



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE  
EXCRECIÓN-SECRECIÓN (ES) Y DEL EXTRACTO CRUDO (EC)  
DE *Hymenolepis nana* EN LA DIABETES EXPERIMENTAL  
MURINA INDUCIDA POR STREPTOZOTOCINA

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

BRENDA ARACELI OSORNIO LUCIO



CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd.Mx. 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** ENRIQUE ORTEGA SOTO  
**VOCAL:** ABEL GUTIÉRREZ RAMOS  
**SECRETARIO:** GUILLERMINA ÁVILA RAMÍREZ  
**1er. SUPLENTE:** PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ  
**2° SUPLENTE:** AURORA LARA NÚÑEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE  
INMUNOMODULACIÓN Y AGENTES PATÓGENOS, DEPTO. DE MICROBIOLOGÍA  
Y PARASITOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

### **ASESORA DEL TEMA**

---

**Dra. Guillermina Ávila Ramírez**

### **SUSTENTANTE:**

---

**Brenda Araceli Osornio Lucio**

El presente trabajo realizó bajo la asesoría de la Dra. Guillermina Ávila Ramírez en el laboratorio de Inmunomodulación y Agentes Patógenos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del proyecto IN224814 de DGAPA.

## Índice

<b>Índice de figuras</b> .....	<b>9</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>10</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>11</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>12</b>
Diabetes tipo 1 .....	12
Modelos de animales en el estudio de la DT1 .....	18
La hipótesis de la higiene .....	19
<i>Hymenolepis nana</i> .....	22
<b>Hipótesis</b> .....	<b>24</b>
<b>Objetivo</b> .....	<b>24</b>
Objetivo general .....	24
Objetivos particulares .....	24
<b>Materiales y metodología</b> .....	<b>25</b>
Animales .....	25
Obtención de los productos de excreción-secreción de <i>H. nana</i> (HnES).....	25
Obtención del extracto crudo de <i>H. nana</i> (HnEC) .....	26
Cuantificación de proteínas en los productos antigénicos.....	26
Análisis de los productos antigénicos.....	26
Evaluación de la concentración de endotoxinas en los productos antigénicos ..	27
Administración de los productos antigénicos.....	27
Inducción de diabetes con streptozotocina (STZ) .....	28
Evaluación de la inducción de diabetes experimental .....	28
Necropsia y obtención de muestras .....	28
Cultivo de células de bazo.....	29
Determinación de anticuerpos contra <i>H. nana</i> .....	30
Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivo de células de bazo y en lavados intestinales.....	30

Histología .....	31
Análisis estadístico .....	32
<b>Resultados .....</b>	<b>33</b>
Obtención de los productos de excreción-secreción (HnES) y del extracto crudo (HnEC) de <i>Hymenolepis nana</i> .....	33
Determinación de endotoxinas en los productos antigénicos de <i>H. nana</i> .....	34
Evaluación de la diabetes tipo 1 inducida por STZ.....	35
Evaluación de la respuesta inmune humoral.....	37
Niveles de citocinas en sobrenadante de cultivo de células de bazo y en lavados intestinales .....	40
Análisis histológico de páncreas .....	43
<b>Discusión .....</b>	<b>46</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>54</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>55</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de la molécula de glucosa y de STZ.....	18
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Hymenolepis nana</i> .....	22
<b>Figura 3.</b> Análisis electroforético de los productos de <i>H. nana</i> .....	34
<b>Figura 4.</b> Variación de peso en los grupos experimentales.....	36
<b>Figura 5.</b> Niveles de glucosa sanguínea en grupos experimentales.....	37
<b>Figura 6.</b> Determinación de anticuerpos IgG totales.....	38
<b>Figura 7.</b> Determinación de las subclases de anticuerpos IgG1 e IgG2a.....	39
<b>Figura 8.</b> Cuantificación de citocinas en lavados intestinales del experimento con HnES.....	41
<b>Figura 9.</b> Cuantificación de citocinas en lavados intestinales del experimento con HnEC.....	42
<b>Figura 10.</b> Micrografías de páncreas.....	44
<b>Figura 11.</b> Grado de insulinitis en islotes pancreáticos.....	45

