



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Modulación de la colitis experimental por la
infección con *Taenia crassiceps***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA

BLANCA ESTELA CALLEJAS PIÑA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2013





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.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 8 de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de las FES-Iztacala, UNAM.

Durante la realización de este trabajo la alumna fue apoyada con la beca de titulación del Programa de Becas para la Educación Superior y una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de becario 167799.

Los avances de este proyecto se presentaron en el V Simposium de Inmunoparasitología, Ixtapan de la Sal, Edo. de México; Octubre 2012.

AGRADECIMIENTO

Al **Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés** por el apoyo y confianza que me ha brindado.

A la **UNAM** y a la **FES-Iztacala** por la oportunidad profesional.

A mis sinodales: **Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra, Dr. Adolfo Rene Méndez Cruz** y al **Dr. Arturo Calderón Vega**.

A la **M. en C. Yadira Ledesma Soto** y a la **M. en C. Fabiola Arlette Jiménez Espinosa**

A todos mis **compañeros** del laboratorio de Inmunoparasitología.

DEDICATORIAS

A mi madre **Carmen**:

Que siempre ha impulsado cada una de mis metas con su infinito amor y paciencia, sé que no ha sido fácil, tu fortaleza es un gran ejemplo a seguir. Te amo tanto mommy, este sueño fue posible gracias a ti, ambas sabemos eso.

A mis abus **Juanita** y **Sebastian**:

Gracias por todo, son parte importante de este éxito.

A mis hermanos **Ale**, **Wendy**, **Johan** y **Ayko**:

Gracias por ser parte de mi vida, no sería lo que soy sin la alegría que brota de cada uno de ustedes, amo que sean parte de esto.

A mis amigos **Isma**, **Quique**, **Edgar**, **Diego** e **Hichel**:

Fue espectacular aprender más de la vida en compañía de todos ustedes, jamás olvidaré todos esos momentos juntos.

A **Carlos** por ser un gran amigo incondicional.

¡A todos ustedes gracias!

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Respuesta Inmune a helmintos.....	12
1.2 Activación de macrófagos.....	13
1.3 Inmunomodulación por <i>Taenia crassiceps</i>	17
1.4 Respuesta inmune normal del intestino.....	20
1.5 Enfermedades Inflamatorias Intestinales (IBD).....	22
1.6 Colitis Ulcerativa (CU).....	23
1.7 Hipótesis de la higiene.....	25
2. HIPÓTESIS.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares.....	27
Estrategia experimental.....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5. RESULTADOS	32
5.1 Pérdida de peso (%).....	32
5.2 Índice de la actividad de la enfermedad (IAE).....	33
5.3 Longitud de colon.....	34
5.4 Niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias circulantes.....	35
5.5 Análisis histológico.....	36
5.6 Presencia o ausencia de AAMΦ's y CAMΦ's por RT-PCR.....	39
5.7 Depósito de colágena	40
6. DISCUSIÓN.....	41
7. CONCLUSIONES.....	49
8. REFERENCIAS.....	50
9. ANEXOS.....	55

ABREVIATURAS

AAMΦ's	Alternatively Activated Macrophages (macrófagos activados alternativamente)
Ag	Antígeno
APC	Antigen Presenting Cell (célula presentadora de antígeno)
Arg1	Arginasa-1
CAMΦ's	Classically Activated Macrophages (macrófagos clásicamente activados)
CU	Colitis ulcerativa
DC's	Dendritic Cells (células dendríticas)
DSS	Dextran Sodium Sulfate (dextran sulfato de sodio)
IBD	Inflammatory Bowel Diseases (enfermedades inflamatorias intestinales)
i.p.	intraperitoneal
IAE	Índice de la Actividad de la Enfermedad
IEC's	Intestinal Epithelial Cells (células epiteliales intestinales)
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
IFN-γ	Interferón gama
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase (sintasa de óxido nítrico inducible)
LP	Lámina propia
L3	Larva 3
MΦ's	Macrophages (macrófagos)
MHC	Major Histocompatibility Complex (complejo mayor de histocompatibilidad)

MMR	Macrophage Mannose Receptor (Receptor de manosa de macrófagos)
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxide (óxido nítrico)
PBS	Phosphate Buffered Saline (amortiguador de fosfatos)
PD-1	Programmed death receptor-1 (receptor de muerte programada)
PD-L	Programmed death ligand (ligando del receptor PD-1)
PEC's	Peritoneal exudate cells (Células totales de exudado peritoneal)
p.i.	post-infección
ROS	Reactive oxygen species (Especies reactivas de oxígeno)
RI	Respuesta Inmune
Relm- α	Resistin-like molecule alfa (molécula similar a resistina)
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction (transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa)
SM	Submucosa
Th1	T helper 1 (Células T cooperadoras tipo 1)
Th2	T helper 2 (Células T cooperadoras tipo 2)
TLR	Toll like receptor (receptores tipo Toll)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha (factor de necrosis tumoral alfa)

RESUMEN

Los patógenos helmintos han desarrollado diversas estrategias de evasión del sistema inmune, también conocidas como inmunomodulación e inmunoregulación. La infección crónica con *Taenia crassiceps* es caracterizada por una respuesta inmune de tipo Th2 que induce poblaciones celulares como los macrófagos alternativamente activados (AAMΦ's), esta población celular es caracterizada por su gran potencial supresor. Desde hace algunas décadas se ha observado un aumento en la incidencia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, tales como las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD). La Colitis Ulcerativa (CU) es una de las entidades clínicas de las IBD, caracterizada por una inflamación exacerbada del colon. En este trabajo intentamos determinar el efecto inmunomodulador de *T. crassiceps* en el desarrollo de la colitis inducida con DSS. Para alcanzar este objetivo ocupamos ratones hembras de la cepa BALB/c que fueron previamente infectadas con metacestodos de *T. crassiceps*, posteriormente se les indujo la colitis mediante la administración oral de DSS. Nuestros resultados muestran que la infección previa con *T. crassiceps* reduce los signos característicos de la colitis como pérdida de peso, sangrado rectal, mejor consistencia de las heces y una nula presencia de sangre en estas, así como una menor reducción del tamaño del colon. A nivel histológico observamos un menor infiltrado inflamatorio que se reflejó en el mantenimiento de la estructura del colon. Los niveles de la citocina proinflamatoria TNF- α en el grupo previamente infectado con *T. crassiceps* más la colitis, revelaron una disminución significativa con respecto al grupo que únicamente había desarrollado la colitis. Por otro lado, los niveles de citocinas de tipo Th2 (IL-4 e IL-10) fueron mayores en éste grupo comparadas con los animales sanos y con colitis. La expresión de marcadores como Arg1, Ym1 y FIZZ asociados a los AAMΦ's en el colon del grupo infección+DSS, indica la presencia de estos macrófagos en el tejido de colon y los resultados obtenidos mediante la tinción de colágena no muestran diferencias entre los grupos con la infección y control. Finalmente, concluimos que la infección crónica con *T. crassiceps* puede modular el desarrollo de la colitis ulcerativa, mediante la supresión de la respuesta inflamatoria (Th1), donde los AAMΦ's podrían tener un papel principal en modular el desarrollo de la inflamación.

1. INTRODUCCIÓN

Los helmintos son organismos metazoarios que comprenden a diversos representantes parásitos. Estos son capaces de infectar a humanos, principalmente se encuentran agrupados en dos filos: el filo Nematoda que incluyen a los ascárides y el filo de los Platelminfos donde se encuentran los trematodos y cestodos.

Los parásitos helmintos son un grupo de organismos altamente diversos que muestran una gran variedad de morfología, estructuras accesorias, comportamientos sexuales y diversos hábitos de alimentación, así como de múltiples etapas en su ciclo de vida. Del mismo modo, también generan una variedad de enfermedades y se localizan en una amplia gama de nichos dentro de su huésped, que van desde pasar toda su vida en un órgano o tejido específico tal como el tracto gastrointestinal, a viajar en diferentes órganos y sistemas en el huésped (piel, vejiga, músculo, hígado, pulmones y el sistema nervioso central) para finalmente establecerse en un órgano específico donde pueden causar enfermedad.

Estos parásitos siguen caminos muy variados y rutas complicadas de infección en los tejidos del huésped. Las infecciones principalmente se originan después de la ingestión de huevos/larvas (vía oral) o a través de la penetración activa de la piel, por sus estadios larvales, así como por la picadura de sus vectores (vía cutánea) (Reyes *et al.*, 2007).

Alrededor del mundo millones de personas son infectadas por estos organismos, causando principalmente efectos indirectos en la salud, contribuyen a la malnutrición y por lo tanto a la disminución en el crecimiento de los niños y el deterioro de las funciones cognitivas. Generalmente, una pequeña población de individuos infectados sufren de síntomas severos, pero la mayoría de las personas permanecen asintomáticas (Allen *et al.*, 2011).

Los parásitos helmintos han desarrollado complejas estrategias de evasión, cuando la respuesta inmune inmediata falla, es necesario para el huésped entrar a un estado de limitación del daño con la finalidad de minimizar la patología. Así el parásito helminto puede permanecer en su huésped durante mayor tiempo sin ser eliminado. A las estrategias para evadir o suprimir el sistema inmune utilizadas por los helmintos y

otros patógenos, actualmente se le conoce como fenómenos de inmunomodulación e inmunosupresión, respectivamente (Allen *et al.*, 2011; Maizels *et al.*, 2007)

1.1 Respuesta inmune a helmintos

El sistema inmune, a través de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, es el encargado de proteger al huésped frente a agresiones de cualquier tipo que puedan afectar la integridad de células y tejido. La respuesta de defensa más eficaz es la que lleva a cabo la inmunidad adaptativa, que permite la identificación y eliminación de los patógenos por medio de la actividad coordinada de cientos de células con funcionalidades distintas (Regueiro *et al.*, 2003).

Las principales células encargadas de la respuesta adaptativa son los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos T, son células capaces de reconocer pequeños fragmentos del antígeno proveniente del patógeno asociados a las moléculas de histocompatibilidad (MHC). Según la naturaleza del antígeno reconocido, se pueden activar diferentes subpoblaciones de linfocitos T, uno de estos son los llamados linfocitos T cooperadores (Th por T helper) que coordinan la respuesta celular por medio de la producción de citocinas y así como la expresión de CD4 en su membrana. Este grupo de células cooperadoras T CD4⁺ es dividido en células Th1, necesarias para la eliminación de microorganismos intracelulares, caracterizadas por la secreción de Interferón gama (IFN- γ) que favorece una respuesta inflamatoria (Regueiro *et al.*, 2003).

Estudios recientes, han descrito a los linfocitos Th17 que se caracterizan por secretar IL-17 entre otras citocinas. Las células Th17 juegan un papel importante en la eliminación de bacterias de crecimiento extracelular y hongos durante reacciones de defensa del huésped, así como en la inducción de la inflamación de los tejidos, promovida fundamentalmente por el efecto proinflamatorio de la IL-17, en las enfermedades autoinmunes (Korn *et al.*, 2009)

Por otro lado, los linfocitos T reguladores (T regs) tienen como función, suprimir la respuesta inmune y mantener la tolerancia a lo propio, actualmente se han descrito diferentes subtipos de células T regs. Las células T CD4⁺CD25⁺ conocidas como Tregs naturales, son importantes controladores de la tolerancia inmunológica, otro subtipo

de T regs está encargada de secretar IL-10, así como las Tregs Th3, caracterizadas por ser una población celular capaz de producir TGF- β como principal molécula efectora (Jaramillo *et al.*, 2006).

Finalmente, las células Th2 son activadas en presencia de infecciones por parásitos helmintos. A pesar de la amplia diversidad de las características de los helmintos, la mayoría de estos parásitos, evocan una respuesta inmune adaptativa similar en su huésped. Los helmintos son conocidos por sesgar la respuesta inmune hacia un perfil Th2, caracterizada por la alta secreción de citocinas como: IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 que inducen a los linfocitos B a la producción de anticuerpos de diferentes subclases como IgG1, IgG4 e IgE, quimiocinas como CCL11, receptores como CCR3, así como un aumento en el número de poblaciones celulares particulares tales como eosinófilos, basófilos, células caliciformes, mastocitos y macrófagos activados hacia un perfil alternativo (Allen *et al.*, 2011).

1.2 Activación de Macrófagos

Los macrófagos ($M\Phi$'s) fueron inicialmente identificados por Elie Metchnikoff como células fagocíticas responsables de la eliminación de patógenos con funciones de limpieza en una amplia gama de organismos desde invertebrados hasta vertebrados (Mackness 1964). Este sistema fagocítico mononuclear es generado a partir de células madre hematopoyéticas localizadas en la médula ósea y en el hígado en estadio fetal (Duque *et al.*, 2007). Los precursores de los macrófagos son liberados en la circulación como monocitos y están estratégicamente distribuidos en todos los tejidos del cuerpo (Murray *et al.*, 2011).

Los macrófagos tienen múltiples funciones, sirven como detectores tempranos de organismos invasores a través de una serie de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que reconocen receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's), tales como receptores tipo Toll (TLR's), receptores tipo lectinas y NODs, expresados en su superficie y en compartimentos vacuolares y citosólicos.

