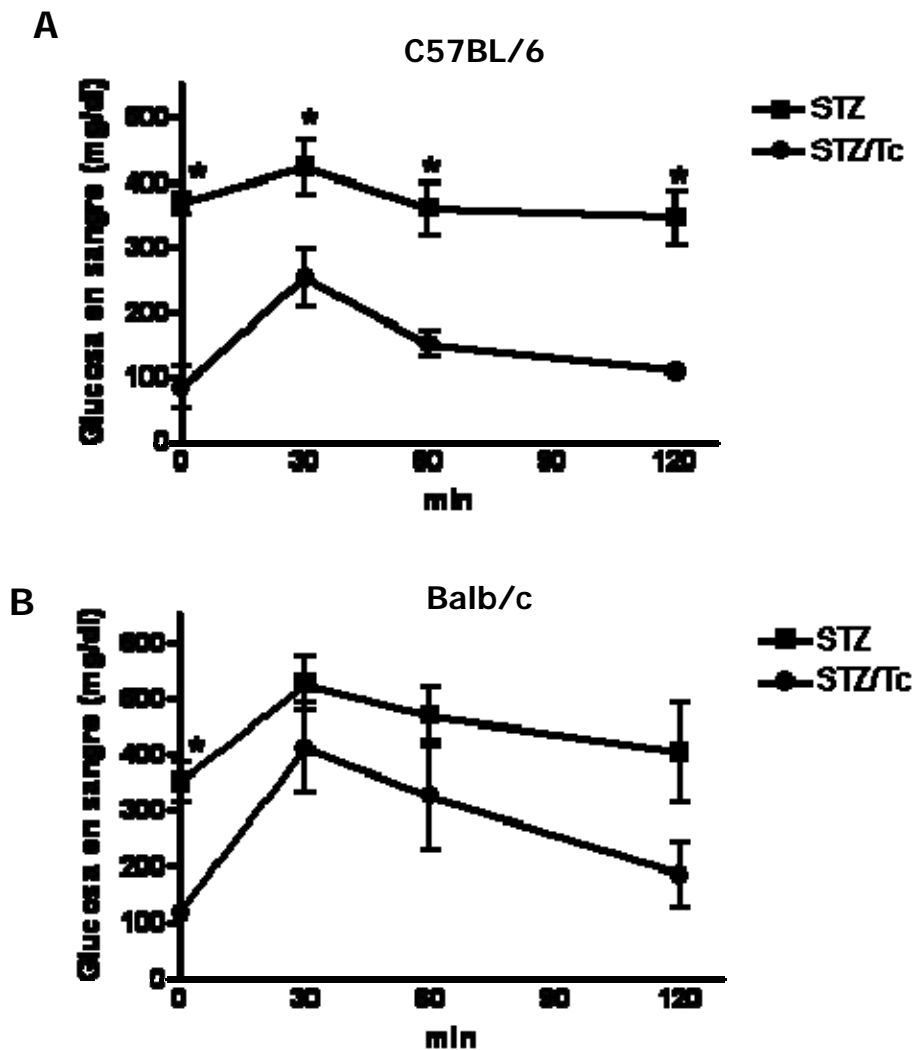


Figura 5. Prueba de Tolerancia a Glucosa. En la semana 6 p. i. se realizó la prueba en ayuno de 4-5 h, inyectando i. p. 1.5 g/kg de glucosa y evaluamos la glucemia por 2 h por periodos de 30 minutos. A) Ratones C57Bl/6 y B) Ratones Balb/c. Se expresan los datos de dos experimentos independientes de 5 ratones por grupo. * $p < 0.05$ t de Student (Graphpad).

Carga Parasitaria

En la semana 6 p.i. los ratones se sacrificaron y contamos los metacéstodos de la cavidad peritoneal, para conocer si se modificaba la carga parasitaria con el modelo de diabetes experimental con DB-STZ entre los grupos. En la cepa C57Bl/6, figura 6 A, la parasitemia fue mayor en los ratones STZ/Tc que los Tc, es decir, los ratones diabéticos son más susceptibles a la infección. Sin embargo, en la cepa Balb/c (figura 6 B) no hubo diferencias entre los dos grupos.

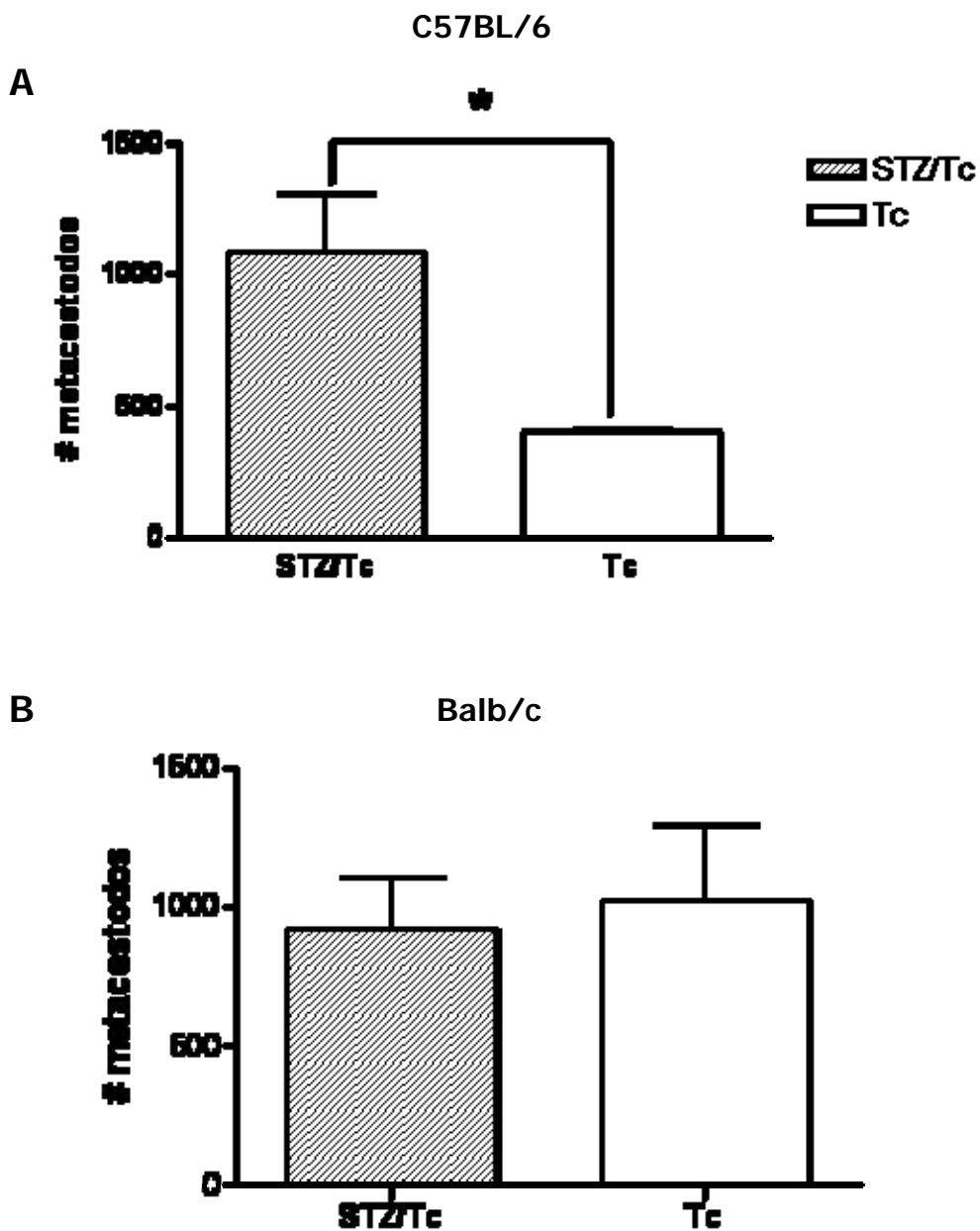


Figura 6. Parasitemia. Los ratones se sacrificaron a la semana 6 p. i. y se contó el número de metacistos de la cavidad peritoneal. A) Cepa C57Bl/6; B) Cepa Balb/c. Se expresan los datos de dos experimentos independientes (\pm 4 ratones por grupo); * $p < 0.05$ t de Student (Graphpad).

Citocinas por ELISA-sandwich

Se cuantificaron TNF- α e IL-4, dos citocinas importantes en la respuesta proinflamatoria y anti-inflamatoria, respectivamente. Los sueros se obtuvieron durante las 6 semanas p. i. Los ratones C57BL/6 (figura 7A) presentaron los valores mayores de TNF- α , siendo en la semana 3 y 5 donde se encontraron diferencias significativas entre los grupos (STZ y STZ/Tc); mientras que, los ratones Balb/c (figura 8A) no exhibieron diferencias significativas entre grupos.