## Abreviaturas

- APC** Célula presentadora de antígeno
- DC** Célula dendrítica
- DMEM** Medio Eagle Modificado de Dulbecco
- DT1** Diabetes tipo 1
- DT2** Diabetes tipo 2
- ELISA** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- HLA** Antígeno Leucocitario Humano
- HnEC** Extracto crudo de *Hymenolepis nana*
- HnES** Productos excreción-secreción de *Hymenolepis nana*
- IFD** Federación Internacional de Diabetes
- Ig** Inmunoglobulina
- IL** Interleucina
- INF** Interferón
- LAL** Lisado de amebocitos de *limulus*
- MHC** Complejo mayor de histocompatibilidad
- NK** Célula asesina natural
- NOD mouse** Ratón diabético no obeso
- PBS** Buffer salino de fosfatos
- rpm** Revoluciones por minuto
- STZ** Streptozotocina
- Th** Linfocito T cooperador
- TNF** Factor de necrosis tumoral
- Treg** Linfocito T regulador
- UE** Unidades de endotoxina
- WHO** Organización Mundial de la Salud



## Resumen

Los helmintos son parásitos que inducen una respuesta inmune del tipo Th2, la cual tiene el potencial de suprimir las respuestas tipo Th1 asociadas a algunas enfermedades de tipo autoinmune. Por ello se ha sugerido que las infecciones con helmintos o el tratamiento con sus productos antigénicos pueden regular enfermedades como la diabetes tipo I. En este trabajo se determinó el efecto que tienen los productos de excreción-secreción (ES) y el extracto crudo (EC) de *Hymenolepis nana* sobre el desarrollo de diabetes tipo I en un modelo murino. Ratones BALB/c de 8 semanas de edad se trataron con los productos antigénicos por vía intraperitoneal durante 2 semanas, posteriormente a los respectivos grupos se les indujo diabetes mediante la administración de una dosis diaria de Streptozotocina (50mg/kg/5d). Se determinaron varios parámetros como valores de glucosa en sangre, peso, producción de anticuerpos y citocinas en lavados intestinales y cultivo de bazo. La administración de los productos HnES y del HnEC tuvo un efecto positivo en los ratones, ya que sus niveles de glucosa sanguínea se mantuvieron debajo del grupo al que solo se le administró STZ, además de que mantuvieron un peso estable durante todo el experimento. Hubo una producción de anticuerpos IgG contra los productos antigénicos en los ratones inmunizados, además que se observó que la producción de la subclase IgG1 era mayor que IgG2a. También se observó una protección a nivel de páncreas, ya que los ratones protegidos con los productos antigénicos presentaron poco grado de insulinitis, mientras que los resultados en cuanto a la cuantificación de citocinas no fueron consistentes.

## Introducción

### **Diabetes tipo 1**

La Diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune en la cual las células T antígeno-específicas destruyen selectivamente a las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina (Li et al, 2014). La enfermedad se presenta cuando el 70% de las células  $\beta$  han sido destruidas, y como resultado el cuerpo ya no puede producir la insulina que necesita para el mantenimiento de la homeostasis de glucosa. La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero la aparición normalmente ocurre en niños y jóvenes adultos. Las personas con esta forma de diabetes necesitan insulina todos los días para controlar los niveles de glucosa en la sangre, sin la insulina una persona con DT1 moriría (Cooke, 2006; IDF, 2015).

Para controlar los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo, la insulina actúa principalmente de tres maneras: inicialmente señala a células de tejidos periféricos que son sensibles a la insulina (principalmente el músculo esquelético) para aumentar su captación de glucosa. En segundo lugar, promueve la glucogénesis en el hígado, y por último también inhibe la secreción de glucagón por parte de las células  $\alpha$  en el páncreas, lo que detiene la producción de glucosa mediante los procesos de glucogenólisis y la gluconeogénesis que se llevan a cabo en el hígado (Aronoff et al, 2004). Por lo anterior, la insulina es importante para la regulación de los niveles de glucosa en el cuerpo.

La DT1 a menudo se desarrolla repentinamente y puede producir síntomas tales como polidipsia, poliuria, falta de energía, polifagia, pérdida de peso, lenta sanación de heridas, infecciones recurrentes y visión borrosa, además de deshidratación severa y cetoacidosis diabética en niños y adolescentes (Kharroubi y Darwish, 2015). La diabetes tipo 1 se diagnostica por un nivel elevado de glucosa en la sangre más la presencia de los síntomas mencionados anteriormente; según la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), una persona se diagnostica como diabética cuando los niveles de glucosa plasmática en ayunas son iguales o mayores a 7.0 mmol/L (126 mg/dL) (WHO, 2006). En algunas partes

del mundo, donde la diabetes tipo 1 es menos común, los síntomas se pueden confundir con otras enfermedades, por lo que es crucial que la glucosa en sangre sea medida cuando uno o más de los síntomas mencionados están presentes.