Son consideradas células presentadoras de antígeno, además poseen funciones tróficas así como de homeostasis en la eliminación de células apoptóticas, sirven como

centinelas de lesiones e infecciones, contribuyen a la cicatrización y en la defensa del huésped en la inmunidad innata y adaptativa. Los macrófagos también son considerados células efectoras, es decir, tienen la capacidad de eliminar patógenos fagocitados a través de la activación de mecanismos microbicidas tales como la producción de moléculas tóxicas (Gordon *et al.*, 2010).

Para que los macrófagos lleven a cabo todas estas funciones requieren de un proceso de activación. Dicho proceso implica que diferentes moléculas como PAMP's y citocinas actúen sobre los macrófagos a través de sus respectivos receptores, iniciando así una cascada de señalización, mediada principalmente por cinasas que tiene como objetivo final la translocación de factores de transcripción y el inicio de la expresión de diversos genes induciendo así la activación de los macrófagos (Gordon *et al.*, 2010).

Los M Φ son una población heterogénea, son células altamente plásticas capaces de responder a una variedad de señales ambientales modificando su fenotipo y fisiología. En los últimos años se han descrito varias subpoblaciones de macrófagos con distintas funciones, entre ellos se encuentran los macrófagos activados clásicamente (CAM Φ) que median la defensa del huésped de una variedad de bacterias, protozoos, virus y poseen un papel en la inmunidad antitumoral (Murray *et al.*, 2011).

Estímulos comunes como lipopolisacáridos (LPS) de origen bacteriano e IFN- γ producido por células T CD4+ (Th1), células T citotóxicas CD8+ (Tc1) y células natural killer (NK), convierten a los M Φ 's en potentes células con aumento en la síntesis de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-12) y mediadores tóxicos, además de la fagocitosis mediada por el complemento, elevada expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras (CD86) que aumentan la presentación antigénica asociada con células Th1 (Duque *et al.*, 2007). Así estos CAM Φ adquieren la capacidad de eliminar patógenos intracelulares, debido a que secretan mediadores tóxicos, como óxido nítrico (ON) y especies reactivas de oxígeno (ROS), esta producción es mediada por enzimas como iNOS y NADPH oxidasa, a través del fenómeno conocido como estallido respiratorio (Gordon *et al.*, 2010)

En 1982, la contraparte inmunológica de IFN- γ fue identificada. Las citocinas IL-4 e IL-13, a diferencia de IFN- γ median una respuesta inmune típicamente caracterizada

por eosinófilos, basófilos, mastocitos, mejoramiento en la producción de anticuerpos IgE e IgG1 por las células B, y su consecuente acumulación en el plasma. La respuesta Th2 es esencial para el control de parásitos extracelulares, incluyendo helmintos, protozoos y hongos, pero también contribuyen a la alergia, aumentando la susceptibilidad hacia otros patógenos y complicaciones asociadas a la infección tal como la fibrosis.

Observaciones iniciales sobre el papel de IL-4 en la activación de macrófagos mostró que esta citocina era capaz de inhibir el estallido respiratorio y la producción de IL-1 β e IL-18. También se demostró que la IL-4 inducía la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII). Con los hallazgos en 1992 de la regulación positiva del receptor de manosa (MR) como un marcador distintivo de M Φ activados por IL-4 junto con la inducción de moléculas de MHCII, el concepto de activación alternativa de macrófagos fue propuesto (AAM Φ) (Martínez *et al.*, 2009).

La activación de AAM Φ es promovida por IL-4 e IL-13, las cuales inducen fenotipos ampliamente sobrelapados probablemente porque poseen una estructura tridimensional similar y sus receptores muestran una cadena alfa en común. Ambas citocinas señalizan a través de componentes comunes, la unión de IL-4 e IL-13 causa la activación de JAK1 y Tyk2, la fosforilación de tirosinas citoplasmáticas en la cadena IL-4R α , el reclutamiento de STAT-6, su fosforilación, dimerización, translocación al núcleo y activación transcripcional. STAT-6 actúa además secuestrando moléculas coactivadoras de STAT-1 y NF- κ B, suprimiendo la activación de genes inducidos por LPS e IFN- γ (Hebenstreit *et al.*, 2006).

Se han identificado marcadores específicos para AAM Φ , los más relevantes son: Arg-1 que regula la síntesis del aminoácido prolina, el cual se requiere para la producción de colágena. Diferentes estudios sugieren que la Arg-1 está críticamente implicada en la regulación de la cicatrización de heridas y en fibrosis, también se cree que posee acciones antiinflamatorias mediante la producción de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) que inhiben la expresión de iNOS y la síntesis de citocinas proinflamatorias (Pesce *et al.*, 2009). FIZZ1 miembro de la familia de las moléculas tipo resistina, está relacionado con el metabolismo lipídico y la fibrogénesis.

Al igual que Ym-1, está regulado positivamente en macrófagos murinos durante infecciones con: *Brugia malayi*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *Taenia crassiceps*. Así como el receptor de manosa (MMR), una glicoproteína transmembranal que posee ocho dominios de reconocimiento de carbohidratos tipo lectina-C y un dominio rico en cisteína, se ha reportado su elevada expresión en macrófagos provenientes de una infección crónica por *Taenia crassiceps* y otros helmintos (Duque *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2007). Así, la inducción de AAMΦ's durante las infecciones por helmintos se ha convertido en otra característica de este tipo de infecciones, sin embargo, el papel de estas células varía en las diferentes infecciones por helmintos (Fig 1).

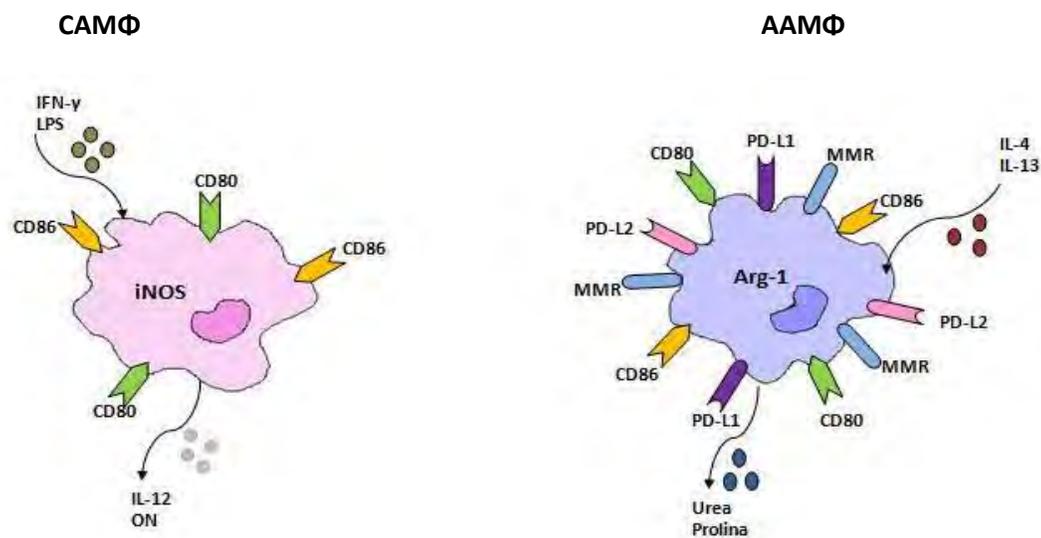


Figura 1. Activación clásica y alternativa de macrófagos. iNOS; Óxido Nítrico Sintasa Inducible, ON; óxido nítrico, Arg-1; Arginasa 1, MMR; Receptor de Manosa.

1.3 Inmunomodulación por *Taenia crassiceps*

Taenia crassiceps es un platelminto que pertenece a la clase Cestoda, en su estadio adulto se encuentra normalmente en el intestino de cánidos salvajes, tiene un cuerpo largo y plano hecho por varios segmentos llamados proglótidos. Cada proglótido es una unidad reproductiva que contiene los testículos y los ovarios capaces de producir gametos. Los órganos masculinos maduran primero y producen espermatozoides que se almacena hasta que la maduración de los ovarios se produce. Después de la fecundación, los proglótidos grávidos se separan del céstodo en el intestino del

huésped y son expulsados en las heces de los cánidos, las cuales son ingeridas por roedores (huésped intermediario natural) para que este parásito se reproduzca por gemación en la cavidad peritoneal (cisticerco) (Maillard *et al.*, 1998).

Cuando este roedor con cisticercos es devorado por algún cánido no infectado, el cisticerco o larva evagina en el intestino, se ancla y se desarrolla una nueva *Taenia* adulta cerrando así el ciclo de vida de este parásito. Aunque la cisticercosis causada por *T. crassiceps* usualmente afecta roedores, con cánidos como huésped final, se ha reportado que humanos inmunocomprometidos pueden ser infectados con este parásito (Maillard *et al.*, 1998) (Fig. 2).

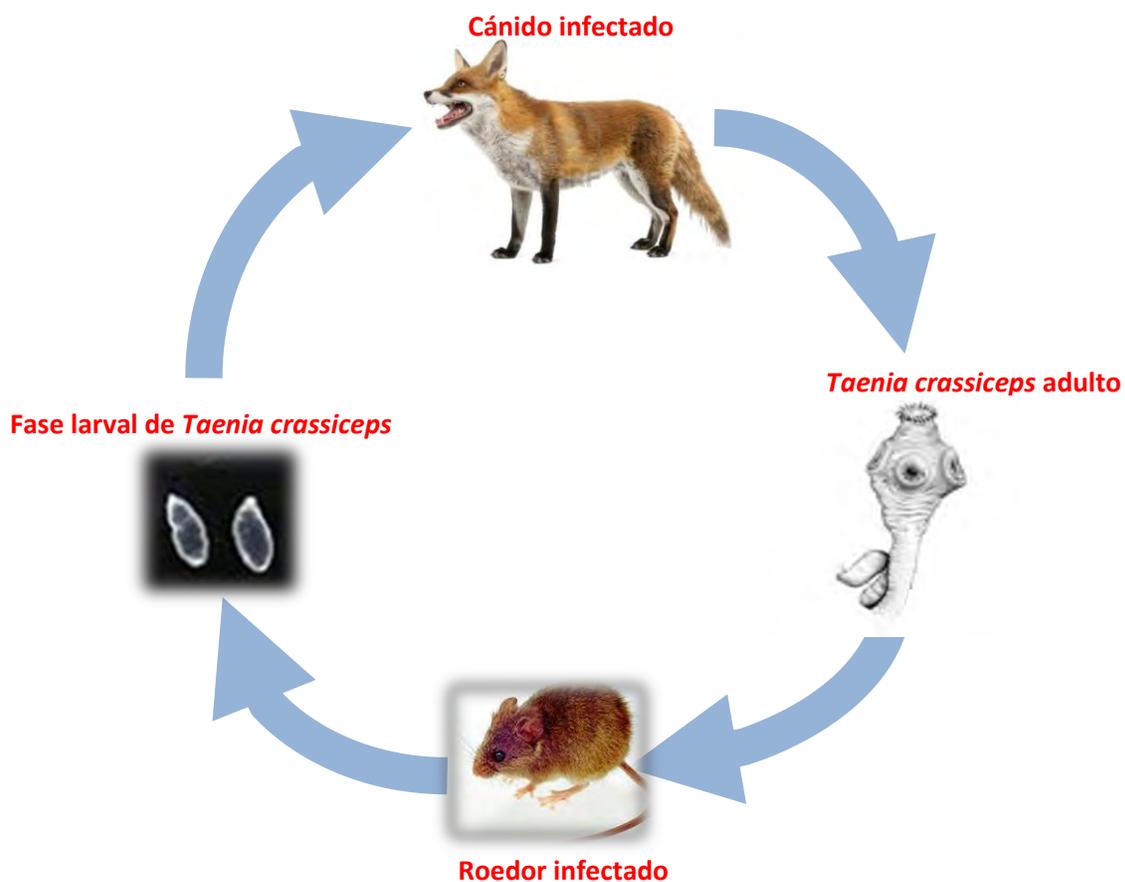


Figura. 2. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

Taenia crassiceps también se multiplica asexualmente a través de gemaciones en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c que son huéspedes excelentes para este céstodo y por lo tanto un modelo útil para el estudio de la biología de la cisticercosis y su interacción huésped-parásito. Además, la similitud antigénica entre metacéstodos de *Taenia solium* y *T. crassiceps* ha sido ya establecida. Los sueros de pacientes humanos que padecen de neurocisticercosis reconocen positivamente los antígenos de *T. crassiceps*. (Terrazas *et al.*, 1998). Así, este modelo es útil para el inmunodiagnóstico en humanos infectados por *T. solium*. Varias cepas de *T. crassiceps* se han aislado y mantenido bajo condiciones de laboratorio. La cepa ORF se ha convertido en la más ampliamente utilizada debido a su capacidad de multiplicarse rápidamente en la cavidad peritoneal del ratón experimental (Romano *et al.*, 2003).