Observamos un patrón distinto en la IL-4, donde ratones STZ/Tc expresaron niveles superiores de dicha citocina en ambas cepas. En los de la cepa C57BL/6 (figura 7B), las diferencias significativas se observaron entre las semanas 2 a la 4, mientras que en los ratones Balb/c (figura 8B), las diferencias significativas se observaron en todas las semanas del grupo STZ/Tc.

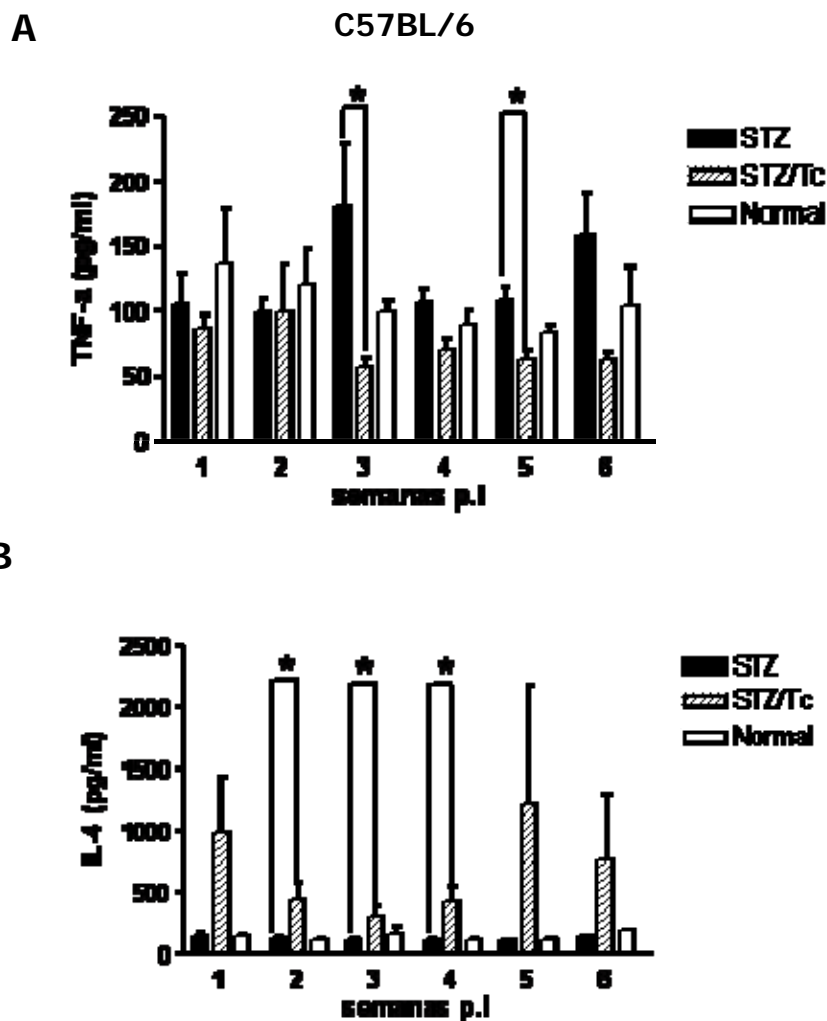


Figura 7. Detección de citocinas en suero de los ratones C57BL/6 de las 6 semanas de p. i. por el método ELISA-sandwich. A) TNF- α y B) IL-4. Se muestran los datos de 3 experimentos independientes. *p <0.05 t de Student (Graphpad).

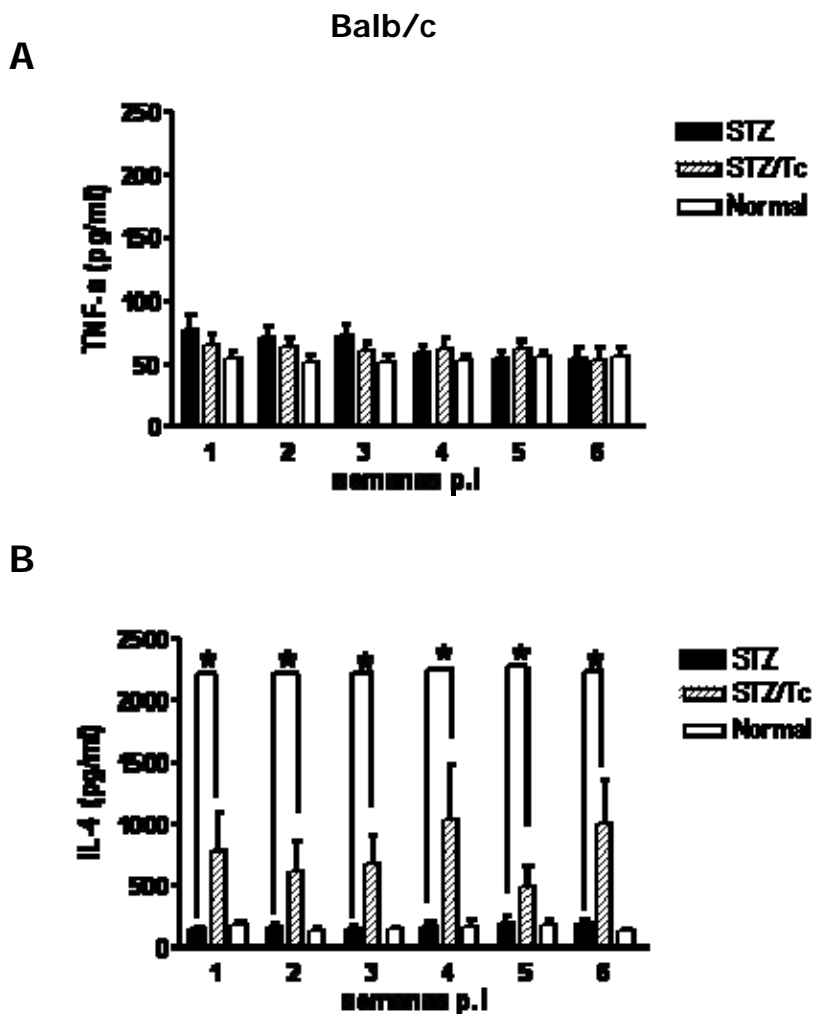


Figura 8. ELISA-sandwich de citocinas en suero de los ratones de la cepa Balb/c de las 6 semanas de experimentación. A) TNF- α y B) IL-4. Se presentan los datos de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ t de Student (Graphpad).

Histología e Inmunohistoquímica

Para comprobar si los animales infectados presentaban infiltrado celular, se extrajeron los páncreas de los diferentes grupos experimentales a la 6 semanas p. i. de DB-STZ. Realizamos la técnica de hematoxilina-eosina (H&E), contamos el número de islotes con o sin infiltrado celular e inmunohistoquímica para observar la presencia de insulina en los islotes pancreáticos.

En la H & E, los ratones C57BL/6 tratados con STZ sí presentaron infiltrado celular en la semana 6, presentando hasta grado 2 de infiltración (figura 9 A y B), es decir, cada islote tenía infiltrado < del 50%. En cambio, en los STZ/Tc ninguno de los islotes presentó infiltrado y la morfología de los islotes fue similar al grupo normal (es decir, una forma redondeada, con células circulares en su interior y sin infiltrado celular).

En la inmunohistoquímica de insulina (figura 10), observamos que los ratones con STZ pierden la insulina en los islotes de manera significativa, mientras que, los ratones infectados (STZ/Tc) y normales mostraron alta presencia de insulina en los islotes pancreáticos.

A



B

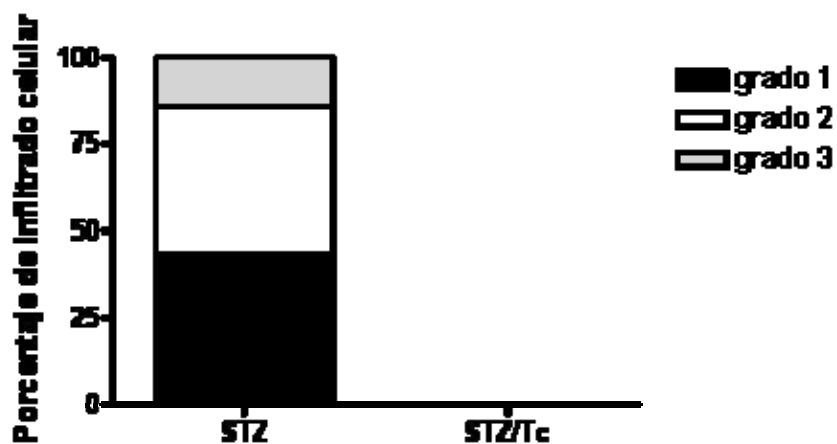


Figura 9. H & E y conteo de islotes infiltrados. A la semana 6 p. i. se sacrificaron los ratones y se extrajeron los páncreas y se realizaron cortes de 5 μ m. Ratones C57BL/6. A) Tinción H&E de Islotes del Páncreas de ratones. B) Conteo de Islotes Pancreáticos de 10 ratones de cada grupo. Evaluando el grado de insulitis. Grado 0= Sin Infiltrado; grado 1= Infiltrado peri-insular; grado 2= < del 50% de Infiltrado; grado 3= > del 50% de infiltrado, dañando la morfología del islote.