Este tipo de diabetes constituye del 5 al 10% de personas diagnosticadas con diabetes, así mismo representa el 80%-90% de diabetes en niños y adolescentes. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés), el número de niños menores de 15 años diagnosticados con DT1 en 2015 era de 542 000. A esta cifra se suma otra similar o incluso superior de jóvenes de entre 15 y 25 años. Junto con los adultos con DT1, este millón o más de personas se enfrentan al problema de vivir con una enfermedad compleja, crónica y potencialmente letal (IDF, 2015).

Debido a que los registros que se tienen en México relacionados con problemas de diabetes son pobres y están desactualizados, es difícil tener cifras exactas de la incidencia de esta enfermedad en nuestro país. La Federación Internacional de Diabetes maneja que en México el 15.8% de la población padece diabetes, sin embargo, no hace una distinción de cifras entre la DT1 y la DT2. El dato más cercano que se maneja es el número de niños de 0-14 años diagnosticados con DT1 en la región de Norte América y Caribe (EE. UU., México y Canadá, así como 25 países y territorios caribeños), la cual es de 107 300 niños, así como 16 500 niños recién nacidos diagnosticados cada año (IDF, 2015).

Se desconocen las causas por las cuales se desarrolla la DT1; aunque se estima que las lesiones en las células  $\beta$  del páncreas se presentan debido a un grupo de factores heterogéneos, que incluyen antecedentes genéticos y agentes ambientales. Algunos de los componentes genéticos de esta enfermedad se han relacionado con susceptibilidad de variaciones en algunos loci del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) dentro del grupo del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) clase II, en especial a las moléculas DR3 y DR4. El 55% de los pacientes con DT1 expresa el HLA-DR3/DQ2; otro alelo que se considera un factor importante de riesgo para desarrollar la enfermedad es el HLA-DQ8 (Akirov y Pinhas-Hamiel, 2015; Li et al, 2014). Sin embargo, una tasa de discordancia de más del 50% entre

gemelos homocigóticos para el desarrollo de DT1 indica una posible participación de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad (Morran et al, 2015).

El único factor ambiental que se conoce con certeza es la rubeola congénita, ya que los recién nacidos con este padecimiento desarrollan subsecuentemente DT1 (Muralidhara-Krishna y Srikanta, 2015). Se sabe también que un factor importante en el desarrollo de la enfermedad es la alimentación; por ejemplo, se ha estudiado la alimentación de bebés con predisposición genética y se ha encontrado que aquellos que son expuestos a proteínas de la leche de vaca (a través de leche de formula) presentan un mayor riesgo de desarrollar inmunidad contra las células  $\beta$  y posterior desarrollo de DT1, que aquellos infantes que son alimentados solo con leche materna (Kostraba et al, 1993). Sin embargo, estos resultados son ambiguos ya que en otros estudios no se ha encontrado significancia de estos factores (Nielsen et al, 2014). La introducción temprana de sólidos a la dieta del infante, en especial de cereales con gluten también se ha estudiado como factor desencadenante de la DT1. De acuerdo con Norris, la introducción de cereales a una edad temprana (antes de los 3 meses de edad) se asocia a una mayor probabilidad de desarrollar autoinmunidad pancreática (Norris et al, 2003). Un estudio en modelos animales con ratones NOD encontró que aquellos con una dieta libre de gluten tenían cuatro veces menos probabilidades de desarrollar DT1 que aquellos con una dieta que incluía gluten (Funda et al, 1999).

Entre los factores ambientales destacan también los virus; un amplio rango ha sido asociado con la etiología de la DT1, sin embargo, la mayoría de ellos no han podido ser establecidos con seguridad o han mostrado discordancia entre estudios (Nielsen et al, 2014). En el caso de los enterovirus de cadena sencilla de RNA perteneciente a la familia *Picornaviridae*, la asociación entre la infección viral y la incidencia de DT1 parece ser fuerte, ya que el RNA de enterovirus se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes diabéticos que en personas sanas, además de que las infecciones por estos virus persisten en pacientes con DT1 (Yeung et al, 2011).