Una serie de estudios muestran que ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps* desarrollan una inicial pero breve respuesta tipo Th1 (IFN- γ), sustituida por un fuerte sesgo de respuesta Th2 (IL-4 e IL-13), que a su vez está asociada con un aumento en la carga parasitaria (Toenjes *et al.*, 1999). Se ha reportado que la infección con *T. crassiceps* hace que su huésped sea más resistente o más susceptible a una infección secundaria no relacionada en función del transcurso del tiempo de inoculación con este parásito. Reportes muestran que un aumento de la susceptibilidad a *Trypanosoma cruzi* fue observada en ratones previamente infectados con *T. crassiceps* (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1999).

A lo largo de esta respuesta inmune dinámica, los macrófagos reclutados en la cavidad peritoneal sufren cambios mientras progresa la infección. Los macrófagos de la infección aguda (CAM Φ) producen altos niveles de IL-12 y ON, poca IL-6 y prostaglandina E2 (PGE2) además poseen la habilidad de inducir mayor proliferación de células T CD4+. En contraste, macrófagos provenientes de una infección crónica (AAM Φ) producen un patrón diferente de citocinas y quimiocinas, y presentan un aumento en la expresión de MHCII, CD40, CD86, CD23 y CCR5 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002). Otro conjunto de marcadores se han encontrado recientemente elevados en macrófagos provenientes de ratones infectados con *T. crassiceps*, tales como la alta expresión de MMR, mMGL1 y mMGL2, Arg1, Fizz1, Ym1 y TREM-2, confirmando que

estos macrófagos son activados alternativamente (Geert *et al.*, 2005). Esta población produce bajos niveles de IL-12 tanto en respuesta a LPS y en co-cultivos con células T CD4 más antígeno (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002). Otra observación sorprendente ha sido la capacidad de los AAMΦ aislados de ratones infectados con *T. crassiceps*, de inhibir la respuesta proliferativa de las células T CD4+ (Terrazas *et al.*, 2005).

Aparentemente, este efecto consiste en una vía dependiente del contacto celular. Evidencia que apoya esta implicación en la dependencia del contacto celular fue asociada con el aumento en la expresión de PD-L1 y PD-L2 en AAMΦ. La participación de la vía PD-1 se puso a prueba mediante el bloqueo de PD-L1 y PD-L2 o PD-1 agregando anticuerpos bloqueadores específicos a co-cultivos de células T CD4+ con AAMΦ obtenidos de ratones infectados con *T. crassiceps*. El bloqueo de la vía PD-1 redujo significativamente la actividad supresora de AAMΦ y por lo tanto las células T proliferaron normalmente. Estos datos indican que las molécula PD-L1 y PD-L2 están directamente implicadas en la actividad supresora de las células en contacto con AAMΦ de ratones infectados con *T. crassiceps* (Reyes *et al.*, 2007).

Dado el cambio observado en el microambiente durante infecciones por helmintos, se ha identificado la importancia de un posible efecto protector de infecciones por helmintos frente a enfermedades autoinmunes inflamatorias, tal es el caso de la infección con *T. crassiceps*. Reportes recientes muestran que la inmunomodulación generada por la infección crónica con *T. crassiceps* modifica la incidencia y el desarrollo de diabetes autoinmune inducida con MLDS (Múltiples Dosis Bajas de Streptozotocina), mostrando reducidos niveles de glucosa en sangre, con un aumento en el número de AAMΦ's, altos niveles de IL-4 y menores niveles de TNF-α así como un daño mínimo a las células del islote pancreático (Espinoza-Jimenez *et al.*, 2010). Datos similares fueron observados en la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), donde se observa que la regulación inmune inducida por *T. crassiceps* disminuye la severidad de la EAE mediante la reducción de la activación de las células T, su proliferación y migración al SNC (Reyes *et al.*, 2011).

1.4 Respuesta inmune normal del intestino

El tracto gastrointestinal inferior de los mamíferos es habitado por una microflora bacteriana muy densa y diversa que existe en un estado de mutualismo con el huésped. Se requiere un constante diálogo molecular entre la microbiota y el huésped para el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis intestinal. Una respuesta inmune no controlada a la microbiota comensal y acompañada de inflamación intestinal ocurre directamente como la pérdida de equilibrio entre mecanismos proinflamatorios y antiinflamatorios en el tracto gastrointestinal.

Aunque la mucosa intestinal está habitada por un número de poblaciones de linfocitos especializados que median diversas respuestas inmunológicas contra los organismos intestinales patógenos y comensales, estas respuestas adaptativas son provocadas por señales microbianas o factores ambientales por las células inmunológicas innatas (Maloy *et al.*, 2011). El compartimiento inmune innato abarca muchas poblaciones de leucocitos innatos, así como varios tipos de células epiteliales intestinales (IEC) que actúan juntas para mantener una respuesta inmune equilibrada a la microbiota (Harrison *et al.*, 2011).

Se sabe que la respuesta inmune de la mucosa es distinta, centrada principalmente en la supresión de la inmunidad en lugar de promoverla. El sistema inmunológico de la mucosa utiliza una serie de mecanismos para proteger al huésped contra una respuesta inmune agresiva a los componentes del lumen del intestino (Mayer *et al.*, 2005).

Estos mecanismos de protección incluyen una fuerte barrera física, el epitelio intestinal consiste en una sola capa de células epiteliales columnares que proveen esta barrera efectiva que separa la vasta carga bacteriana de la flora intestinal de células del sistema inmune del huésped. Las continuas criptas y vellosidades que forman el epitelio intestinal poseen varios mecanismos físicos, bioquímicos e inmunológicos que garantizan la homeostasis del intestino. Las células epiteliales intestinales poseen en su superficie microvellosidades ricas en actina, en combinación con la mucina secretada por las células caliciformes, forman una barrera estéril que es impermeable a la carga bacteriana intestinal. La capa de moco del intestino consiste en una capa interna de

glicocalix de mucina anclada a la membrana, cubierta por una capa exterior de mucinas secretadas, que además de ser una barrera viscosa para los microbios, forma una matriz cargada con altas concentraciones de IgA y péptidos antimicrobianos derivados de las células epiteliales intestinales (Harrison *et al.*, 2011). Se ha reportado que deficiencias en mucina 2, (la mucina gastrointestinal más abundante) o mutaciones en este gen, conduce al desarrollo de colitis crónica espontánea y cáncer colorectal (Saleh *et al.*, 2011).

Las EIC expresan IL-4R α y actúan como células centinelas, promueven la diferenciación de las células caliciformes y el mejoramiento de la secreción de moco así como la producción de RELM β que es una proteína innata con actividad anti-helmíntica directa. Estas células funcionan como células no profesionales presentadoras de antígeno por muestreo parcial de antígenos procesados desde el lumen y presentan estos a las células T en la lámina propia (Allen *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2003)

Las EIC están en permanente contacto con el contenido del lumen intestinal, llevan a cabo inmunovigilancia de poblaciones comensales y patógenas dentro de la microbiota intestinal. Los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR) clásicamente conducen a la respuesta proinflamatoria dependiente de NF-kB y el comienzo de la respuesta inmune innata y adaptativa al patógeno. La señalización de PRR dentro de las células epiteliales intestinales es crítica para un amplio espectro de protección al huésped en respuesta a especies patógenas en el intestino, incluyendo una mayor producción de citocinas, quimiocinas y la inducción de la producción de IgA secretora por parte de las células B.

Para discriminar entre bacterias comensales y patógenos invasores, las EIC expresan TLR's, así como la regulación diferencial de las redes de transcripción en respuesta a ligandos de TLR. Ahora es sabido que bajo condiciones normales, la detección de la microbiota y señalización basal de PRR en células epiteliales intestinales es importante para la homeostasis intestinal y la renovación constante de la barrera epitelial (Cario, 2010).

La mucosa del tracto gastrointestinal también contiene un gran reservorio de macrófagos. Están estratégicamente posicionados en la lámina propia, estos regulan la

respuesta inflamatoria a bacterias y antígenos que infringen el epitelio. Es sabido que macrófagos murinos generalmente son capaces de polarizarse a cierto perfil basado en Th1/Th2 y su relación de citocinas, elaboración de quimiocinas y producción de enzimas. Tal polarización no se ha reportado, ni tampoco una heterogeneidad de estos macrófagos aislados del intestino humano en condiciones normales (Smith *et al.*, 2005).

1.5 Enfermedades inflamatorias intestinales (IBD)

El equilibrio entre el huésped y la flora bacteriana se mantiene a través de la cooperación de diversos mecanismos de regulación que impiden que el sistema inmune reaccione a antígenos exógenos inofensivos presentes en el intestino. Este equilibrio puede ser interrumpido por varias razones.

- a) En el caso de la regulación alterada, la reacción normal del sistema inmune a los estímulos intestinales puede resultar en inflamación crónica.
- b) La alteración de la barrera intestinal expone al sistema inmune a una gran cantidad de estímulos proinflamatorios, que pueden superar la regulación intestinal.
- c) El mejoramiento de la reacción inmune también puede conducir a inflamación exacerbada, incluso si los niveles de estímulos reguladores y proinflamatorios permanecen basales.
- d) La reducción en la reacción del sistema inmune paradójicamente puede promover la inflamación intestinal. Una reducción en la respuesta inmune podría fallar para controlar a los patógenos oportunistas, de modo que los estímulos proinflamatorios microbianos podrían acumularse y modificar el equilibrio, causando inflamación crónica a pesar de la reducción de la reactividad inmune basal.

Comúnmente la inflamación se produce por el aumento de estímulos proinflamatorios en contacto con el sistema inmune como por ejemplo, infecciones por patógenos. En humanos la causa más frecuente de inflamación intestinal no infecciosa crónica son las enfermedades celiacas y las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) (Izcue *et al.*, 2009).

1.6 Colitis ulcerativa (CU)

Las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) son debidas a una respuesta exagerada frente a la flora bacteriana de la mucosa intestinal, en la que intervienen factores ambientales y genéticos. Las IBD se subdividen en dos entidades clínicas; enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerativa (CU), son condiciones crónicas recurrentes, caracterizadas por la inflamación progresiva del intestino. La primera es una enfermedad transmural de carácter granulomatoso, que tiene predilección por el íleon terminal y el colon, aunque puede afectar cualquier parte del tubo digestivo. La CU es caracterizada por la continua inflamación de la lámina propia del intestino, comenzando desde el recto e implicando potencialmente la totalidad de la mucosa del colon (Roda *et al.*, 2010).

Sus síntomas incluyen dolor, diarrea y sangrado rectal, la enfermedad es acompañada por un aumento del riesgo a largo plazo de padecer cáncer de colon (Itzkowitz *et al.*, 2004). Histológicamente, la CU es caracterizada por la disrupción de la arquitectura de las criptas del colon, infiltración de células inflamatorias, edema, pérdida de células caliciformes y ulceración (Blumberg *et al.*, 1999)

La colitis ulcerativa es una enfermedad heterogénea establecida, con fenotipos clínicos similares. Los niveles clínicos, subclínicos y genéticos tienen componentes heterogéneos y estos contribuyen a la respuesta inflamatoria característica. Por ejemplo, un mejoramiento de la actividad de los TLR de las células epiteliales del colon posiblemente controlado por factores genéticos, puede generar una falla en la toma de muestra del antígeno bacteriano por las células epiteliales del colon. Una respuesta excesiva a los antígenos estimula la actividad de las células dendríticas para generar células T tipo Th1 o NK, que posteriormente generan citocinas iniciando una cascada de eventos inmunológicos promoviendo el daño en el tejido. La participación de los factores que se manifiestan como inflamación en colitis ulcerativa son parte de un proceso dinámico en el que anticuerpos son generados hacia antígenos de la mucosa en un huésped susceptible (Targan *et al.*, 2005)

Su etiología ha sido extensamente estudiada en décadas pasadas, sin embargo, la patogénesis de la enfermedad no ha sido completamente esclarecida. Considerables

variaciones en su epidemiología han sido observadas alrededor del mundo (Molodecky *et al.*, 2012), pero existe evidencia que sugiere que el proceso de la colitis ulcerativa es inmunológicamente mediado y que la expresión de la enfermedad es dependiente de factores ambientales y genéticos (Targan *et al.*, 2005).

Algunos genes asociados a pacientes que padecen colitis ulcerativa han sido identificados. Se ha demostrado que la región del cromosoma 6 del complejo mayor de histocompatibilidad II (también conocido como IBD3), HLA*DR2 y un haploide de DR3*DQ2 así como HLA-DR5 e IBD2 localizado en el cromosoma 12 están asociados a colitis ulcerativa. Genes de HLA clase I y II se han relacionado con fenotipos de IBD. El alelo DRB1* 0103, presente en un 6-10% de pacientes con colitis ulcerativa es asociado con la extensión y severidad de la enfermedad, requerimiento de colectomía y con manifestaciones extraintestinales, eritema nodoso y artritis (Targan y Karp., 2005)

Hace algunas décadas se desarrollaron modelos de IBD en animales. En modelos murinos, la inflamación intestinal inducida químicamente es el modelo más comúnmente usado, esto es debido a que la inducción es simple, el comienzo, la duración y la severidad de la inflamación son inmediatos y controlables. El dextran sulfato de sodio (DSS) es un polisacárido sulfatado sintetizado, compuesto de dextran y unidades de anhidroglucosa sulfatada.