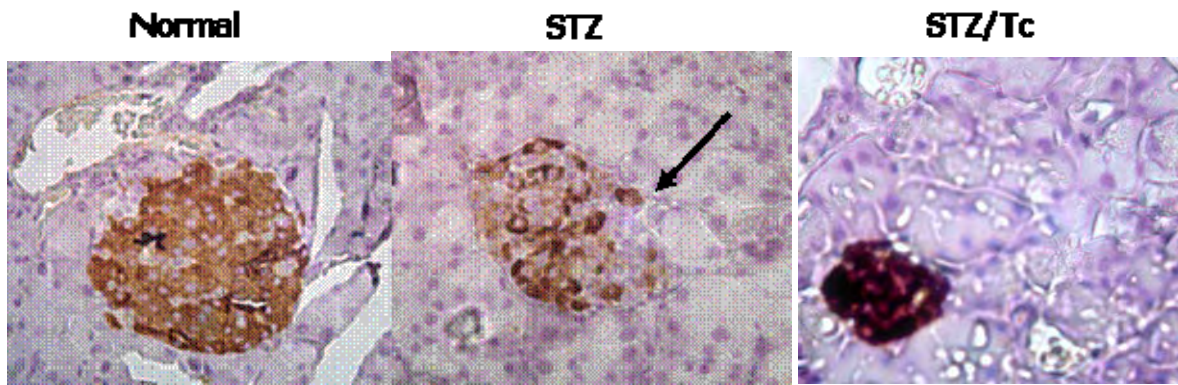


Figura 10. Inmunohistoquímica de Insulina. Posterior al sacrificio de los ratones, en la semana 6 p. i., los páncreas se extrajeron y en cortes de 5 μm se siguió la técnica para la inmunohistoquímica de insulina, utilizando como anticuerpo primario Insulina Ab-6 (INS04 + INS05) y el kit comercial DakoEnVision + System HRP (DAB).

En los Balb/c, ninguno de los ratones STZ/Tc presentaron infiltrado celular, y conservaron la morfología de islotes sanos; al contrario, los ratones con STZ, si exhibieron infiltrado celular desde grado 0 hasta grado 3 y los islotes se deformaron (figura 11 A y B). En cuanto a la inmunohistoquímica (figura 12), nuevamente los islotes de animales con STZ mostraron menor insulina e inclusive en algunos fue indetectable; al contrario, los islotes del grupo STZ/Tc fueron similares a los normales.

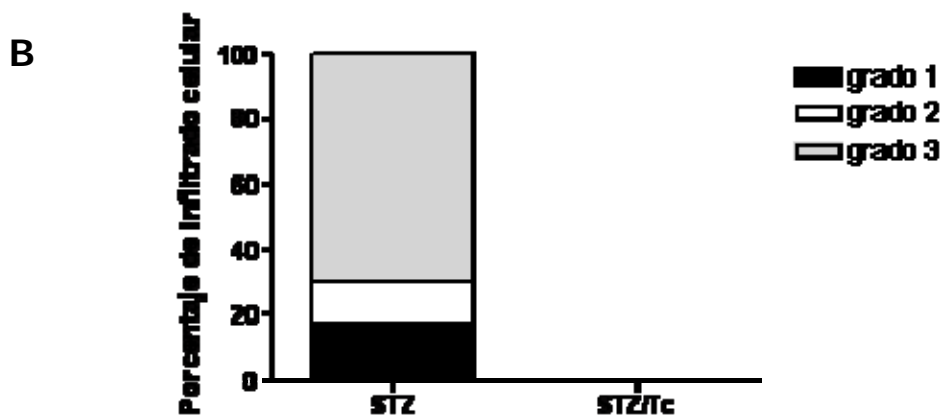
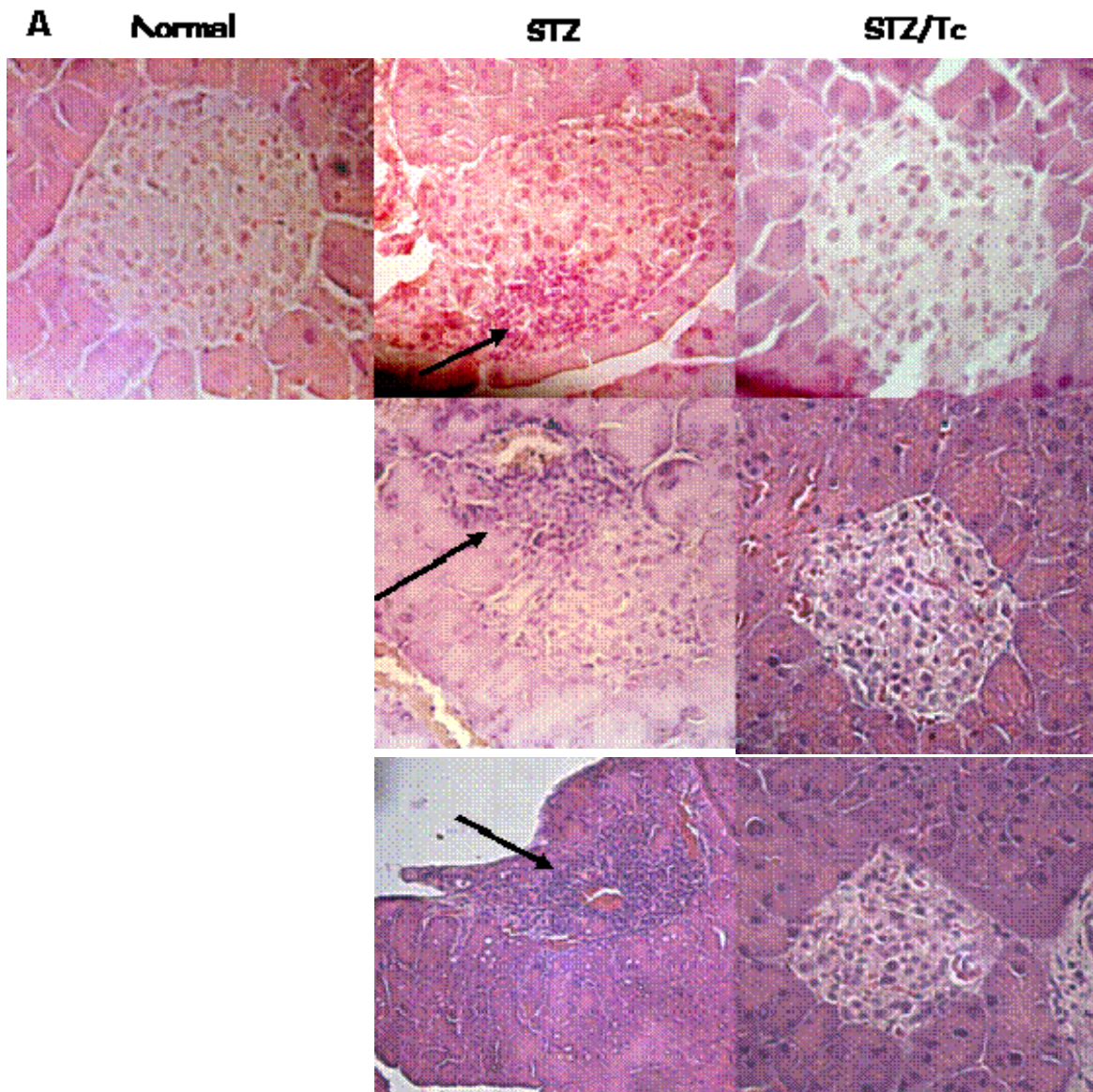


Figura 11. Tinción H&E de Islotes del Páncreas y conteo de insulinitis. Los páncreas son obtenidos de ratones Balb/c a la semana 6 p. i. Cortes histológicos de 5 μ m de grosor. A) H & E páncreas de ratón Normal, STZ, y STZ/Tc. Las flechas indican el infiltrado celular (40X). B) Porcentaje de infiltrado celular, evaluando el grado de insulinitis. Grado 0= Sin Infiltrado; grado 1= Infiltrado peri-insular; grado 2= < del 50% de Infiltrado; grado 3= > del 50% de infiltrado, dañando la morfología del islote.