Sea cual sea la causa, evidencia reciente sugiere que la iniciación de la DT1 requiere tanto de células T CD4+ como T CD8+: la participación de células T autorreactivas que se diferencian en efectoras al reconocer antígenos de células  $\beta$  pancreáticas que fueron presentados por células presentadoras de antígeno (APC) locales, siendo la insulina el más relevante de los autoantígenos en la DT1. Diversas líneas de investigación han reportado que los péptidos A:1-12 y B:9-23 podrían ser blancos esenciales de la destrucción autoinmune en humanos y en ratones diabéticos no obesos (NOD mouse) respectivamente (Li et al, 2014). Otros autoantígenos como el transportador de Zinc 8 (ZnT8), la ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD 65) y el antígeno de islote-2 (IA-2) han demostrado ser marcadores de la autoinmunidad del islote pancreático que precede al desarrollo clínico de la DT1 (Li et al, 2014).

Otras líneas de investigación sugieren que una desregulación en el control de timocitos autorreactivos que reconocen péptidos propios permite la salida a la periferia de células T autorreactivas. En un estudio reciente se encontraron dos tipos de células T que reaccionaban a la insulina en sangre periférica de ratones NOD: el primer tipo se describió como células T convencionales, es decir que reconocían a la molécula de la insulina mediante su presentación por una APC; mientras el segundo tipo (que correspondía al 99% de la población total de linfocitos T reactivos a la insulina) presentaba un comportamiento no convencional ya que, aunque no reaccionaba a la molécula de la insulina, era capaz de reconocer al péptido B-9:23 de manera soluble sin una APC intermediaria, lo que indica que estos linfocitos podrían ser resistentes a la selección negativa en el timo durante el desarrollo (Mohan et al, 2011). De manera similar, se han descrito células T CD4+ autorreactivas a insulina en pacientes con DT1 y, aunque no se ha identificado certeramente que factores favorecen esto, hay evidencia que sugiere que timocitos insulino-reactivos de alta avidéz pueden evadir la tolerancia central en tales pacientes (Santamaria, 2010).

En el estudio de la DT1, el equilibrio entre las células T cooperadoras 1 (Th1) y T cooperadoras 2 (Th2) también ha jugado un papel importante, ya que se ha visto

que las citocinas producidas por células Th1 (responsables de la inmunidad celular) exacerbaban la DT1, ya que dirigen la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas mediante la producción de interferón gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2), mientras que las citocinas producidas por células Th2 (inmunidad humoral) protegen contra esta enfermedad al inhibir algunas funciones de los macrófagos mediante secreción de IL-4 (Li et al, 2014). Esta tendencia natural a la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1 o Th2 se ha inferido mediante la observación *in vivo* de que las citocinas producidas por células Th2 inhiben la inducción de una respuesta Th1, y viceversa (Muraille y Leo, 1997).

Las células T reguladoras (Treg) también juegan un rol indispensable en la supresión de respuestas inmunes exacerbadas mediante mecanismos dependientes de contacto celular, así como la secreción de citocinas como TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-35. Reportes recientes sugieren que en el desarrollo de la DT1 no existe una falta de células Treg, sino un aumento de células T autorreactivas que son resistentes a los mecanismos de las células Treg (Marek-Trzonkowska et al, 2013).

Igualmente, las células CD8+ se han relacionado con la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas, ya que tienen la capacidad de reconocer péptidos derivados de células  $\beta$  presentados por el MHC tipo I, con lo cual son activadas y diferenciadas a células T citotóxicas. Se asume que las células  $\beta$  pancreáticas, al expresar MHC tipo I, pueden actuar como células presentadoras de algunos autoantígenos y contribuir así a la citotoxicidad mediada por las células T CD8+ (Li et al, 2014). Por ejemplo, se han encontrado, en ratones NOD de tres semanas de edad, poblaciones de células CD8+ que reconocen al péptido B:15-23 derivado de la insulina (Santamaria, 2010). Así, los factores clave que llevan a la muerte celular mediada por dicho mecanismo son las moléculas secretadas por los linfocitos T CD8+, tales como perforinas, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , al igual que interacciones Fas-FasL y síntesis de óxido nítrico (Coppieters et al, 2012).

Por otra parte, los linfocitos B también pueden promover la autoinmunidad a través de diversos mecanismos como la producción de autoanticuerpos, la presentación de antígenos propios que genera una respuesta de células T

autorreactivas o contribuyendo al mantenimiento de células T de memoria (O'Neill et al, 2009). Respecto al primero, diversos estudios muestran que los anticuerpos contra componentes propios, como la insulina, GAD, IA-2 y anticuerpos contra células del islote pancreático están presentes en pacientes pre-diabéticos y sus niveles van aumentando conforme progresa la enfermedad, así que se dice que estos son buenos marcadores para la progresión de la enfermedad (Li et al, 2014; Wong et al, 2004). Por otro lado, su papel como APCs se debe a que continuamente están presentado autoantígenos en su MHC-II a las células T, las cuales se activan y secretan citocinas que promueven a las células B para que se diferencien en células plasmáticas productoras de autoanticuerpos, con lo cual también se producen células B de memoria que continuarán interactuando con los autoantígenos y activando a las células T autorreactivas, lo cual crea una memoria inmunológica clave en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad (Li et al, 2014).