El DSS es tóxico para las células epiteliales del colon y causa defectos en la integridad de la barrera epitelial, por lo cual aumenta la permeabilidad de la mucosa del colon para permitir la penetración de moléculas pesadas como el DSS. Al haber una degeneración del epitelio intestinal, ésta barrera física e inmunológica desaparece, facilitando el contacto directo de las células del sistema inmune del intestino con la microbiota del lumen. Esto conduce a una infiltración masiva de células inflamatorias a la lámina propia y submucosa del colon, aumento en la síntesis de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , así como quimiocinas, aumento en la actividad de iNOS y la síntesis de ON.

Numerosos mediadores inflamatorios y signos característicos de la colitis inducida por DSS se asemejan a la CU de humanos y aunque este modelo no representa la complejidad de esta afección en humanos, éste es una indispensable y valiosa

herramienta que provee un amplio ámbito de opciones para investigar varios factores implicados en la patogénesis de la CU (Perse *et al.*, 2012).

1.7 Hipótesis de la higiene

En la búsqueda de disparadores ambientales que pudiesen favorecer el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, la hipótesis de la higiene sugiere que la reducción a la exposición a agentes infecciosos (aumento en la higiene, agua para beber estéril y el uso de antibióticos) puede resultar en la generación de un mayor número de células inmunológicas autoreactivas en humanos, y por lo tanto la aparición de enfermedades autoinmunes e idiopáticas (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002). Por otro lado, muchos datos experimentales así como epidemiológicos en humanos sugieren que las infecciones por helmintos pueden regular alergias y trastornos inflamatorios autoinmunes (Melon *et al.*, 2010).

Compatible con este postulado es la divergencia geográfica en la incidencia de enfermedades inflamatorias intestinales en áreas donde existe mayor frecuencia en el padecimiento de infecciones por helmintos. Representantes de todas las clases de parásitos helmintos han mostrado cierta capacidad para modular la respuesta inmune en sus huéspedes. Como se ha mencionado anteriormente, la infección por parásitos helmintos evoca una respuesta inmune tipo Th₂, esto conlleva a la liberación de moléculas inmunomoduladoras e inmunosupresoras por lo que la estimulación de este perfil Th₂ tiene el potencial para antagonizar o inhibir enfermedades en las que la inmunopatología es impulsada por respuestas tipo Th₁ (proinflamatorias) (Melon *et al.*, 2010).

2. HIPÓTESIS

La inmunomodulación inducida por la infección con *Taenia crassiceps* disminuirá los efectos de la colitis ulcerativa experimental, una enfermedad caracterizada por una respuesta inflamatoria exacerbada en el colon.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si el perfil inmunomodulatorio generado por la infección con *Taenia crassiceps* puede alterar el desarrollo de colitis experimental inducida por DSS

3.2 Objetivos particulares

- Evaluar el desarrollo de la colitis en presencia y ausencia de la infección con *T. crassiceps*
- Comparar el índice de la actividad de la enfermedad
- Determinar si existen diferencias en los niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias circulantes entre animales con colitis y animales infectados con *T. crassiceps* más colitis.
- Evaluar el daño histopatológico entre grupos
- Determinar la presencia de AAM Φ 's y CAM Φ en muestras histológicas de colon por RT-PCR durante la colitis, en presencia o ausencia de *T. crassiceps*

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

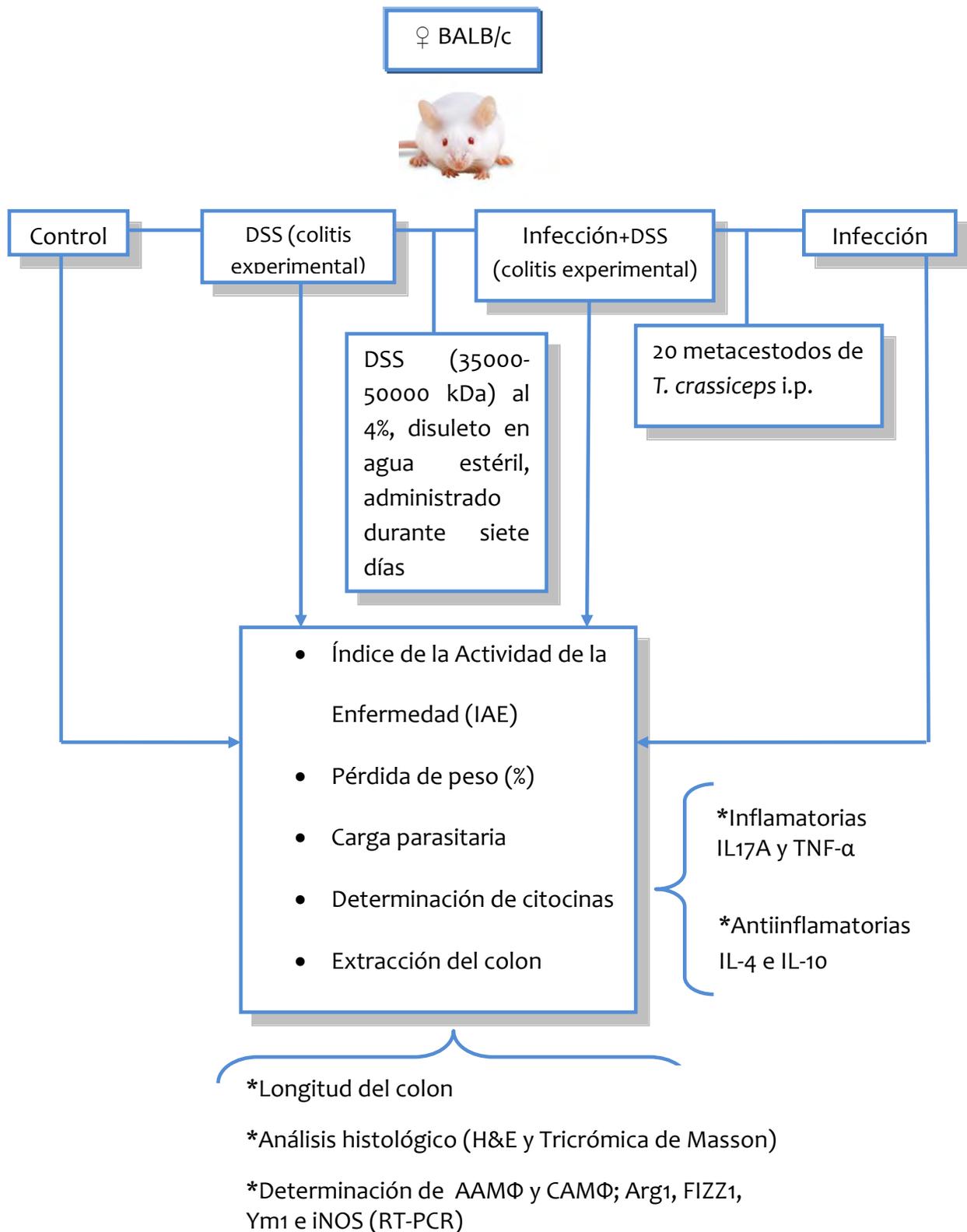


Figura 1. Esquema que muestra el diseño experimental llevado a cabo en esta investigación

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico de referencia

Durante el desarrollo de éste experimento se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Se separaron en cuatro grupos: control, administración con DSS, infectados con *T. crassiceps*/DSS e infectados con *T. crassiceps*.

Cisticercosis experimental

La cisticercosis experimental fue inducida en el grupo infectado/DSS e Infectado. La inoculación fue vía i.p. con 25 metacestodos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, obtenidos de ratones BALB/c previamente infectados con 6-8 semanas de infección, los cisticercos fueron lavados 4 a 5 veces con solución salina estéril (PISA) y seleccionados de un tamaño no mayor a 2 mm de diámetro y sin gemación.

Inducción de colitis experimental

Después de ocho semanas de infección se les indujo colitis a los grupos DSS e Infección/DSS mediante el Dextran Sulfato de Sodio (DSS) al 4% (PM.35000-50000 kD, MP Biomedicals) el cual fue disuelto en agua para beber estéril y administrado vía oral durante un periodo de siete días continuos.

Evaluación del modelo experimental de colitis

Se monitoreó diariamente el progreso de la colitis experimental, registrando la pérdida de peso por ratón de todos los grupos, finalmente se calculó un índice de la actividad de la enfermedad (IAE) utilizando los siguientes criterios; sangrado rectal 1, rastros de sangre en heces 1 y falta de consistencia en heces 1 (valor máximo del IAE, 3)

Determinación de citocinas en suero por medio de ELISA SANDWICH

Los ratones fueron sangrados al inicio y al final de la administración de DSS, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 minutos, el suero obtenido se congeló a -70°C hasta su posterior uso. Para cuantificar el nivel de citocinas en suero se empleó el método de ELISA sándwich, las citocinas de nuestro interés fueron TNF- α , IL-17A, IL-4 e IL-10.

Análisis histológico

Una vez transcurridos los siete días de inducción de la colitis experimental, los cuatro grupos de ratones fueron sacrificados y sus colon fueron extraídos, la longitud de los mismos fue registrada, inmediatamente éstos se lavaron con solución salina estéril (PISA) y se seccionó un trozo de aproximadamente 1 cm de la parte más distal del colon, intestino medio y ciego, el cual fue fijado en paraformaldehído y se mantuvo a 4° C por 24 hrs. Posterior a la fijación las muestras de tejido se incluyeron por medio de la técnica de procesamiento de inclusión en parafina. Una vez obtenidos los tejidos incluidos en parafina (Kendall) se cortaron en secciones de 5µm de grosor (el tejido se extendió con Ruyter).

Las laminillas se desparafinaron en una incubadora a 60°C durante 24 h para mejorar el pegado, posteriormente los tejidos ya desparafinados fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H&E). Las placas fueron montadas con Entellan (Baker) y posteriormente se observó en el microscopio óptico (Zeiss). Mediante esta técnica se determinó la estructura del colon (el infiltrado inflamatorio en la lamina propia (grosor), estructura de las criptas, vellosidades y microvellosidades), las fotos fueron tomadas con cámara AxioCam ICc3 (Zeiss). Se visualizaron por el programa Axio Vision Rel 4.6 (Zeiss).

Una vez desparafinadas las muestras se realizó una segunda tinción con Tricrómica de Masson (Sigma) que identifica la colágeno como un producto de reacción en color azul.

RT-PCR

Un trozo de colon de aproximadamente 1 cm fue seccionado y embebido en colagenasa, ya degradado el tejido se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y posteriormente fue agregado 1 ml de TRIsure por cada muestra, se congeló a -70°C hasta su posterior uso. Ya descongeladas las muestras se realizó la extracción de RNA con la técnica fenol-cloroformo. La cantidad total de RNA se cuantificó utilizando una dilución 1:1000 en un espectrofotómetro.

Posteriormente se obtuvo el cDNA utilizando el kit First Strand Synthesis (Invitrogen). El cDNA fue cuantificado en un espectrofotómetro utilizando una dilución

1:100. Una vez obtenido la cuantificación del cDNA, se realizaron los ensayos de PCR para la identificación de iNOS, FIZZ, Ym-1 y Arg-1 en un termociclador (Corbett Research) utilizando las siguientes concentraciones (los μl de primers utilizados variaron según el marcador de nuestro interés):

Mix

Buffer 10x	2.5 μl
dNTP mix 10mM	0.5 μl
Primer F 50pM	X μl
Primer R 50pM	X μl
Taq Polimerasa 5U/ μl	0.3 μl

A cada mezcla se le agregó los μl de muestra de cDNA según los datos obtenidos de su cuantificación, finalmente estas fueron llevadas a un volumen final de 23 μl con agua molecular.

Electroforesis

Se realizó una electroforesis para observar los productos en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X y Midori Green en una cámara molde. Posterior a su gelificación, se agregó 1 μl de amortiguador de carga juice (Invitrogen) por cada 5 μl de DNA, se colocaron 10 μl de la dilución a partir del segundo pozo, puesto que en el primer pozo se agregó 6 μl de marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). Se corrieron las muestras durante 30 min a 100 volts, posteriormente se observaron en un transiluminador con luz UV y se capturaron las imágenes utilizando el programa BioSens SC 645.

5. RESULTADOS

5.1 Pérdida de peso (%)

Durante los siete días de tratamiento con DSS para inducir la colitis, se registró el porcentaje de la pérdida o ganancia de peso de los cuatro grupos de animales (control, DSS, Infección+DSS e Infección). A partir del cuarto día de tratamiento con DSS, los animales del grupo sólo tratado con DSS empezaron a disminuir considerablemente su peso, perdiendo hasta un 20 %. Sin embargo, en los animales previamente infectados con *T. crassiceps* más la posterior administración de DSS, no se observó una pérdida significativa en el porcentaje de peso inicial y final a la inducción de la colitis con DSS. Se muestran resultados obtenidos de tres experimentos independientes, en el primer experimento un ratón del grupo DSS murió en el sexto día de la inducción de la colitis (Fig. 3).