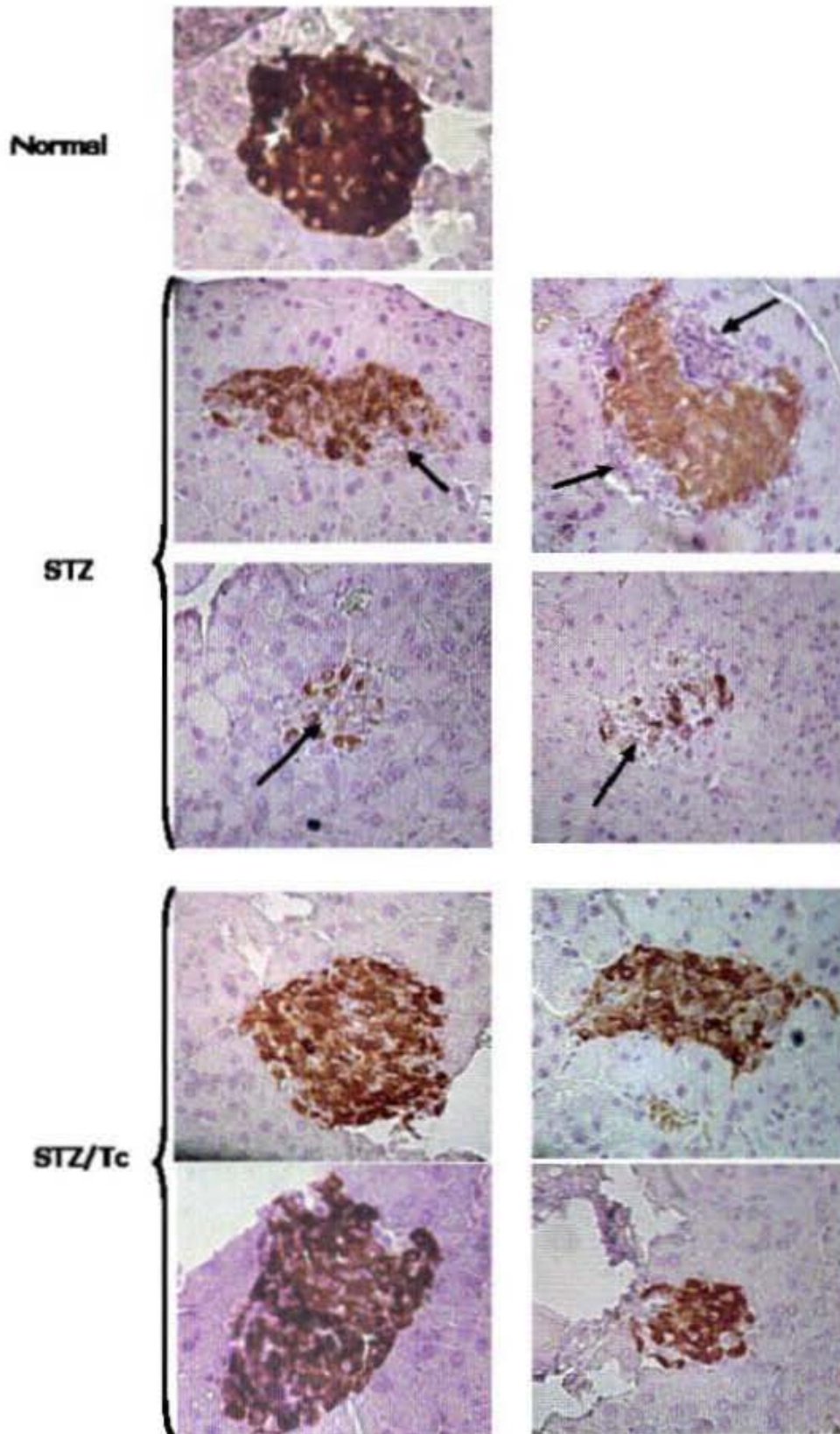


Figura 12. Inmunohistoquímica de Insulina. Cortes de páncreas de 5 μm de ratones Balb/c. Normal, STZ y STZ/Tc (40X). Animales de 6 semanas post-inducción. Las flechas indican áreas sin insulina en los islotes pancreáticos. Utilizando como anticuerpo primario Insulina Ab-6 (INS04 + INS05) y el kit comercial DakoEnVision + System HRP (DAB).

Presencia de Treg

Para conocer si la infección con *T. crassiceps* modifica la población de Treg, realizamos citometría de flujo de los ganglios linfoides de ratones normales e infectados de la cepa Balb/c, utilizando como marcadores CD4, CD25 y Foxp3. Demostramos que existe un porcentaje bajo de Treg tanto en los ratones normales como en los infectados, confirmando así que no hay alteraciones en la población de Treg. Confirmando que la población de Treg no se modifica y por tanto, no tienen un papel en la diabetes con DB-STZ.

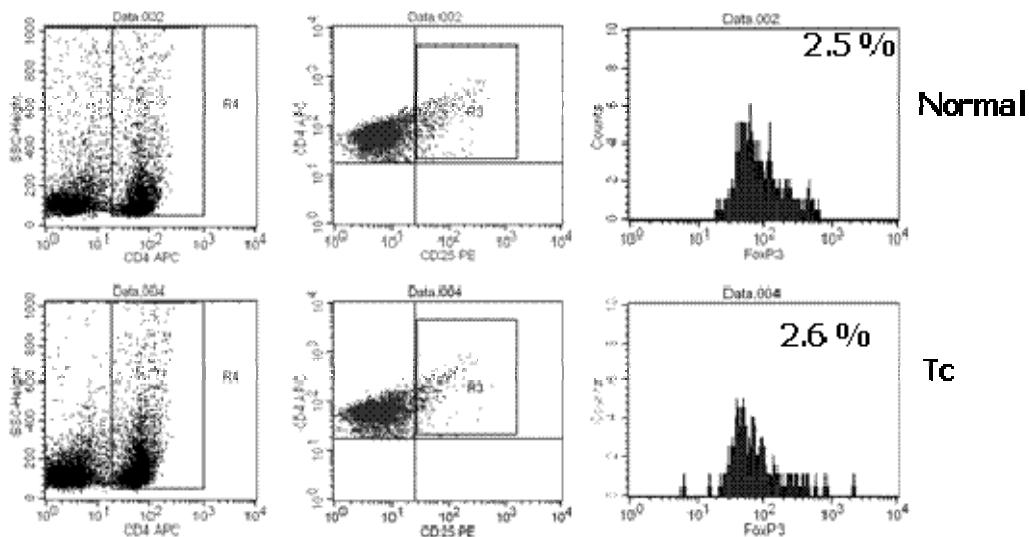


Figura 13. Citometría de Flujo de Treg, obtenidas de los ganglios linfáticos a la semana 8 de infección con *T. crassiceps* y en el grupo control (sin infección), marcadas con CD4-APC, CD25-PE y FoxP3 Alexa Fluor 488.

Macrófagos Alternativamente Activados

Analizamos la presencia de AAMΦs en los ratones de ambas cepas para conocer si hay alteraciones en la población cuando los ratones están infectados y diabéticos. Para ello, se obtuvieron células del peritoneo en la semana 6 p. i. de los diferentes grupos y cepas; dichas células fueron ajustadas a 1×10^6 por tubo, y se marcaron con anticuerpos anti- F4/80, CD23, MHC II, MMR, PDL-1, que se utilizan para diferenciar a la población alternativa de activación. Subdividimos las poblaciones celulares en 3, dependiendo de su tamaño y granularidad: siendo la población superior (o "hi"), donde se encuentran la mayoría de los AAMΦs; seguido de la población mediana (o

“medium”), con menor granularidad que la anterior y un poco más pequeños; y por último la población baja (o “low”), con menor granularidad que las anteriores y donde se incluyen otras poblaciones celulares, no solamente macrófagos.

Encontramos que en los ratones de la cepa C57BL/6 (figura 14), los macrófagos superiores no presentaron los marcadores de activación alternativa excepto en los del grupo Tc, donde hubo expresión de CD23, MHC-II, PDL-1 y MMR, al parecer, los AAMΦs son más pequeños en esta cepa y con menor granularidad; la siguiente población de macrófagos (mediana), los del grupo STZ/Tc y Tc, si expresan todos los marcadores para AAMΦs, mientras que el grupo STZ, expresan MHC II y MMR. En cuanto a la ultima población, como podemos observar, solamente los ratones con STZ expresan CD23 y MHC II; en los demás grupos no hay expresión de marcadores.

Observamos que los ratones diabéticos (STZ) de la cepa Balb/c (figura 15), al igual que los normales mostraron una expresión baja de los marcadores de AAMΦs, a diferencia de los grupos infectados (STZ/Tc y Tc), siendo los STZ/Tc los que presentaron mayor expresión de todos los marcadores en la población superior y la mediana. Solamente los ratones con STZ expresaron CD23 y MHC II. En cuanto a la población baja, la expresión de todos los marcadores disminuyó en todos los grupos experimentales, lo que sugiere que en esta población no hay macrófagos.