En adición, otras células de la respuesta inmune tales como las células natural killer (NK), células dendríticas (DCs) y los macrófagos también juegan un papel importante en el desarrollo de la DT1. Las NK están directamente involucradas con la eliminación de células blanco que son reconocidas por receptores expresados en la superficie de las células NK, en particular se ha identificado al receptor NKp46 que reconoce ligandos tanto en células  $\beta$  de humanos como de ratón, llevando a la degranulación de las NK (Li et al, 2014). Se han observado infiltrados de células NK en islotes de ratones NOD, y se sabe que la inflamación es primordialmente mediada por estas células (Rodacki et al, 2007). Igualmente, el incremento en la acumulación de DCs junto con macrófagos en los infiltrados de islotes pancreáticos durante etapas tempranas de la DT1 sugieren un papel importante de estas células en el inicio de la enfermedad. Ambos tipos celulares son responsables de la presentación de antígenos derivados de células beta hacia las células T, ya que poseen en sus membranas moléculas del MHC tipo II. Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que el rol patogénico de los macrófagos recae en la producción de las citocinas pro inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Diana et al, 2011).

## Modelos animales en el estudio de la DT1

En el estudio de la DT1 se han utilizado diversos modelos murinos, como el uso de ratones NOD (ratones knock-out que desarrollan diabetes de manera espontánea), ratones tratados con virus (como el *Meningovirus* o el *Reovirus*) o con agentes químicos, como la streptozotocina (STZ) (Arias-Díaz y Balibrea, 2007; Hernandorena et al, 2001).

La STZ es una molécula sintetizada por *Streptomyces achromogenes*. Se administra de 2 formas: en una dosis alta única (150 mg/kg) por la vía intravenosa o intraperitoneal, que causan la muerte de las células  $\beta$  del páncreas dentro de las primeras 24 horas, o mediante dosis bajas (50mg/kg) diarias durante 5 o 6 días, con lo cual se desarrolla un síndrome en el que aparece insulinitis (Espinoza-Jiménez et al, 2010; Hernandorena et al, 2001). Ya que posee una estructura similar a la glucosa (Figura 1), la STZ se interna en las células  $\beta$  pancreáticas mediante los transportadores GLUT2 (estos transportadores abundan en la membrana de las células  $\beta$ , por lo cual son su blanco principal). Su acción intracelular provoca alquilación del ADN; además, al ser un donador de óxido nítrico (NO) desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno que dañan al ADN y finalmente provoca la muerte celular (Szkudelski, 2001).

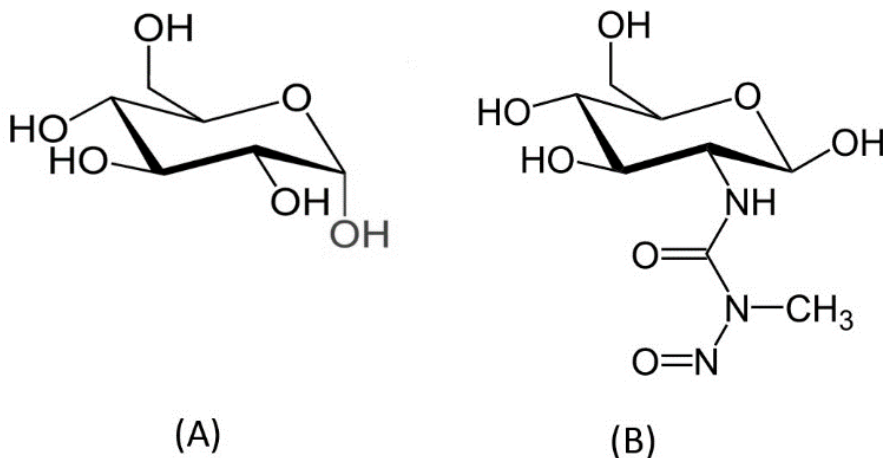


Figura 1. Estructura de la molécula de glucosa (A) y de la STZ (B).