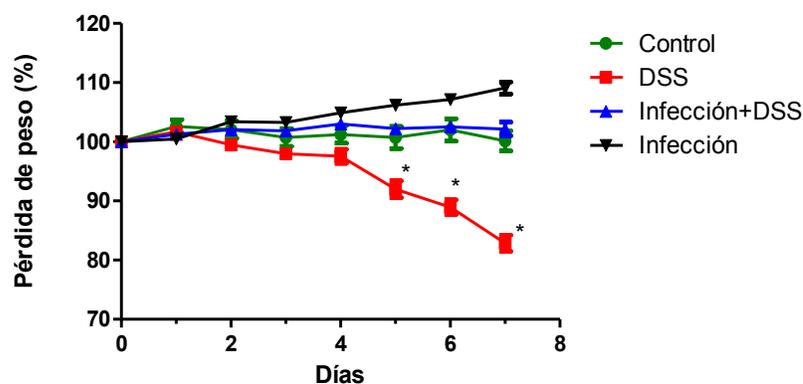


Figura 3. Pérdida de peso expresado en porcentaje de los ratones del grupo DSS, a partir de quinto día de la inducción de la colitis, respecto a los grupos control, DSS/infección e infección. N=4 por punto, análisis estadístico por ANOVA, seguido de la prueba Siegel-Tukey para determinar diferencias significativas entre grupos, * $p < 0.05$.

5.2 Índice de la actividad de la enfermedad (IAE)

Durante la inducción de la colitis se registraron diversos signos para determinar el IAE. A partir del quinto día, los ratones del grupo DSS experimentaron signos característicos de la enfermedad (CU), como diarrea, sangrado rectal o fecal. De manera interesante, el grupo Infección+DSS no mostró ni uno de estos signos durante los siete días de inducción de la colitis (Fig. 4).

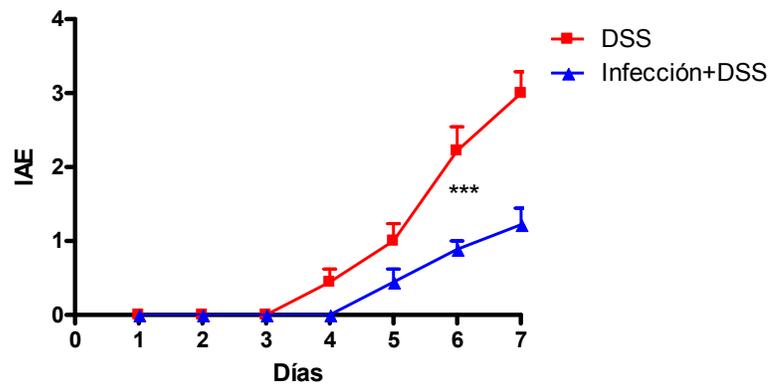


Figura 4. El Índice de la actividad de la enfermedad (IAE) fue menor en el grupo infección/DSS, respecto al grupo que había desarrollado la colitis mediante la administración únicamente de DSS, $p < 0.05$.

5.3 Longitud de colon

Una de las características más evidentes de éste modelo de colitis, es la pérdida de tamaño o reducción del colon, así al concluir los 7 días de la administración de DSS, todos los grupos fueron sacrificados y los colon fueron extraídos y medidos. Los colon del grupo DSS mostraron una reducción significativa comparados con el grupo previamente infectado con *T. crassiceps* y expuesto al DSS, también se observaron diferencias entre el grupo DSS vs control y DSS vs infección (Fig. 5).

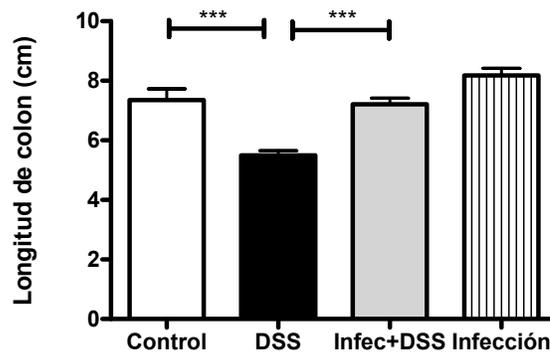


Figura 5. Transcurrida la inducción de la colitis, se observó la disminución del tamaño de colon de los ratones del grupo DSS, respecto al grupo control e infección/DSS, la cual fue registrada en cm. N=4 *** p<0.005.

También fue observada la presencia de pequeñas úlceras en los colon provenientes del grupo DSS. En el grupo Infección+DSS no fue tan evidente la reducción del colon y no había presencia de úlceras como ocurrió en el grupo DSS que desarrolló la colitis (Fig. 6).

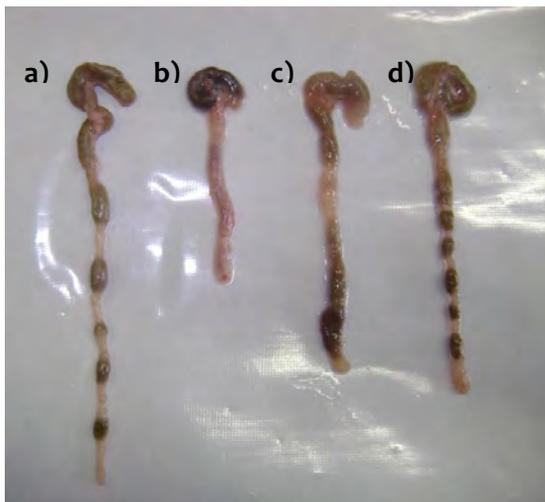


Figura 6. Daño y reducción del tamaño del colon y ciego de un ratón del grupo DSS. a) control b) DSS c) Infección+DSS d) Infección.

5.4 Niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias circulantes

Al concluir la inducción de la colitis experimental se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero y así determinar la producción de citocinas inflamatorias (TNF- α e IL-17) y antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) circulantes. Observamos una mayor producción de TNF- α e IL-17 en el grupo estimulado sólo con el DSS y que desarrollaron colitis. En los grupos Infección y control no se vio afectada la producción de estas citocinas. Respecto al grupo Infección+DSS que a pesar de recibir estímulo con el DSS, no presentó un aumento significativo en la producción de TNF- α e IL-17 al concluir la inducción de la colitis (**Fig. 7**).

Por otro lado, la producción de IL-4 e IL-10 se observó aumentada en los grupos que habían sido infectados previamente con metacestodos de *T. crassiceps* y posteriormente expuestos a DSS. Por otro lado, no se detectaron niveles significativos de estas citocinas en los grupos que recibieron solo DSS o control (**Figura 7**).

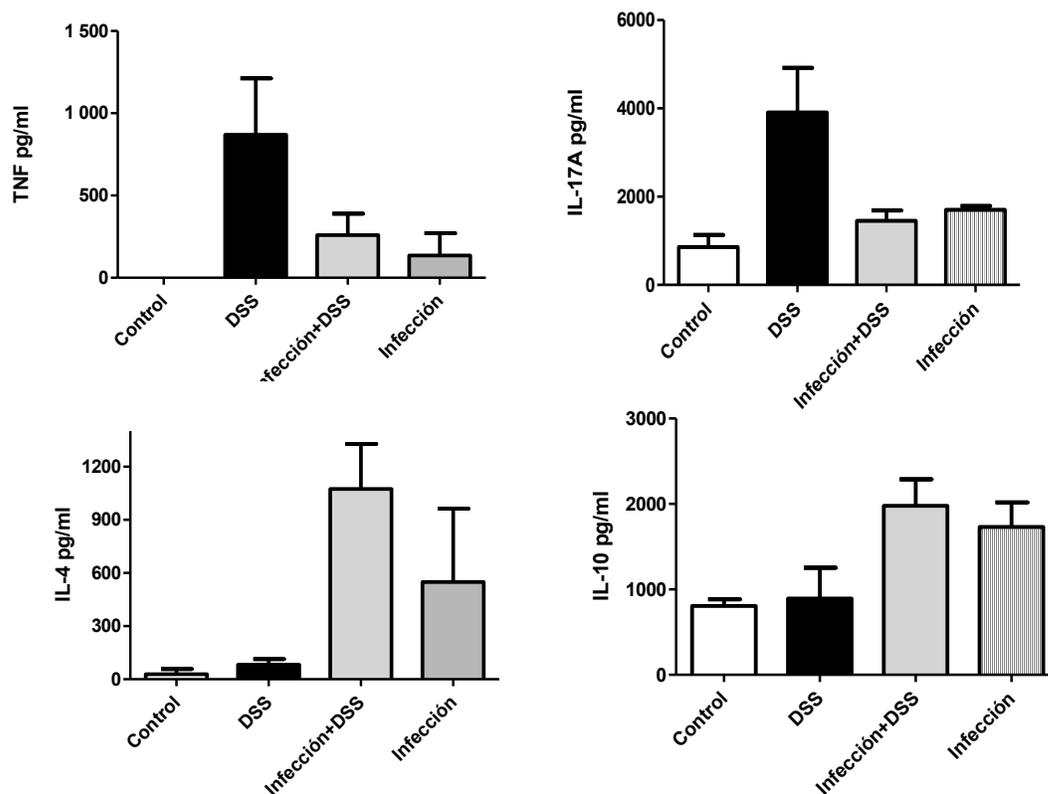


Figura 7. La Infección con *Taenia crassiceps* induce la disminución de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-17) y el aumento en los niveles de citocinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) respecto al grupo tratado únicamente con la administración de DSS y el control.

5.5 Análisis histológico (H&E)

Para determinar si los grupos de animales estimulados con DSS presentaban infiltrado inflamatorio y conservaban aún la estructura del colon (características de la colitis), se realizaron cortes histológicos y tinciones con H&E. Los grupos control e infección muestran lo que debería ser un colon sin la disrupción de la barrera que aísla la microbiota de las células del sistema inmune del colon (**Fig. 8 a y d**). En contraste, los animales del grupo con colitis (DSS) pierden esta barrera que protege al individuo, y muestran un exacerbado infiltrado inflamatorio que se refleja en el engrosamiento de la submucosa y la lámina propia que finalmente conlleva a la pérdida de la arquitectura del colon. Al evaluar al grupo (Infección+DSS) que había sido infectado con *T. crassiceps* y ocho semanas post-infección se le administró DSS al 4% para inducir la colitis, no muestra tal infiltrado inflamatorio que fue observado en el grupo tratado sólo con DSS, en cambio se observó que la estructura del colon permaneció casi intacta, pudiéndose observar fácilmente la definición de las criptas y las vellosidades, propias de un colon sin lesión aparente (**Fig. 8 b y c**).

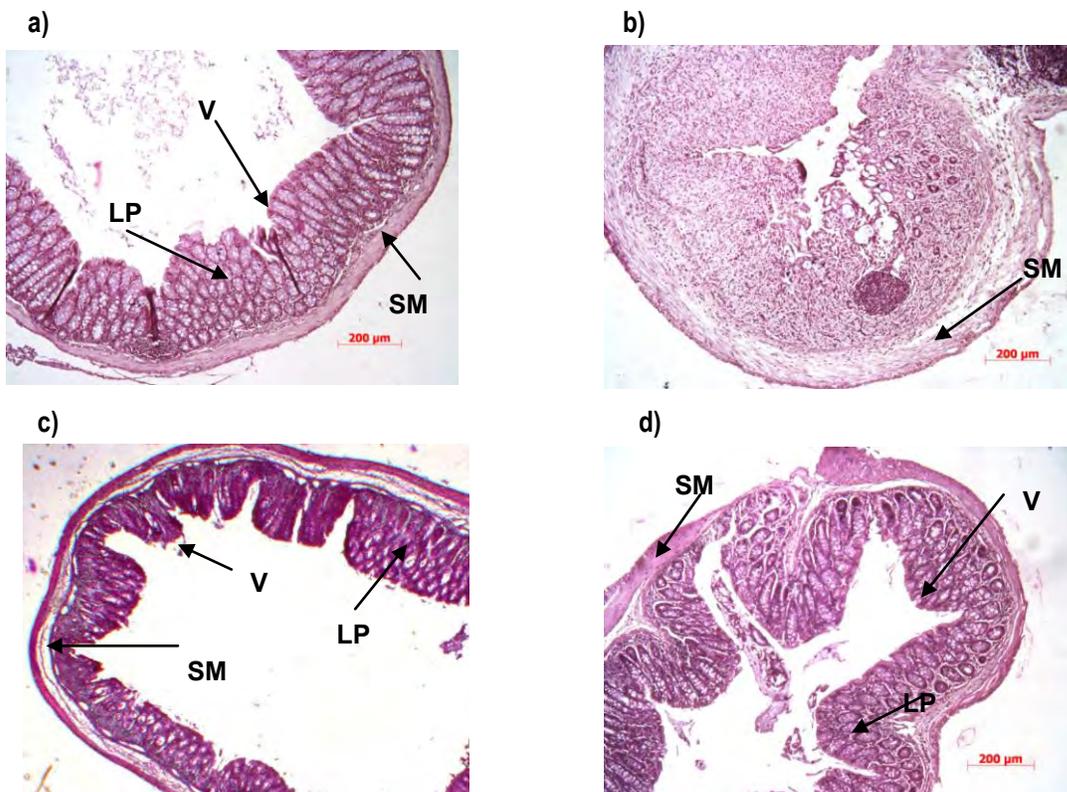


Figura 8. Pérdida de la morfología del colon en el grupo DSS, respecto al grupo control, infección/DSS e infección, observado a un aumento 10X, a) Control; b) DSS; c) Infección+DSS ;d) Infección (V=vellosidades, SM=submucosa, LP=lámina propia), (Tinción H&E).