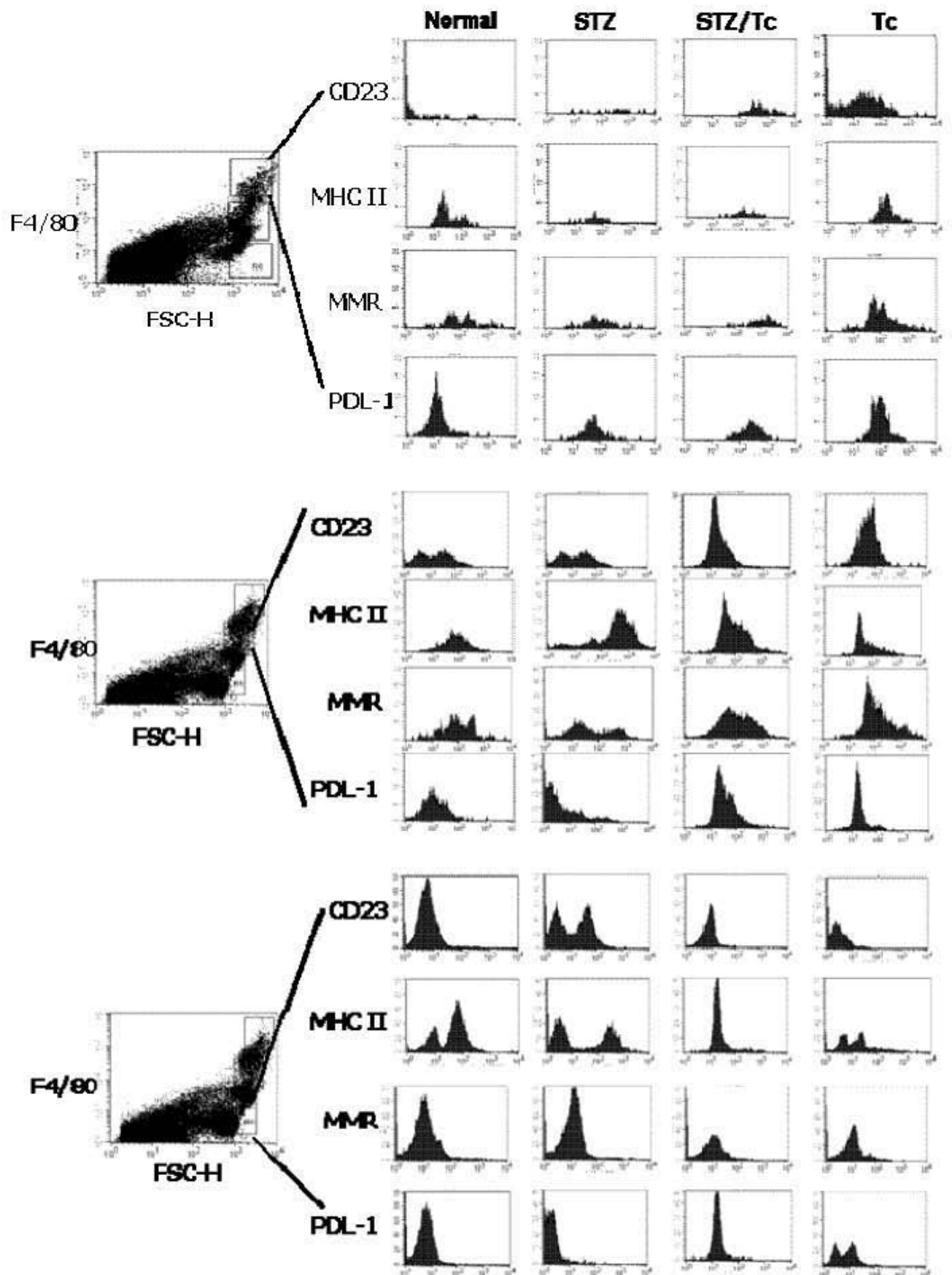


Figura 14. Citometría de flujo de células peritoneales de ratones C57BL/6, En la semana 6 p. i., las células peritoneales fueron ajustadas a 1×10^6 y marcadas con F4/80-FITC, MMR-APC, F4/80-APC, PDL-1-PE, CD23-FITC, MHCII-FITC.

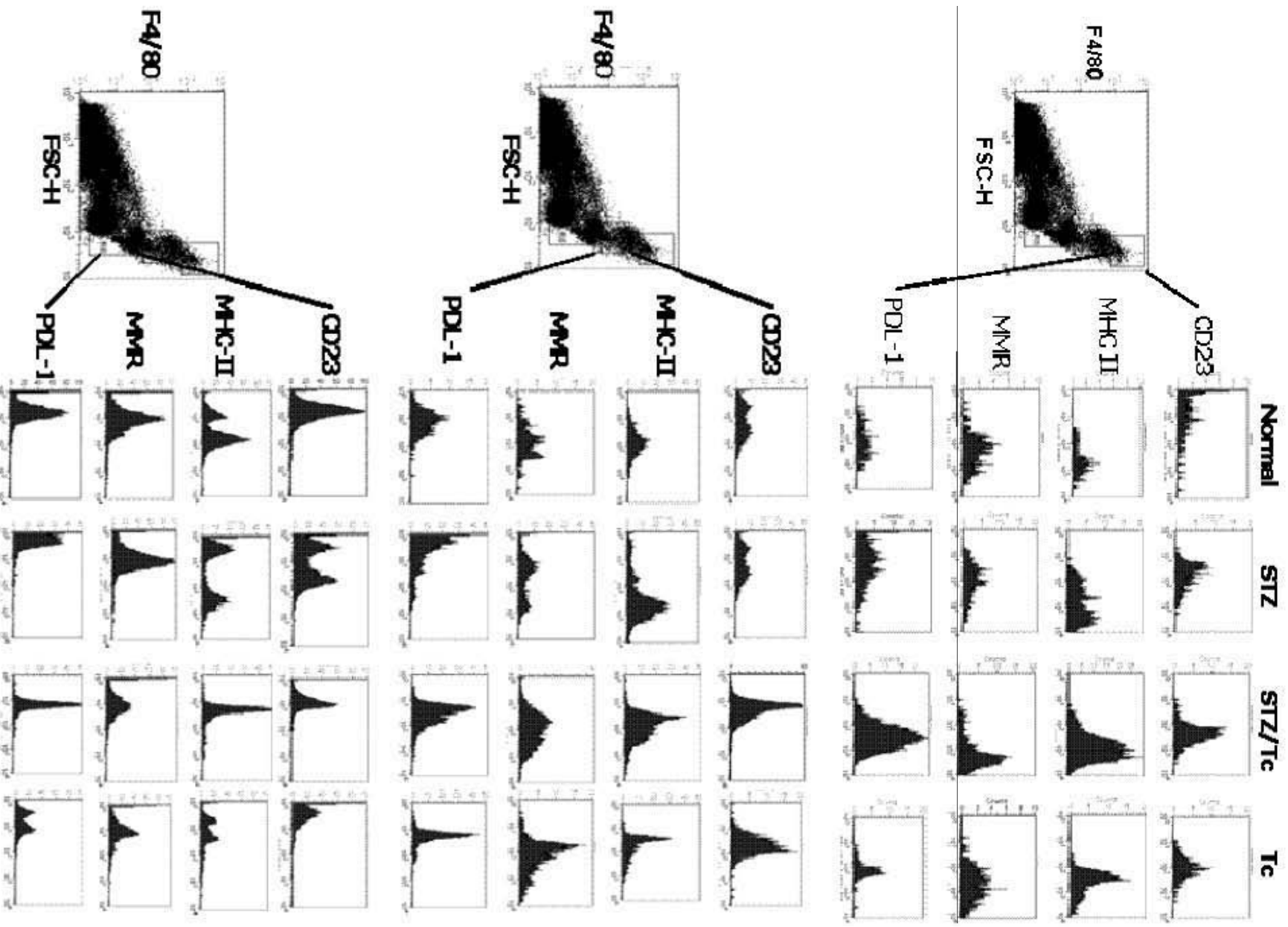


Figura 15. Citometría de flujo. Células peritoneales de ratones Balb/c, a la semana 6 p. i., marcados con F4/80-FITC, MMR-APC, F4/80-APC, PDL-1-PE, CD23-FITC, MHCII-FITC.

Para corroborar el fenotipo de los macrófagos, realizamos RT-PCR de los macrófagos obtenidos del peritoneo de los ratones Balb/c a la semana 6 p. i. Observamos que los ratones con STZ/Tc expresan marcadores de AAMΦs como RELM- α y PDL-1, en contraste con los ratones diabéticos, que no los expresaron.