Principalmente se emplean dos cuadros de dosificación distintos para la inducción de diabetes. El primero consiste en una única dosis alta (70-250mg/kg) que provoca de manera rápida e irreversible la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas. La segunda forma consiste en administración de dosis bajas consecutivas (30-50mg/kg durante 5 días), lo que provoca una reacción inmune e inflamatoria, relacionada con la liberación de autoantígenos como GAD, IA-2 e insulina (Graham et al, 2011).

### **La hipótesis de la higiene**

La hipótesis de la higiene nace como un concepto unificado que toma su estructura de diversas observaciones y estudios, y provee un razonamiento que sugiere que la coevolución humana con la de los patógenos ha contribuido al ordenamiento y organización de la estructura de nuestro sistema inmunitario tal y como la conocemos hoy en día. Por lo tanto, las actuales medidas de sanidad en comida y agua, junto a un elevado control de infecciones como lo son las vacunas y los antibióticos, han removido mecanismos inmunoreguladores de los cuales depende el equilibrio de nuestro sistema inmune (Bloomfield et al, 2006; Zaccane y Hall, 2012).

Greenwood, en 1968, observó una relación inversa entre infecciones parasitarias y enfermedades autoinmunes en un estudio que mostraba una baja incidencia de artritis reumatoide en el este de África, para después demostrar que ratones infectados con malaria estaban protegidos contra enfermedades autoinmunes (Greenwood, 1968). Un par de décadas más tarde, Strachan (1989) descubrió que la exposición de niños con un historial familiar de alergia al heno, a agentes patógenos propios de la edad los protegía de desarrollar la enfermedad (Strachan, 1989). Por aquella época nace también el paradigma de las respuestas “opuestas” Th1 y Th2 como importantes ramas del sistema inmune. En un inicio, se interpretó este hallazgo como una respuesta Th1 promovida por infecciones virales y bacterianas que “educaba” al sistema inmune contra las exacerbadas respuestas alérgicas asociadas a un mecanismo Th2 (Maizels et al, 2014). En la actualidad se

tiene una nueva perspectiva de la hipótesis de la higiene, y con los avances de la ciencia y estudios recientes se ha modificado esta relación entre los mecanismos Th1 y Th2.

La habilidad de diversos agentes infecciosos para regular el sistema inmune del hospedero resulta un campo interesante. Entre una amplia variedad de patógenos, los helmintos, que son organismos multicelulares complejos que muestran diferente morfología, estructura y ciclo de vida, se han adaptado y han desarrollado diversas estrategias que les permiten modular la respuesta inmunitaria del hospedero para evitar su expulsión, poder mantener infecciones de larga duración y facilitar su transmisión. La respuesta inicial de erradicar al parásito por parte del hospedero es invertida gradualmente, mediante la secreción de moléculas antiinflamatorias y el desarrollo de mecanismos reguladores inducidos por los helmintos (Zaccone y Hall 2012; Allen y Maizels, 2011). A pesar de que la respuesta inmune varía entre diferentes helmintos, es principalmente referida como tipo Th2. Además de la citocina principal de este tipo de respuesta, la IL-4, otras citocinas involucradas en la respuesta contra helmintos son IL-3, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 e IL-33, que conducen a una cascada de mecanismos efectores, incluyendo respuestas de células B, mastocitos, eosinófilos, basófilos, macrófagos alternativamente activados (MoAA) y aumento de la permeabilidad vascular, contractilidad del músculo liso y producción de moco en el intestino. Las citocinas pueden ser secretadas durante una infección con helmintos no solo por células CD4+ polarizadas hacia Th2, sino también por APCs, granulocitos o células linfoides innatas tipo 2 (ILC2). En adición, las células epiteliales también participan en la respuesta secretando principalmente IL-25 e IL-33 (Jackson et al, 2009; Shepherd et al, 2015; Zaccone y Hall 2012). En algunos casos, se ha encontrado que la respuesta inmune inducida por helmintos aminora o incluso alivia enfermedades inflamatorias crónicas. Por ejemplo, se ha investigado el uso de diferentes especies de helmintos para tratar o prevenir DT1, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino y asma en modelos murinos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ejemplos de helmintos que han demostrado inhibir patologías autoinmunes (Cooke, 2009).