Al observar los tejidos a un aumento 20 X en el microscopio, se corroboró que el grupo DSS mostró un mayor engrosamiento de la Submucosa y la Lamina propia que termina por afectar las vellosidades, evidenciando así, severas lesiones en la estructura del colon, en contraste, el grupo previamente infectado con *T. crassiceps* expuesto a DSS mostró una arquitectura visible del mismo (**Fig. 9**)

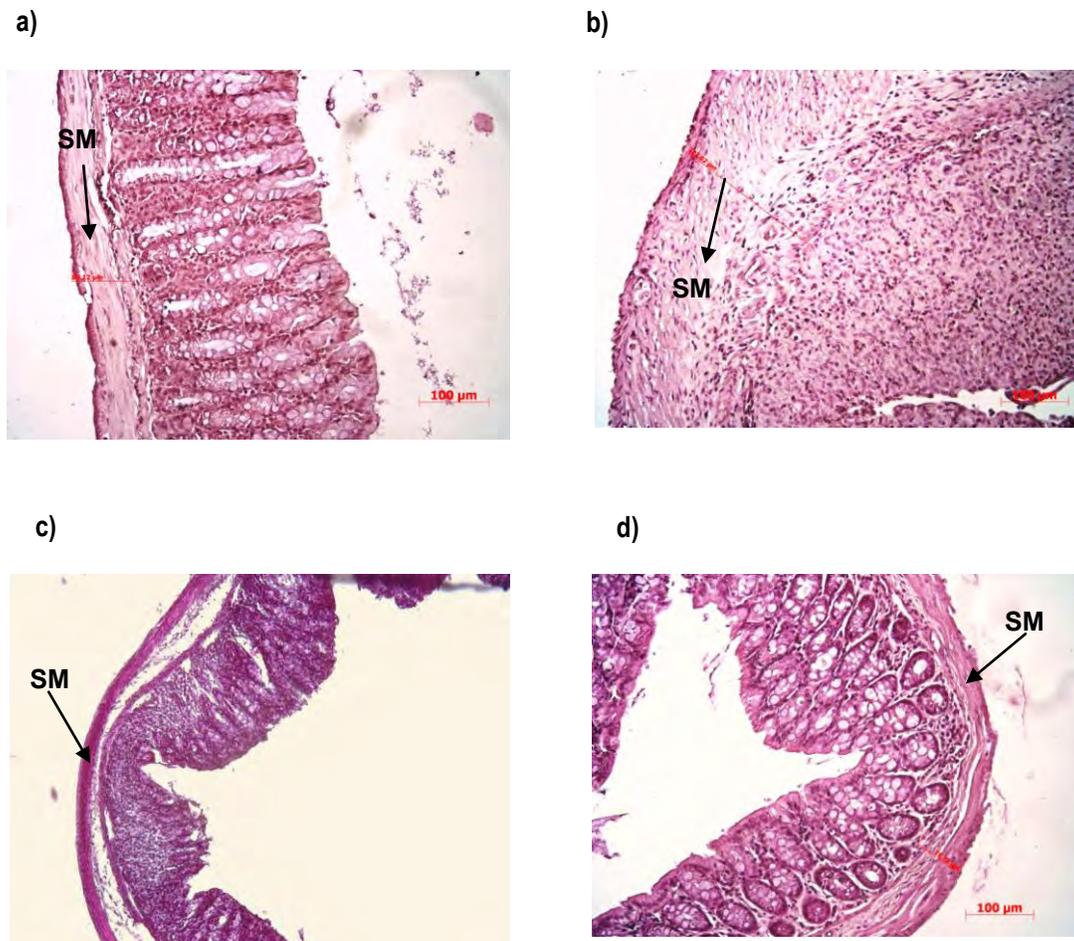


Figura 9. Engrosamiento de la submucosa (SM) del colon debido al infiltrado inflamatorio en el grupo DSS, observada a un aumento 20 X a) control; b) DSS; c) Infección+DSS; d) Infección (Tinción H&E).

Posteriormente, se midió y graficó el grosor de la submucosa en respuesta a los diferentes tratamientos. El grupo DSS, mostró un claro engrosamiento de la submucosa que resultó ser significativamente diferente al compararse con grupo control, infección e Infección+DSS, en este último grupo no se registró el aumento del grosor de la SM respecto al grupo control (Fig. 10).

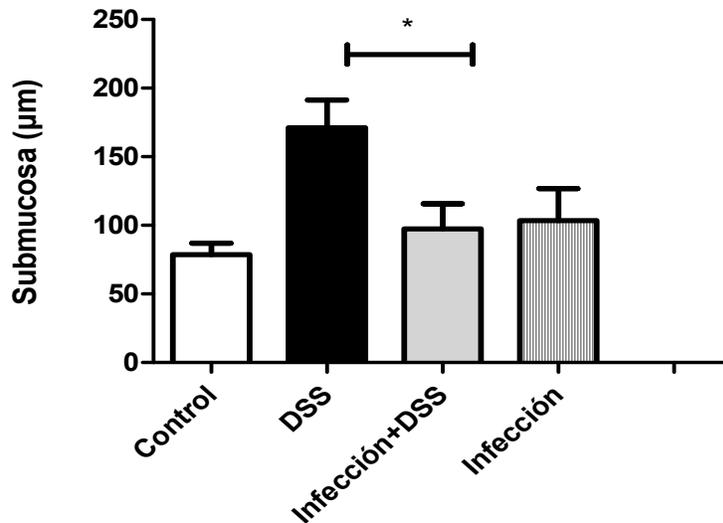


Figura 10. Aumento del grosor de la submucosa del colon del grupo DSS (colitis experimental) respecto al grupo Infección/DSS, infección y control, expresado en µm, * p<0.05.

5.6 Presencia de AAMΦ's y CAMΦ's por RT-PCR

Para determinar la presencia de CAMΦ's y AAMΦ's en el colon, se realizó RT-PCR de muestras de colon previamente lavadas, digeridas con colagenasa y tratadas con TRIsure para la extracción de RNA y la posterior formación de cDNA. Se determinaron marcadores específicos de los AAMΦ's, como son Arg1, FIZZ1 y Ym-1. Encontramos que en el grupo Infección+DSS hubo una expresión de estos tres marcadores en el tejido del colon, curiosamente estos genes a excepción de Ym-1 no fueron detectados en el grupo Infección. En el grupo DSS y control tampoco se observó la presencia de estos marcadores en colon. Para determinar la presencia de CAMΦ's se buscó el marcador específico de estos macrófagos que es iNOS. Este se expreso únicamente en el grupo de colitis inducida con DSS (**Fig. 11**).

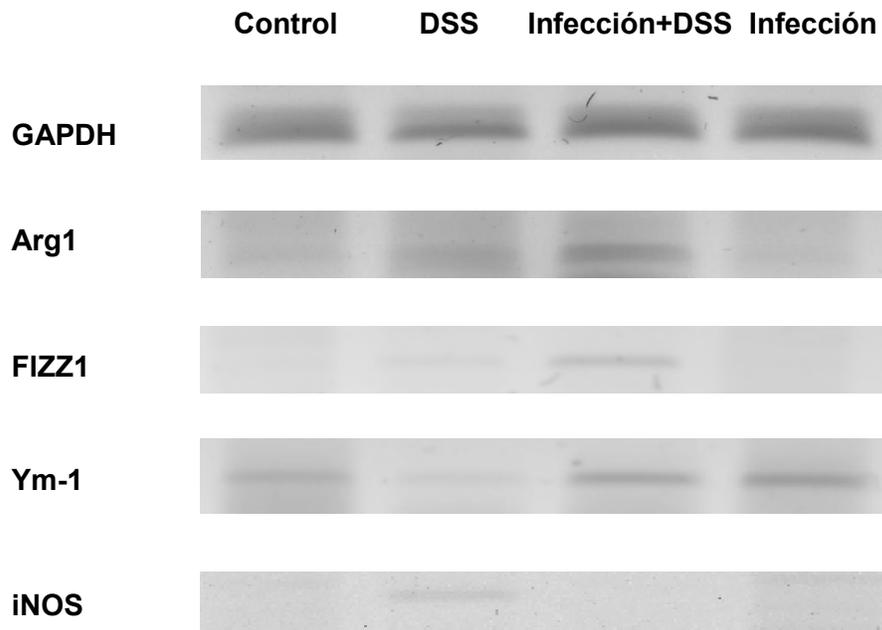


Figura 11. Expresión de genes de los AAM Φ's (Arg1, FIZZ1 y Ym-1) en muestras del colon del grupo infección/DSS y ausencia de Arg1 y FIZZ1 en los grupos control, DSS e infección.

5.7 Depósito de colágena (Tricrómica de Massons)

Las muestras de tejido también fueron procesadas y teñidas con Tricrómica de Masson que diferencia las fibras de colágena del tejido muscular, ésta se tiñe en color azul. Al realizar ésta tinción en cortes de colon de los diferentes grupos, no observamos aumento en el depósito de colágeno en el colon en ninguno de los grupos que recibieron DSS comparado con el control (Fig.12).

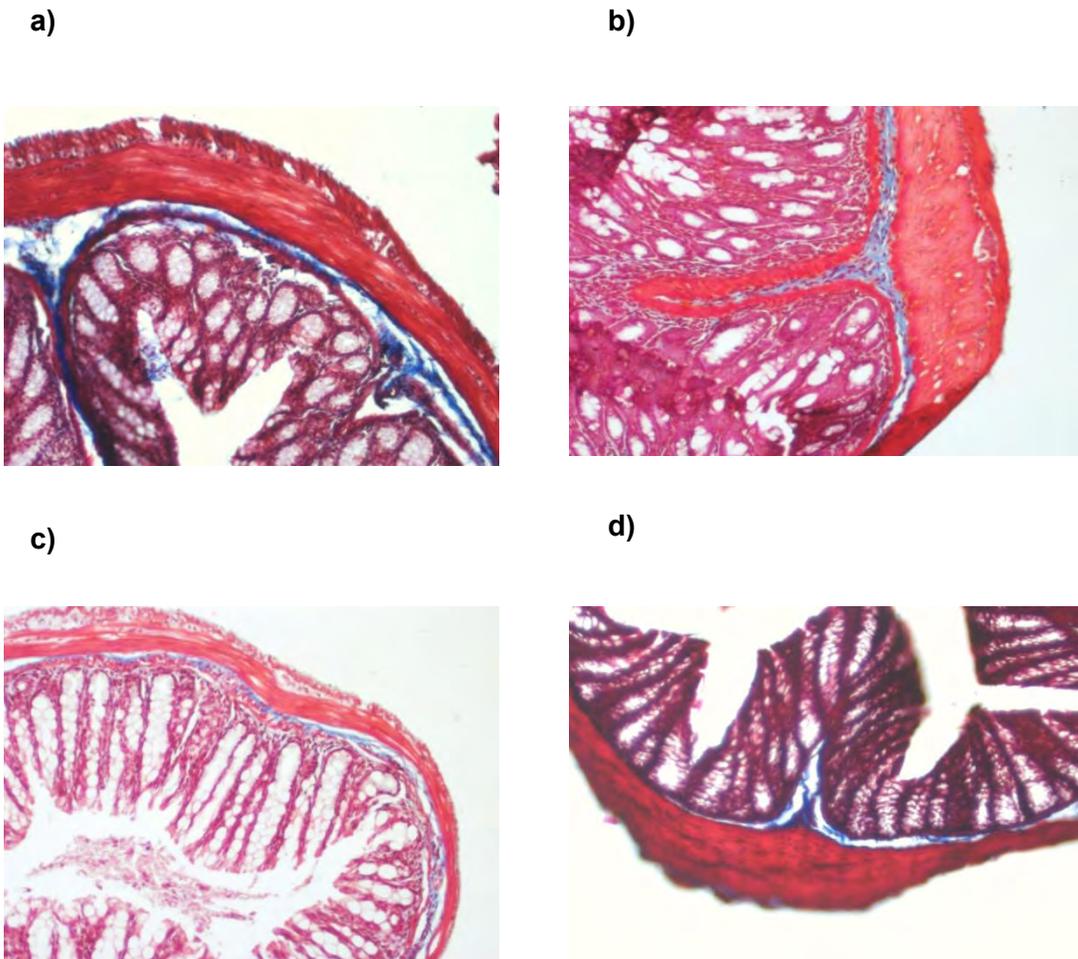


Figura 12. Tinción Tricrómica de Massons para identificar el depósito de colágena, a un aumento al 20X a) control; b) DSS; c) Infección+DSS; d) Infección.