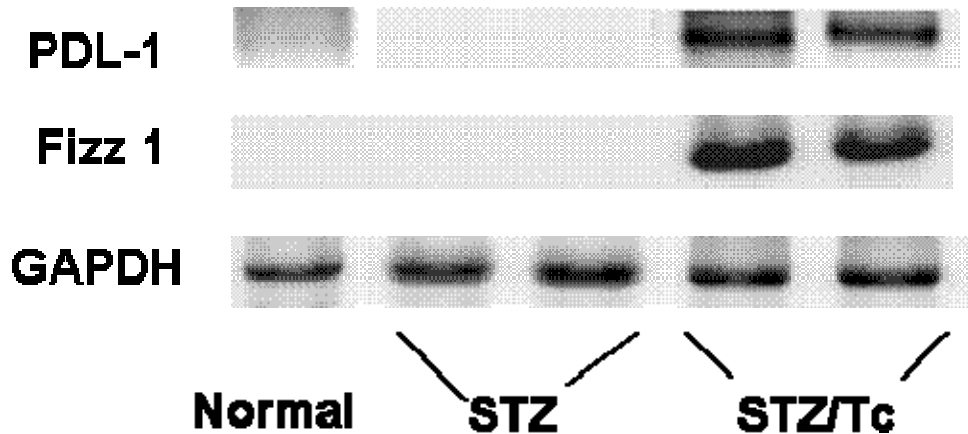


Figura 16. RT-PCR de macrófagos de ratones Balb/c. Obtenidos vía i. p. a la semana 6 p. i. y cultivados por 2 horas en placas.

Finalmente, para comprobar si el antígeno de *T. crassiceps* tenía el mismo efecto que la infección con el parásito regulando la T1DM, tratamos a los ratones con antígeno y los agrupamos en: antígeno constante (AgC), es decir, se administraron i. p. 50 μ g de Ag por ratón tres veces por semana, una semana antes de la inducción de diabetes y durante las seis semanas p. i. ; antígeno antes (AgA), los animales solamente se trataron una semana antes de las DB-STZ con antígeno i.p., 50 μ g y por último los ratones con STZ y los normales. Como observamos en la figura 17, los animales que se trataron con AgC si tuvieron un efecto protector, presentando glucemias, inferiores a 200 mg/dl en general, en todas las semanas, pero cuando el antígeno se administró solo una semana antes (AgA), las glucemias fueron bajas solamente antes de la semana 2, y posteriormente las glucemias aumentaron e inclusive a la semana 6 llegaron a ser iguales a las del grupo con STZ. Al parecer, se necesita de administraciones consecutivas del antígeno para que este tenga efecto óptimo sobre la diabetes tipo 1, ya que cuando se administró una sola vez, el efecto protector desapareció conforme pasó el tiempo.

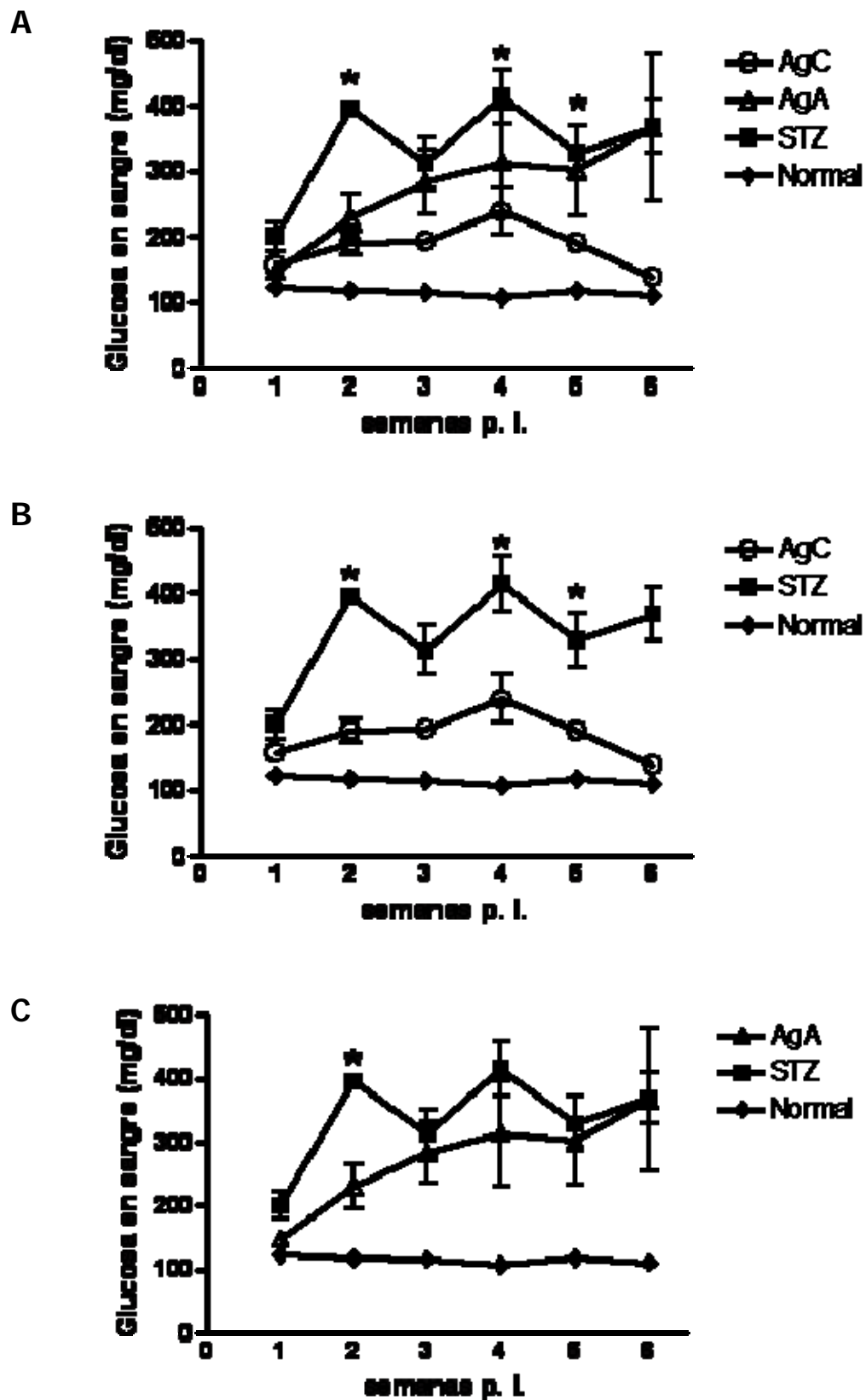


Figura 17. Glucemias de ratones Balb/c tratados con antígeno. A los ratones Balb/c se les administro antígeno de *T. crassiceps* 50 μ g/ratón vía i. p. tres veces por semana. Antes y durante todo el experimento (AgC) ó bien, animales tratados solamente una semana antes de la inducción de diabetes (AgA). La administración del Ag fue vía i.p, 50ug/ratón tres veces por semana. Se midió la glucosa en sangre con ayuda de un glucómetro Accu-Check en ayuno. A) todos los grupoide ratones, AgC, AgA, STZ y Normal; B) solo ratones AgC, STZ y Normal; C) Animales grupo tratado con AgA, STZ y Normal. * $p < 0.05$ t de Student (Graphpad).

DISCUSIÓN

El sistema inmune es un conjunto de procesos biológicos designados para defender el cuerpo contra la invasión de patógenos o células tumorales. El sistema inmune suele ser tolerante y distinguir entre lo propio y lo no propio. Sin embargo, como en cualquier sistema complejo, se producen fallas en el funcionamiento, produciendo enfermedades. La autoinmunidad es una consecuencia del rompimiento de la autotolerancia; el resultado es un ataque del sistema inmune sobre varios órganos y tejidos [54].

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune resultado de la destrucción de las células β productores de insulina en los islotes pancreáticos; dicha enfermedad, está influenciada por factores tanto genéticos como ambientales [4, 9]. En este estudio, se comprobó que las dosis bajas con STZ, si inducen diabetes tipo 1 experimental, ya que los ratones presentan hiperglucemia, infiltrado celular en los islotes pancreáticos y producción de citocinas proinflamatorias. Al parecer, el fondo genético de los animales fue un factor importante en la susceptibilidad o resistencia a algunas enfermedades. Anteriormente, se había descrito que los ratones de la cepa C57BL/6 (MHC haplotipo H2^b) son más susceptibles a la diabetes experimental con DB-STZ, y los de la cepa Balb/c (MHC haplotipo H2^d) son resistentes [55]. Al contrario, en cuanto a la infección con *T. crassiceps*, los ratones Balb/c son susceptibles, mientras que, los ratones C57BL/6 son relativamente resistentes [56]. En este estudio, los ratones C57BL/6, presentaron hiperglucemias < a 500mg/dl en los ratones diabéticos, pero la parasitemia en los ratones solamente infectados (Tc) fue de 500 metacéstodos aproximadamente. Una característica que observamos en la carga parasitaria en esta cepa de ratones fue que los STZ/Tc aumentan la carga parasitaria, al parecer, la diabetes experimental hace más susceptibles a los ratones de esta cepa, ya que las cargas parasitarias aumentan al doble de lo esperado. En los ratones Balb/c, las hiperglucemias oscilaron entre los 400mg/dl, pero las cargas parasitarias fueron de aproximadamente 1000 metacéstodos en los STZ/Tc y Tc, es decir, las cargas parasitarias no se modificaron en los grupos experimentales. Al parecer, la infección con *T. crassiceps* puede revertir la diabetes experimental, ya que los ratones de la cepa C57BL/6, posterior a la semana 4 disminuyeron sus glucemias en sangre, llegando a valores muy similares a los normales. La respuesta anti-inflamatoria que causa el parásito en esta cepa de ratones, se atrasa, pero al igual que en Balb/c promueve un efecto regulador.

Estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que las infecciones por helmintos pueden tener un efecto protector contra el desarrollo de enfermedades autoinmunes y alérgicas [30, 57]. En modelos murinos con diabetes tipo 1, se ha demostrado que la infección con *S. mansoni*, *H. polygyrus*, *L. sigmodontis*, y *T. spiralis* reducen e inclusive inhiben el desarrollo de la diabetes autoinmune en ratones NOD e inducidos con DB-STZ [21, 22, 24, 32]. Encontramos que la infección con *Taenia crassiceps* disminuyó la incidencia y los síntomas de la diabetes tipo 1 experimental, siendo que solamente cerca del 20% en la cepa C57Bl/6 y del 50% en la cepa Balb/c desarrollan la enfermedad. Y de estos ratones con diabetes, la hiperglucemia también disminuyó, los ratones con STZ presentaron valores ~ a 400 mg/dl, desde la segunda semana, considerados como diabéticos; mientras que, los ratones previamente infectados con *T. crassiceps* (STZ/Tc) las glucemias fueron menores a 200 mg/dl en ambas cepas.

Los helmintos provocan una respuesta Th2, eosinofilia, basofilia, mastocitosis, y niveles elevados en suero de IgE e IgG-1 a su vez, incrementan IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-21 e IL-25 (IL-17E) en sus hospederos [42, 43]. La infección con *T. crassiceps*, al favorecer la respuesta hacia Th2 [58], y contrarrestar los efectos de las citocinas proinflamatorias, influye en la reducción de la enfermedad. Esto lo comprobamos con las citocinas en suero, ya que los ratones infectados presentaron más IL-4 que los diabéticos (en las dos cepas). IL-4 es una citocina anti-inflamatoria que promueve la proliferación celular e impide la apoptosis de las células [59], en el caso de los ratones con diabetes, se ha demostrado que la deficiencia de IL-4 o bien el bloqueo de la misma, promueve el desarrollo de la enfermedad y los síntomas se amplifican [60, 61]. Sería importante conocer con más detalle el papel de dicha citocina en la regulación de la diabetes 1 experimental con la infección de *T. crassiceps*, que hasta el momento no se ha establecido. Por otra parte, los ratones tratados con STZ pero no infectados, incrementaron los niveles de TNF- α , aunque solamente en el caso de los ratones C57BL/6.

La infección con *T. crassiceps* a su vez, evitó el daño en el páncreas, y por tanto no hubo infiltrado celular de los islotes pancreáticos. La inmunohistoquímica demostró que los ratones con STZ producen menos insulina, mientras los STZ/Tc son muy similares a los normales. Esto es, la infección redujo de manera importante la infiltración de los islotes pancreáticos y la destrucción de las células beta, y por tanto, la producción de insulina fue muy similar a los controles.

En las infecciones por algunos helmintos se ha demostrado que pueden inducir ciertas poblaciones de células reguladoras como las Treg, AAMΦs y NKTs. Las células Treg contribuyen significativamente al mantenimiento de la tolerancia periférica, aunque pueden fallar controlando a las células efectoras autoreactivas durante la autoinmunidad [62]. Por ejemplo, en los ratones NOD, se ha demostrado que la exposición de la infección por *S. mansoni* o la administración del antígeno soluble confiere protección contra la diabetes, incrementando la frecuencia y activación de las Treg Foxp3⁺. La generación de Treg requiere la presencia de células dendríticas y es dependiente de un ambiente rico en citocinas IL-10, IL-2 y TGF-β [23]. En este estudio, encontramos que la población de células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ no se altera en los grupos normal e infectados con *T. crassiceps*, presentándose un porcentaje del 2.5%, en ambos grupos. Por lo que podemos concluir que las Treg no participan en el control de la infección ni en la diabetes. A diferencia de otros parásitos como *S. mansoni*, *B. malayi*, *H. polygyrus*, *L. sigmodontis* donde se ha demostrado que se aumenta la población de células Treg frente a estas infecciones [23, 63-66].

Los macrófagos juegan un papel crucial en la inmunidad innata y adaptativa en respuesta a microorganismos y son los principales mediadores de la respuesta inflamatoria. Durante la infección, las funciones efectoras de los macrófagos son críticas para la eliminación de patógenos. *In vitro*, dos principales poblaciones de macrófagos se han caracterizado. Los clásicamente activados inducidos por IFN-γ, con propiedades pro-inflamatorias y los alternativamente activados inducidos por citocinas Th2, y que expresan citocinas anti-inflamatorias y está relacionados en la reparación del tejido [67].

La infección con *T. crassiceps* incrementó la población de macrófagos F4/80⁺ que expresan CD23, MHC-II, PDL1, MR, RELM-α, en los ratones STZ/Tc. Los AAMΦs solamente están presentes en los ratones Tc y STZ/Tc, e inclusive la expresión de los marcadores es más pronunciada en los ratones diabéticos e infectados. En los C57BL/6 los macrófagos alternativamente activados son más pequeños y menos granulares que en los Balb/c, ya que la mayoría los encontramos en la población mediana. En cambio, en los Balb/c, los macrófagos alternativamente activados son más grandes y granulares, y la mayoría se presenta en la población superior. Otra forma de comprobar la presencia de AAMΦs en los ratones, fue por RT-PCR de macrófagos

peritoneales, donde encontramos que los ratones STZ/Tc expresaban RELM- α y PDL-1, mientras los animales STZ no los expresaron. Hasta el momento, se conoce muy poco de la asociación los AAM Φ s con la diabetes tipo 1, sin embargo, se ha comprobado la participación de los CAM Φ en el desarrollo de la insulinitis y la diabetes, ya que son contribuyentes principales para crear un ambiente adecuado para desarrollar y activar células T CD4+ y CD8+ que causan la diabetes autoinmune en ratones NOD [49, 50]. El papel de los AAM Φ s en la diabetes tipo 1 sería supresora, inhibiendo la insulinitis del páncreas. Se necesitarían de más estudios que comprueben el papel de los AAM Φ s en la diabetes experimental como puede ser, su eliminación por medio de liposomas con clodronato, o bien la administración de macrófagos a ratones diabéticos.

En este trabajo, para evidenciar si la administración del antígeno podría tener los mismos efectos protectores que la infección con *T. crassiceps*, inyectamos a ratones diabéticos con el antígeno. Encontramos que, cuando se administra el antígeno una sola vez, no hay protección, pero cuando se administró en forma constante tuvo efecto protector aunque no tan fuerte como cuando los ratones fueron infectados. Al parecer se requiere de ciertos productos de secreción/excreción del parásito vivo, para tener una respuesta mayor contra la diabetes tipo 1.

Esta investigación abre la brecha hacia nuevas aportaciones que serían de importancia, tanto científica como médica. Nos da pauta para continuar con la investigación y resolver dudas acerca de la protección de la infección con *T. crassiceps* y la diabetes tipo 1. En primera instancia, la búsqueda de las células que estarían participando en la protección de la diabetes tipo 1. Comprobar si, los productos excretados/secretados del parásito pueden también regular la diabetes tipo 1. Demostrar si los AAM Φ s son células importantes en la regulación. O bien si existen otras células que promueven la protección. Si IL-4 es una citocina importante en la regulación de la diabetes con la infección con *T. crassiceps*.

CONCLUSIONES

- ❖ La infección con *T. crassiceps* reduce la incidencia, hiperglucemia e insulinitis de la diabetes experimental.
- ❖ La infección previa con *T. crassiceps* protege contra la diabetes tipo 1 experimental.
- ❖ Las células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ no tienen participación en la infección con *T. crassiceps* ni en la diabetes tipo 1 experimental.
- ❖ La administración del antígeno de *T. crassiceps* en los animales diabéticos debe ser constante para que tenga un efecto regulador sobre la enfermedad. Aunque la protección no es tan marcada como la infección *in vivo* del parásito.
- ❖ Existe una relación entre la presencia de AAMΦs y menor daño en el páncreas.
- ❖ Se necesita conocer con más detalle el papel de las células que participan en la regulación de la diabetes experimental por la infección con *T. crassiceps*.

APENDICE I

Buffer de solución salina con fosfatos (PBS) para 10 litros y pH 7.4

80gr de NaCl (Baker)

11.6 gr de Na₂PO₄ (Baker)

2gr KH₂PO₄ (Baker)

2gr KCl (ICN Biomedicals Inc)

Buffer TBE 10x

Tris Base 890mM (sigma Chemicals)

Ácido Borico 890mM (Baker)

40 ml de 0.5 M Ácido Etilenediaminatetra-acético (EDTA) disódico

pH 8.0

Se afora a 500 ml con Agua destilada

Buffer de Pegado (ELISA)

0.1M de Na₂HPO₄ (Baker)

Para 1L con Agua destilada

Solución de Lavado (ELISA)

1L de PBS más 0.5% de Tween 20 (Promega)

Solución de bloqueo (ELISA)

100 ml de PBS más 1% de Albumina serica bovina (ICN, biochemicals)

Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN, biochemicals) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (Tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey). Llevar a un pH 4.35 y se incubaron a -70°C.