Enfermedad autoinmune/inflamatoria	Agente
Diabetes tipo 1	<i>Schistosoma mansoni</i>
	<i>Trichinella spiralis</i>
	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>
Enfermedad de Graves	<i>Schistosoma mansoni</i>
Enfermedad inflamatoria intestinal	<i>Trichinella spiralis</i>
	<i>Schistosoma mansoni</i>
	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>
	<i>Hymenolepis diminuta</i>
Enfermedad de Crohn	<i>Trichurus suis</i>

La potente inducción de una respuesta Th2 y Treg asociada con la inmunidad contra helmintos provee de un punto inicial para investigar la exposición a estos parásitos para modular el curso de la DT1 en un modelo animal (Zaccone y Hall, 2012). Al ser una enfermedad mediada por una respuesta tipo Th1, se ha hipotetizado que la inclinación hacia una respuesta inmune tipo Th2 actúa como regulador e inclusive supresor de la respuesta Th1 en la DT1. La infección con los helmintos *Trichinella spiralis*, *Heligmosomoides polygyrus* y *Litomosoides sigmodontis* ha demostrado tener un efecto preventivo y protector en un modelo de DT1 utilizando ratones diabéticos no obesos (NOD) (Zaccone y Hall, 2012). Las propiedades inmunomoduladoras de los helmintos se atribuyen en gran medida a los productos de excreción-secreción (ES) que liberan al estar dentro de sus huéspedes. Estos productos ES consisten en una mezcla compleja de moléculas de diversa naturaleza y que desarrollan diversas funciones. Así pues, el tratamiento con algunos productos ES, como los antígenos solubles de larva de *Schistosoma mansoni* o los antígenos de *Litomosoides sigmodontis* han demostrado tener el mismo efecto protector sobre el desarrollo de la DT1 (Zaccone y Hall, 2012).

## ***Hymenolepis nana***

*Hymenolepis nana* es un cestodo del filo de los *Platyhelminthes*, que infecta a roedores y humanos, principalmente se encuentra en niños pequeños. Mide de 2 a 4 cm de largo, por lo que comúnmente se le denomina “tenia enana”. Su ciclo de vida (Figura 2) inicia cuando el hospedero (ser humano o roedor) ingiere los huevos de *H. nana* en alimentos o bebidas contaminadas, estos eclosionan y liberan las oncosferas que penetran en la lámina propia del intestino y se desarrollan las larvas cisticercoides, las cuales salen a la luz intestinal en aproximadamente 5 días y se fijan a la mucosa mediante el escólex. A medida que el gusano madura, los proglótidos terminales maduran y se separan, desintegrándose en el intestino y liberando huevos que son inmediatamente infectivos, lo que puede dar lugar a autoinfecciones. Estos huevos también pueden ser excretados en la materia fecal y pueden sobrevivir en el medio ambiente hasta por dos semanas. Ocasionalmente se puede adquirir la infección de manera indirecta a través de la ingesta accidental de artrópodos que pueden encontrarse en granos o cereales, y que se infectan y desarrollan los cisticercoides de *H. nana* (Thompson, 2015; Ito, 2015).

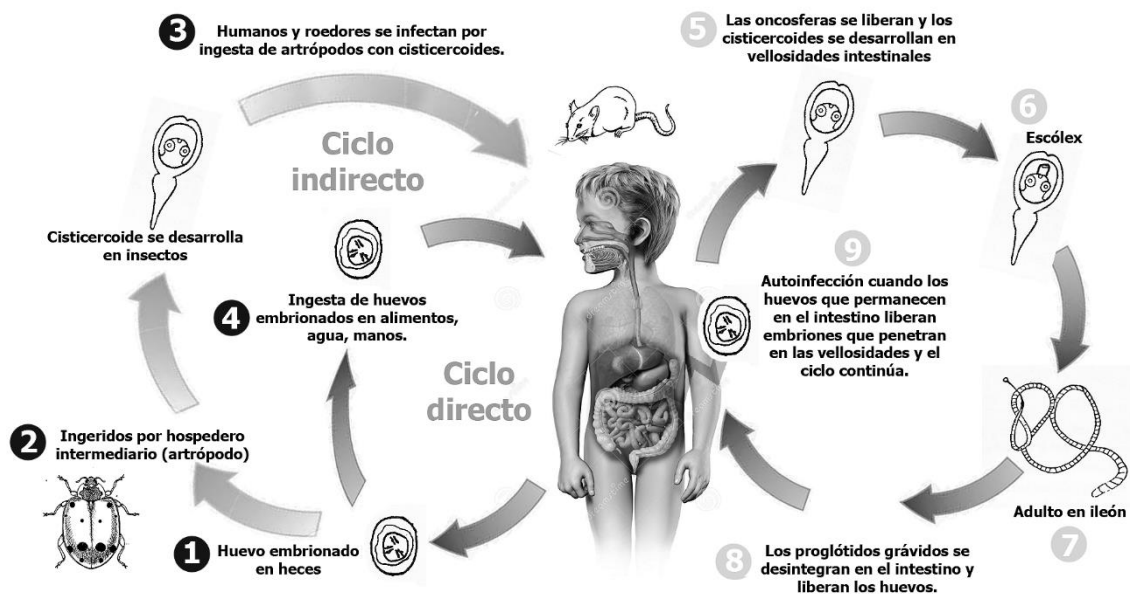


Figura 2. Ciclo de vida de *Hymenolepis nana* (Imagen modificada de Centers for Disease Control & Prevention).