6 DISCUSIÓN

Alrededor del mundo millones de personas están infectadas con helmintos parásitos, un gran porcentaje de sus huéspedes permanecen asintomáticos. Estos patógenos han desarrollado diversas estrategias de evasión del sistema inmune, también conocidas como inmunomodulación e inmunoregulación. Esta red reguladora es asociada con infecciones crónicas por helmintos para evitar una fuerte respuesta inmune hacia el parásito, permitiendo su supervivencia por un mayor tiempo y así restringir su patología (Elly van Riet *et al.*, 2007). Tanto en modelos experimentales como en humanos infectados por helmintos se conoce que estos parásitos polarizan la respuesta inmune hacia Th₂, la cual se caracteriza por la producción y secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-13 e IL-10. Esta inmunomodulación parece ser benéfica para el parásito y para el huésped, por un lado protege al helminto de ser erradicado, y por otro, protege al huésped de una respuesta proinflamatoria excesiva que pueda conducir al daño tisular. Recientemente, se ha identificado una subpoblación de macrófagos inducidos por la infección crónica por helmintos, conocidos como AAMΦ's. Se ha sugerido que estos AAMΦ's contrarrestan mecanismos efectores inmunes celulares y proinflamatorios, sirviendo como reguladores así como inhibidores de la respuesta inmune (Jenkins *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2007).

Como se ha mencionado, *Taenia crassiceps* es un cestodo que polariza la respuesta inmune hacia un tipo Th₂ y promueve la activación de los macrófagos hacia un perfil alternativo (AAMΦ's), reportes previos de nuestro grupo de trabajo indican que estas células poseen potente capacidad supresora (Terrazas *et al.*, 2005).

Se ha documentado un aumento en la incidencia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como diabetes tipo I, esclerosis múltiple, enfermedades celíacas, asma, rinitis alérgica y enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) en países en desarrollo (Weinstock *et al.*, 2005). La CU es una entidad clínica de las IBD, que se caracteriza por la inflamación exacerbada del colon, su etiología aún permanece desconocida, sin embargo, es sabido que su desarrollo es mediado inmunológicamente (Targan *et al.*,

2005). El tratamiento actual para la CU se basa en gran medida en el uso de esteroides e inmunosupresores. Sin embargo, el uso de esteroides no mantiene la disminución de los signos de la colitis y a largo plazo se asocia con efectos secundarios graves e irreversibles, como cataratas, enfermedad ósea metabólica y osteonecrosis. Otros pacientes son “resistentes” o se vuelven resistentes al uso de corticosteroides e incluso no responden a dosis elevadas. También se usan terapias biológicas como anticuerpos anti-TNF α , pero su administración implica un alto costo financiero poco accesible (Rutgeerts *et al.*, 2009).

En modelos experimentales de algunas de estas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, se ha reportado que la presencia de infecciones por helmintos tiene un efecto protector. Por ejemplo, la infección con *Schistosoma mansoni*, la exposición a sus huevecillos o extractos solubles de ambos, inhiben el desarrollo de diabetes tipo I en ratones NOD, aumentando la activación de la población celular reguladora llamada Treg FoxP3⁺ (Zaccone *et al.*, 2005). También se ha reportado que en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la infección previa con diferentes helmintos como *Trichinella spiralis*, *Fasciola hepatica* y *Taenia crassiceps* disminuyen significativamente la severidad de ésta (Gruden-Movsesijan *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2011; Walsh 2009).

En este trabajo de investigación se intentó determinar el efecto inmunomodulador de la infección por *T. crassiceps* en el desarrollo de un modelo de colitis aguda. Para llevar a cabo este estudio, se utilizó modelo de colitis inducida mediante la administración de DSS en agua para beber estéril durante 7 días, el cual es ampliamente aceptado a nivel mundial. Observamos que el grupo de ratones previamente infectados con metacístodos de *T. crassiceps* y la posterior administración de DSS, presentaron menos signos asociados a la colitis, como pérdida de peso, sangrado rectal, mejor consistencia de las heces y una nula presencia de sangre en estas, así como una menor reducción del colon cuando se compararon con los animales del grupo tratado únicamente con DSS.

Los cambios histológicos típicos en la colitis inducida con DSS, es la pérdida de la barrera epitelial que aísla las células del sistema inmune del intestino de la flora

bacteriana, esto produce infiltrado inflamatorio en la submucosa y la lámina propia del colon que se ve reflejado en su engrosamiento y la pérdida de la arquitectura de sus criptas (Perse *et al.*, 2012). En el grupo tratado con DSS, fue evidente una reducción significativa en el tamaño del colon, e incluso en algunas partes de éste se observaron pequeñas ulceraciones y hasta necrosis. Interesantemente, los animales del grupo previamente infectado con *T. crassiceps* y que se les indujo la colitis con DSS, no desarrollaron ninguno de estos cambios histológicos. Al comparar el grosor de la submucosa no encontramos diferencias significativas respecto al grupo control (no tratado o sano), pero sí con respecto al grupo que recibió solo DSS. Aún a pesar del efecto conocido del DSS sobre las células epiteliales del intestino, es evidente la disminución del daño a nivel histológico producido por el DSS en los ratones que fueron infectados previamente con *T. crassiceps*. Así que el siguiente paso fue determinar la producción de un mediador inflamatorio que pudiese estar asociado a la histopatología de la colitis.

Como se ha reportado, citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 están asociadas con ambas formas de las IBD. Estas citocinas generalmente surgen de una respuesta primaria Th1/Th17. Cada una de estas activa NF-kB, que a su vez induce diversos efectos proinflamatorios que son los precursores inmediatos de la fisiopatología de la CU. Diferentes trabajos han confirmado que tanto en modelos de colitis experimental como en biopsias intestinales de pacientes con colitis ulcerativa existe un aumento en la producción de los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- α (Strober *et al.*, 2011). Lo anterior concuerda con nuestros resultados obtenidos en los niveles de citocinas en suero, debido a que al finalizar la administración del DSS se observó una mayor producción de TNF- α a nivel sistémico en el grupo que sólo recibió DSS. En cambio, los niveles de TNF- α del grupo previamente infectado con *T. crassiceps* más la administración de DSS fueron significativamente menores comparados con los animales no infectados pero tratados con DSS, y muy similares a los del grupo control. Otra citocina pro-inflamatoria involucrada en esta enfermedad es la IL-17, la cual también fue inhibida hasta un 50% en los animales infectados e inducidos a colitis comparada con aquellos animales con colitis. Los mecanismos asociados a esta

inhibición de citocinas pro-inflamatorias por la infección previa de *T. crassiceps* en el desarrollo de la colitis, son aún desconocidos. Sin embargo, una posibilidad puede ser un incremento de citocinas antiinflamatorias que se sabe pueden elevarse por dicha infección. Así, se determinaron niveles de las citocinas antiinflamatorias (Th2) como IL-4 e IL-10. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo de ambas citocinas en los grupos que fueron previamente infectados con *T. crassiceps* y más tarde tratados con DSS. En contraste, los animales con colitis (DSS) no muestran cambios en la concentración de IL-4 e IL-10. En este sentido hay evidencias de una variedad de modelos experimentales que sugieren que la IL-10 es importante en la regulación inmune que se produce en la infección con helmintos y es importante para la supervivencia del huésped. En un modelo de colitis inducida con ácido sulfónico de dinitrobenceno (DNBS) la protección que ofrece la infección con *Hymenolepis diminuta* es menor en ratones que son tratados con anticuerpos que bloquean a la IL-10 (Melon *et al.*, 2010). De manera similar, en el modelo de colitis inducida con DNBS, el efecto protector de la presencia de huevos de *Schistosoma mansoni* se observa relacionado con un aumento en los niveles de RNAm de IL-10 (McKay, 2005). En otros reportes, ratones knockout de IL-10, desarrollaron espontáneamente inflamación severa en el colon (Tarjan *et al.*, 2005). Esto es consistente con las propiedades antiinflamatorias conocidas de esta citocina y es consistente con hallazgos de esta investigación, así que posiblemente una combinación de niveles elevados de IL-10 e IL-4 puede ejercer un efecto inhibitor del proceso inflamatorio asociado a la colitis.

Taenia crassiceps induce la disminución de citocinas proinflamatorias como TNF- α , que según reportes previos podría promover el desarrollo de la CU en humanos y la colitis inducida con DSS en modelos murinos. Por otro lado, *T. crassiceps* induce el aumento en los niveles de citocinas de tipo Th2 como IL-4 e IL-10. Cabe mencionar que los AAM Φ 's son promovidos por IL-4 e IL-13 a través de la cadena IL-4R α que activan JAK1 y Tyk2, reclutando así el factor de transcripción STAT-6, una molécula importante para la activación de genes como Arg1, Ym1 y FIZZ (Hebenstreit *et al.*, 2006).

En ratones deficientes del factor de transcripción STAT-6 previamente infectados con *H. diminuta*, a los que se les indujo colitis mediante la administración intrarectal de DNBS, no fueron capaces de expulsar este parásito y curiosamente no fueron protegidos de la colitis (McKay, 2005). Esto podría indicar la importancia principal de la molécula STAT-6, así como de poblaciones celulares supresoras como los AAMΦ's en el desarrollo de la inflamación, que podrían ser una de las poblaciones responsables en la protección de estas enfermedades.

Al observar que nuestro modelo de infección con colitis se induce una respuesta tipo Th2 a nivel sistémico, buscamos localmente la expresión de algunos marcadores específicos de AAMΦ's (Arg1, FIZZ y Ym-1) mediante PCR, en el sitio de la patología. Previamente se ha reportado que en la infección crónica con *T. crassiceps* en muestras provenientes de peritoneo es reclutada esta población celular. Interesantemente, a pesar de que *T. crassiceps* se localiza exclusivamente en cavidad peritoneal, se observó una expresión de los tres marcadores en colon del grupo previamente infectado más DSS, a diferencia del grupo únicamente tratado con DSS e incluso que el grupo Infección. Esto sugiere dos cosas, la primera; que estos macrófagos podrían migrar a los sitios en donde se está llevando a cabo la reacción inflamatoria que amenaza la integridad del tejido, o bien que factores solubles liberados por *T. crassiceps* pueden viajar hasta el sitio dañado y ahí actuar sobre macrófagos residentes, que podrían ser activados de manera alternativa. Estas células también están implicadas en la reparación de tejido y cicatrización. Arg1 actúa en la cicatrización de heridas debido a que participa en el depósito de colágeno, la actividad de FIZZ1 y Ym1 es poco conocida pero se cree que están implicados en procesos de reparación del tejido (Nair *et al.*, 2005). Esto nos llevo a pensar que la presencia de *T. crassiceps*, los altos niveles de IL-4 y el posible reclutamiento de AAMΦ's en el colon podría generar un exceso de depósito de colágeno e incluso generar fibrosis en este el tejido. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante la tinción de colágeno nos indican que no hay indicios de fibrosis en el colon que pueda ser atribuible a la infección. Así, la inhibición de la sintomatología de la colitis experimental por la infección con *T. crassiceps*, aparentemente no causa un daño colateral.

En reportes previos se ha demostrado que infecciones por otros helmintos también pueden disminuir los efectos de la colitis. Tal es el caso de la administración oral de estadios larvales, huevos o cisticercos de helmintos. *Heligmosomoides polygyrus* o huevos de *S. mansoni* protegen de la colitis inducida con ácido sulfónico de trinitrobenceno (TNBS), así como de *Trichinella spiralis* e *Hymenolepis diminuta* (Tabla 1). De esta forma nuestro trabajo aquí apoya la idea que el microambiente inducido por la infección con helmintos inhibe el proceso inflamatorio asociada a diferentes tipos de colitis.

Tabla 1. Infecciones por helmintos en el desarrollo de la colitis.

Parásito	Clase	Vía de entrada	Vector de infección	Localización	Modelo de inducción de colitis	Referencia
<i>Heligmosomoides polygyrus bakeri</i>	Nematoda	Oral	L3	Intestino	IL-10 ^(L)	Blum et al., 2012
<i>H. polygyrus</i>	Nematoda	Oral	L4	Intestino	DSS 5%	(Donskow-Łysoniewska et al., 2012)
<i>Trichuris suis</i>	Nematoda	Oral	Huevos	Intestino	Colitis Ulcerativa en humanos	(Summers et al., 2005)
<i>Trichinella spiralis</i>	Nematoda	Oral	Larvas	Intestino	DNBS	(Khan et al., 2002)
<i>Schistosoma mansoni</i>	Trematoda	Oral Trans-cutánea	Cercarias	Intestino, pulmones, vejiga	TNBS	(Bodammer et al., 2011)
<i>S. japonicum</i>	Trematoda	Oral	Huevos	Intestino SNC	TNBS	(Xia et al., 2011)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	Cestoda	Oral	Cisticercos	Intestino	DNBS	Melon et al., 2010

Pie de cuadro. L3 y L4= larvas infecciosas; SNC= sistema nervioso central; DNBS= ácido sulfónico de dinitrobenceno; TNBS= ácido sulfónico de trinitrobenceno.