BIBLIOGRAFIA

1. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2007. **30 Suppl 1**: p. S42-7.
2. Jahromi, M.M. and G.S. Eisenbarth, *Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(7-8): p. 865-72.
3. Cooke, A., et al., *Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace?* Trends Parasitol, 2004. **20**(7): p. 316-21.
4. Denis, M.C., et al., *Imaging inflammation of the pancreatic islets in type 1 diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12634-9.
5. von Herrath, M., S. Sanda, and K. Herold, *Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease?* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 988-94.
6. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. Physiol Res, 2001. **50**(6): p. 537-46.
7. Wood, S.C., T.D. Rao, and A.B. Frey, *Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/cBy mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4*. Cell Immunol, 1999. **192**(1): p. 1-12.
8. Mensah-Brown, E.P., et al., *IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin*. Eur J Immunol, 2006. **36**(1): p. 216-23.
9. Biros, E., M.A. Jordan, and A.G. Baxter, *Genes mediating environment interactions in type 1 diabetes*. Rev Diabet Stud, 2005. **2**(4): p. 192-207.
10. Alizadeh, B.Z. and B.P. Koeleman, *Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes*. Clin Chim Acta, 2008. **387**(1-2): p. 9-17.
11. Gillespie, K.M., *Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention*. Cmaj, 2006. **175**(2): p. 165-70.
12. Rabinovitch, A. and W.L. Suarez-Pinzon, *Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus*. Biochem Pharmacol, 1998. **55**(8): p. 1139-49.
13. Daneman, D., *Type 1 diabetes*. Lancet, 2006. **367**(9513): p. 847-58.
14. Notkins, A.L., *Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 43545-8.
15. Zacccone, P., et al., *Parasitic worms and inflammatory diseases*. Parasite Immunol, 2006. **28**(10): p. 515-23.
16. Homo-Delarche, F. and H.A. Drexhage, *Immune cells, pancreas development, regeneration and type 1 diabetes*. Trends Immunol, 2004. **25**(5): p. 222-9.

17. Chen, C., et al., *Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 733-44.
18. Zacccone, P., O.T. Burton, and A. Cooke, *Interplay of parasite-driven immune responses and autoimmunity*. Trends Parasitol, 2008. **24**(1): p. 35-42.
19. Vercelli, D., *Mechanisms of the hygiene hypothesis--molecular and otherwise*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(6): p. 733-7.
20. Bach, J.F., *Infections and autoimmune diseases*. J Autoimmun, 2005. **25 Suppl**: p. 74-80.
21. Cooke, A., et al., *Infection with Schistosoma mansoni prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice*. Parasite Immunol, 1999. **21**(4): p. 169-76.
22. El-Wakil, H.S., et al., *Effect of schistosoma mansoni egg deposition on multiple low doses streptozotocin induced insulin dependent diabetes*. J Egypt Soc Parasitol, 2002. **32**(3): p. 987-1002.
23. Zacccone, P., et al., *Schistosoma mansoni egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice*. Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 1098-107.
24. Zacccone, P., et al., *Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes*. Eur J Immunol, 2003. **33**(5): p. 1439-49.
25. Elliott, D.E., et al., *Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(3): p. G385-91.
26. Smith, P., et al., *Infection with a helminth parasite prevents experimental colitis via a macrophage-mediated mechanism*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4557-66.
27. Moreels, T.G., et al., *Concurrent infection with Schistosoma mansoni attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats*. Gut, 2004. **53**(1): p. 99-107.
28. Khan, W.I., et al., *Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice*. Infect Immun, 2002. **70**(11): p. 5931-7.
29. Summers, R.W., et al., *Trichuris suis therapy in Crohn's disease*. Gut, 2005. **54**(1): p. 87-90.

30. van Riet, E., F.C. Hartgers, and M. Yazdanbakhsh, *Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms*. Immunobiology, 2007. **212**(6): p. 475-90.
31. Maizels, R.M., et al., *Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections*. J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2059-66.
32. Saunders, K.A., et al., *Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 397-407.
33. Imai, S., H. Tezuka, and K. Fujita, *A factor of inducing IgE from a filarial parasite prevents insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(5): p. 1051-8.
34. Hubner, M.P., J.T. Stocker, and E. Mitre, *Inhibition of type 1 diabetes in filaria-infected non-obese diabetic mice is associated with a T helper type 2 shift and induction of FoxP3+ regulatory T cells*. Immunology, 2009. **127**(4): p. 512-22.
35. La Flamme, A.C., K. Ruddenklau, and B.T. Backstrom, *Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Infect Immun, 2003. **71**(9): p. 4996-5004.
36. Sewell, D., et al., *Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization*. Int Immunol, 2003. **15**(1): p. 59-69.
37. Nagayama, Y., et al., *Schistosoma mansoni and alpha-galactosylceramide: prophylactic effect of Th1 Immune suppression in a mouse model of Graves' hyperthyroidism*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 2167-73.
38. McInnes, I.B., et al., *A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 2127-33.
39. Elliott, D.E., et al., *Heligmosomoides polygyrus inhibits established colitis in IL-10-deficient mice*. Eur J Immunol, 2004. **34**(10): p. 2690-8.
40. Reardon, C., et al., *Tapeworm infection reduces epithelial ion transport abnormalities in murine dextran sulfate sodium-induced colitis*. Infect Immun, 2001. **69**(7): p. 4417-23.
41. Elliott, D.E., R.W. Summers, and J.V. Weinstock, *Helminths as governors of immune-mediated inflammation*. Int J Parasitol, 2007. **37**(5): p. 457-64.

42. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by Leishmania major and Leishmania mexicana infection, a role for alternatively activated macrophages*. Cell Immunol, 2006. **242**(2): p. 61-71.
43. Kreider, T., et al., *Alternatively activated macrophages in helminth infections*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(4): p. 448-53.
44. McKay, D.M., *The beneficial helminth parasite?* Parasitology, 2006. **132**(Pt 1): p. 1-12.
45. Terrazas, L.I., et al., *Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis*. Int J Parasitol, 2005. **35**(13): p. 1349-58.
46. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
47. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-83.
48. Noel, W., et al., *Alternatively activated macrophages during parasite infections*. Trends Parasitol, 2004. **20**(3): p. 126-33.
49. Calderon, B., A. Suri, and E.R. Unanue, *In CD4+ T-cell-induced diabetes, macrophages are the final effector cells that mediate islet beta-cell killing: studies from an acute model*. Am J Pathol, 2006. **169**(6): p. 2137-47.
50. Jun, H.S., et al., *The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 347-58.
51. Nair, M.G., et al., *Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 385-94.
52. Ruckerl, D., et al., *Alternatively activated macrophages express the IL-27 receptor alpha chain WSX-1*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 427-36.
53. Reyes, J.L. and L.I. Terrazas, *The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections*. Parasite Immunol, 2007. **29**(12): p. 609-19.
54. Kivity, S., et al., *Infections and autoimmunity--friends or foes?* Trends Immunol, 2009. **30**(8): p. 409-14.
55. Muller, A., et al., *Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin*. Immunobiology, 2002. **205**(1): p. 35-50.

56. Reyes, J.L., et al., *Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to Taenia crassiceps infection*. Infect Genet Evol, 2009.
57. Walsh, K.P., et al., *Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1577-86.
58. Toenjes, S.A., et al., *The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval Taenia crassiceps is a mixed Th1/Th2-type response*. Parasitology, 1999. **118 (Pt 6)**: p. 623-33.
59. Jiang, H., M.B. Harris, and P. Rothman, *IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(6 Pt 1): p. 1063-70.
60. Rapoport, M.J., et al., *Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 87-99.
61. Tominaga, Y., et al., *Administration of IL-4 prevents autoimmune diabetes but enhances pancreatic insulinitis in NOD mice*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. **86**(2): p. 209-18.
62. Bettini, M. and D.A. Vignali, *Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 2009.
63. McSorley, H.J., et al., *Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite Brugia malayi*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6456-66.
64. Rausch, S., et al., *Establishment of nematode infection despite increased Th2 responses and immunopathology after selective depletion of Foxp3(+) cells*. Eur J Immunol, 2009.
65. Taylor, M.D., et al., *Early recruitment of natural CD4+ Foxp3+ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection*. Eur J Immunol, 2009. **39**(1): p. 192-206.
66. Baumgart, M., et al., *Naturally occurring CD4+Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in Schistosoma mansoni egg-induced inflammation*. J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5374-87.
67. Varin, A. and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology*. Immunobiology, 2009.