Actualmente, *Trichuris suis* es usada como tratamiento para pacientes con IBD y los resultados parecen ser prometedores. El tratamiento consta de la administración oral de hasta 2500 huevos de este nemátodo cada tres semanas, una vez ingeridos, estos huevos se anclan al intestino delgado para liberar la larva que madurará en un gusano adulto, el cual se ubicará en el colon (Weinstock et al., 2005).

Al analizar estos datos de reportes previos, hemos identificado que todas estas infecciones generadas para la inhibición de la colitis inducida o espontánea, hacen uso de la administración oral de los estadios larvales de *H. polygyrus*, *Trichuris muris*, cisticercos de *H. diminuta*, huevos de *Schistosoma japonicum*, y *Trichuris suis*, los cuales se localizan dentro del intestino. En el caso de *S. mansoni* además de la administración oral de huevos, se practica también la administración vía transcutánea de cercarias de este parásito, las cuales pueden localizarse en cualquier órgano, entre estos la vejiga (**Tabla 1**).

Hay un hecho que se debe considerar al contemplar el modelo de *T. suis*, que como había descrito previamente, ya se administra en algunos pacientes que padecen de colitis ulcerativa, y es que existe la posibilidad de que en algunos huéspedes, este parásito entérico puede enfrentarse a un ambiente sutil o dramáticamente alterado, que pueda permitir la localización de adultos, larvas o huevos a un sitio fuera del intestino, como por ejemplo el sistema nervioso central, y así generar el desarrollo de ciertas patologías (West, 2005).

La protección que genera el modelo de infección con *T. crassiceps* en la colitis inducida por DSS resulta ser un tanto diferente con respecto a los modelos mencionados anteriormente, debido al hecho de que este parásito se inocula vía i.p. y su efecto inmunomodulador es capaz de regular el ambiente inflamatorio en un lugar relativamente lejano como sería el interior del colon, ya que en los otros modelos los helmintos se encuentran en el lumen intestinal o directamente en el sitio donde se genera el daño. Lo que nos sugiere, como se mencionó antes, que *T. crassiceps* podría estar liberando antígenos solubles que hicieran blanco en células residentes en el sitio de inflamación. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que

antígenos solubles de alto peso molecular secretados por *T. crassiceps* son capaces de modular la respuesta inflamatoria de células dendríticas murinas y humanas *in vitro*, así que probablemente esto también podría suceder *in vivo*. Todos estos datos generados, nos hacen concluir que puede ser viable la opción de “terapia con helmintos” para el tratamiento de IBD. Sin embargo, la introducción de especies a nuevos nichos puede tener consecuencias secundarias que necesitan ser estudiadas a fondo (Melon *et al.*, 2010). Por lo que es primordial identificar los mecanismos a través de los cuales las posibles moléculas liberadas por los parásitos están actuando para suprimir la respuesta inflamatoria en colitis para así generar nuevas terapias o terapias alternativas contra las IBD.

Algunos parásitos y productos de estos parásitos, inhiben la respuesta inflamatoria a través de la respuesta inmune innata y adaptativa. Se ha hecho un considerable progreso para identificar moléculas derivadas de estos parásitos, las formas por las que interactúan con el sistema inmune y cómo éstas median la inmunomodulación del huésped (Maizels *et al.*, 2009). A pesar de este esfuerzo, aún es poco el conocimiento sobre los mecanismos de supresión que generan estos parásitos, como es el caso de *T. crassiceps*, por lo que es necesario estudiar más a fondo el papel que desempeñan poblaciones celulares supresoras como los AAM Φ 's, las moléculas que liberan y así poder desarrollar agentes farmacológicos que imiten el efecto benéfico de este parásito en el inicio y desarrollo de enfermedades autoinmunes o enfermedades que son mediadas por una respuesta inflamatoria exacerbada.

7. CONCLUSIONES

1. La infección previa con *Taenia crassiceps* inhibe el desarrollo de la colitis experimental.

Esta inhibición se debe a:

- Una disminución de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-17A y a un aumento de citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10.
- Un menor infiltrado inflamatorio en la submucosa y lámina propia del colon.

2. La infección crónica con *Taenia crassiceps* induce la expresión de marcadores específicos de AAM Φ 's en el tejido del colon.

3. La infección previa con *Taenia crassiceps* no genera depósito de colágeno en tejido del colon.

8. REFERENCIAS

- Allen, J.E. y Maizels, R.M. 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminthes. *Nature Reviews Immunology* **11**(6): 375-387.
- Blum, A.M. et al. 2012. Heligmosomoides polygyrus bakeri Induces Tolerogenic Dendritic Cells that Block Colitis and Prevent Antigen-Specific Gut T Cell Responses. *Journal Immunol* **189**(5):2512-2520.
- Blumberg, R.S. et al. 1999. Animal models of mucosal inflammation and their relations tu human inflammatory bowel disease. *Curr Opin. Immunol* **11**(6):648-656.
- Bodammer, P. et al. 2011. Schistosoma mansoni infection but not egg antigen promotes recovery from colitis in outbred NMRI mice. *Dig Dis Sci.* **56**(1): 70-78.
- Cario E. 2010. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis* **16**:1583–1597.
- Donskow-Łysoniewska, K. et al. 2012. Heligmosmoides polygyrus fourth stages induce protection against DSS-induced colitis and change opioid expression in the intestine. *Parasite Immunol.* **34**(11):536-46.
- Duque, M.A. y Rojas, L.M. 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.
- Elly, van Riet., et al. 2007. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology* **212**(6): 475–490.
- Espinoza-Jiménez, A. et al. 2010. Taenia crassiceps infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *J Biomed Biotechnol* 2010: 11.
- Geert, R. et al. 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.
- Gordon, S. y Martínez, F.O. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and function. *Immunity* **32**(5): 593-604.
- Gruden-Movsesijan, A. et al. 2010. Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic Trichinella spiralis infection in Dark Agouti rats *Parasite Immunol.* **32**(6):450-9.
- Harrison, O.J. y Maloy, K.J. 2011. Innate Immune Activation in Intestinal Homeostasis. *J Innate Immun* **3**(6): 585–593.

- Hebenstreit, D. et al. 2006. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**(3): 173-188.
- Itzcowitz, S.H. y Yio, X. 2004. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role on inflammation. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* **287**:1-12.
- Izcue, A. et al. 2005. Regulatory Lymphocytes and Intestinal Inflammation. *The Annual Review of Immunology* **27**:313-338.
- Jaramillo, F.G. et al. 2006. Células T reguladoras, infección y autoinmunidad: implicaciones en terapéutica. *ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA* **10**(3):178-185.
- Jenkins, J.S. y Allen, J.E. 2010. Similarity and Diversity in Macrophage Activation by Nematodes, Trematodes, and Cestodes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 (2010), 14 p.
- Khan, W.I. et al. 2002. Intestinal Nematode Infection Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Infect Immun* **70**(11): 5931-5937
- Korn, T. et al. 2009. L-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* **27**:485-517
- McKay, D. 2005. The beneficial helminth parasite? *Parasitology* **132**(1):1-12.
- Maloy, K.J. y Powrie, F. 2011. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* **474**(15):298-306.
- Maillard, H. et al. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *AIDS* **12**(12):1551-1552.
- Maizels, R.M. y Yazdanbakhsh, M. 2007. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature reviews* **3**(9):733-744
- Martinez, F.O. et al. 2009. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **27**:475-483.
- Mayer, L.I. 2005. Mucosal Immunity. *Immunological Review* **206**: 1595- 1600.
- Melon, A. et al. 2010. Infection with *Hymenolepis diminuta* Is More Effective than Daily Corticosteroids in Blocking Chemically Induced Colitis in Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**:1-7.
- Molodecky, N.A. et al. 2012. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* **142**(1):46-54.
- Murray, J.P. y Wynn, A.T. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophages subsets. *Nature Reviews. Immunology* **11**(11): 723-735.

- Nair, M.G. y Cochrane, D.W. 2003. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. *Immunol Lett* **85**(2):173-180.
- Nair, M.G. et al. 2005. Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infection and Immunity* **73**:385–394.
- Perse, M. y Cerar, A. 2012. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse: Traps and Tricks. *Journal of biomedicine and Biotechnology* **2012**:1-13.
- Pesce, J.T. et al. 2009. Arginase-1–Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine–Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathogens* **5**(4):1-15.
- Rigueiro, J.R. et al. 2003. Inmunología. 3 edición. Editorial Panamericana.
- Reyes, J.L. y Terrazas, L.I. 2007. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunology* **29**(12): 609–619.
- Reyes, J.L. et al. 2009. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infect Genet Evol* **9**(6): 1115-1127
- Reyes, J.L. et al. 2011. *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* **2**:77-87.
- Roda, G.j et al. 2010. Cytokine Networks in Ulcerative Colitis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**:1-5.
- Rodríguez-Sosa, M. et al. 1999. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunol* **21**(4)177–185.
- Rodríguez-Sosa, M. et al. 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.
- Romano, M.C. et al. 2003. Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **85**(2):221-225.
- Rutgeerts, P. et al. 2009. Biological Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *GASTROENTEROLOGY* **136**:1182–1197
- Saleh, M. y Trinchieri, G. 2011. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat Rev Immunol* **11**(1) 9-20.

- Smith, P.D. *et al.* 2005. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunological Review* **206**: 149-159.
- Strober, W. y Fuss, J. 2011. Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *GASTROENTEROLOGY* **140**:1756–1767.
- Summers, R.W. *et al.* 2005. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* **128**(4):825-32.
- Targan, S.R. y Karp, C.L. 2005. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunological Reviews* **206**:296-305.
- Terrazas, L.I. *et al.* 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* **84**: 74–81.
- Terrazas, L.I. *et al.* 2005. Role of the programmed death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol.* **35**(3):1349–1358.
- Toenjes, S.A. *et al.* 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* **118**(6):623–633.
- Walsh, P.K. *et al.* 2009. Infection with a Helminth Parasite Attenuates Autoimmunity through TGF- β -Mediated Suppression of Th17 and Th1 Responses *The Journal of Immunology* **183**(3): 1577-1586.
- Weinstock, J. *et al.* 2005. Role of helminths in regulating mucosal inflammation. *Springer Semin Immun* **27**:249–271.
- West, A.B. 2005. Potential danger in the medical use of *Trichuris suis* for the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease* **11**:515.
- Xia, CM. *et al.* 2011. *Schistosoma japonicum* ova maintains epithelial barrier function during experimental colitis. *World J Gastroenterol* **17**(43):4810-6.
- Yazdanbakhsh, M. *et al.* 2002. Allergy, parasites and the hygiene hypothesis. *Science* **296**(5567):490–494.
- Zacccone, P. *et al.* 2005. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. *Eur J Immunol.* **39**(4):1098-2107.

ANEXO I

- **Técnica de procesamiento de inclusión en parafina**

Agua corriente 30´

Alcohol 70% 30´

Alcohol 80% 30´

Alcohol 90% 30´

Alcohol absoluto 30´

Alcohol amilico *Toda la noche

Parafina I 60´

Parafina II 60´

Inclusión en bloque

- **Tinción Hematoxilina-Eosina (H&E)**

Xilol 10´

Alcohol-Xilol 3´

OH 100% 3´

OH 90% 2´

OH 80% 2´

OH 70% 1´

Agua corriente 3´

Hematoxilina de Harris 10´

Agua corriente *enjuagar

Eosina alcohólica 30´´

Agua corriente *enjuagar

OH 70% 1´

OH 90% 1´

OH 80% 1´

OH 90% 1´

OH 100% 2´

Xilol I 5´

- **Extracción RNA Fenol- Cloroformo**

Agregar 200µl de cloroformo

Agitar en vortex 30´´

Dejar reposar 5´

Centrifugar 13500 rpm 15´

Recuperar fase transparente en tubos de 1ml

Agregar 500µl de Isopropanol

Invertir y meter 15 min durante 20°C

Agitar levemente en el vortex antes de centrifugar

Centrifugar a 13500 rpm durante 15´

Retirar exceso de isopropanol

Agregar 1ml de etanol al 75%

Centrifugar a 10000rpm durante 10´

Decantar etanol

Dejar secar durante 5-10´

Hidratar con 25 µl de agua

ANEXO II

- **Secuencias de primers**

Genes	Secuencias	Pares de bases (Pb)	Temperatura de alineación (°C)	Referencia
GAPDH	F-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC R-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	1035	56	(Reyes <i>et al.</i> 2009)
Arginasa1	F-CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG R-CAG ATA TGC AGG GAG TCA CC	250	54	(Nair <i>et al.</i> 2003)
Ym1	F-TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG R-TTTGTCCTTAGGAGGGCTTCCTC	436	56	(Nair <i>et al.</i> 2003)
Inos	F-CTGGAG GAG CTC CTG CCT CATG R-GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG	449	62	(Reyes <i>et al.</i> 2009)
Fizz1	F-GGTCCCAGTGCATATGGATGAGAC R-CACCTCTTCACTCGAGGGACAGTT	290	65	(Reyes <i>et al.</i> 2009)

Tabla 2. Secuencias de primers y temperatura de alineación utilizados.