*H. nana* es el principal agente causal de hymenolepiasis en el mundo; se estima que 75 millones de personas están infectadas con este parásito, y que la prevalencia en niños es de alrededor de un 75%. Su principal prevalencia es en poblaciones que viven en climas subtropicales caracterizados por falta de medidas sanitarias y pobreza (Alvarez-Fernandez et al, 2012; Muehlenbachs, 2015).

Se ha reportado el uso de este género en el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias en modelos de animales. En 2011, Shi y colaboradores reportaron que la infección con *H. diminuta* reducía considerablemente los síntomas de la artritis inducida por adyuvante completo de Freud en un modelo murino, y notaron la presencia importante de la IL-10, a la cual refirieron como la interleucina más importante en este mecanismo (Shi et al, 2011).

Sin embargo, el uso específico de *H. nana* o sus productos de excreción-secreción (ES) en cuanto a su influencia en el desarrollo de enfermedades inflamatorias es nulo, por lo que este parásito abre la posibilidad de encontrar nuevas alternativas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

## Hipótesis

La administración de los productos de excreción-secreción (HnES) o del extracto crudo (HnEC) de *Hymenolepis nana* tendrá un efecto modulador en el desarrollo de la diabetes tipo I inducida por streptozotocina en un modelo murino al estimular una respuesta antiinflamatoria y aminorar la severidad de la enfermedad.

## Objetivo general

Determinar si la administración de los productos de excreción-secreción (HnES) o del extracto crudo (HnEC) de *Hymenolepis nana* aminora el desarrollo de diabetes tipo I inducida por streptozotocina (STZ).

## Objetivos particulares

1. Obtener los productos de excreción-secreción y el extracto crudo de *H. nana*.
2. Inducir la diabetes en ratones BALB/c mediante la administración de STZ.
3. Evaluar el desarrollo de diabetes tipo I tanto en presencia como ausencia de la administración de los productos HnES o del HnEC.
4. Identificar las subclases de anticuerpos producidos contra los productos HnES o el HnEC en los diferentes grupos experimentales inmunizados con dichos antígenos.
5. Determinar el perfil de citocinas producidas en la diabetes experimental tanto en el grupo tratado con los productos HnES o el HnEC como en el grupo que recibe STZ.
6. Comparar el daño histopatológico en páncreas entre los grupos experimentales.

## Materiales y métodos

### Animales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 7 a 8 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en el bioterio con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, en jaulas de acrílico con camas de astilla de madera estéril que se cambió cada tercer día; se les proporcionó agua y alimento balanceado *ad libitum*.

Los animales se dividieron al azar en cuatro grupos experimentales: grupo control, administración de streptozotocina (STZ), inoculados con los productos de excreción-secreción de *H. nana* (HnES) e inoculación con los productos ES de *H. nana* e inducción de diabetes con STZ (HnES+STZ). También se realizó un experimento utilizando extracto crudo de *H. nana* (HnEC), con cuatro grupos: control, STZ, HnEC y HnEC+STZ.

### Obtención de los productos de excreción-secreción de *H. nana* (HnES)

Ratones BALB/c infectados previamente con *H. nana* se sacrificaron mediante sobredosis de sevoflurano (Svofast, Baxter) a los 21 días post infección. Se extrajo el intestino delgado, se abrió longitudinalmente y se colectaron los parásitos adultos. Se lavaron con buffer salino de fosfatos (PBS, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM/Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM/NaCl 0.15M, pH 7.4) y se cultivaron en medio DMEM adicionado con antibiótico-antimicótico (Anti-Anti100x, Gibco), a 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Se realizaron cambios con medio fresco a las 24 horas. Una vez concluido el tiempo de cultivo (48 horas), el medio con los productos ES se colectó y se le agregó inhibidores de proteasas (Complete, Roche), se centrifugó primero a 3500rpm/20min/4°C (Thermo Sorvall ST16R) y después a 10000rpm/25min/4°C. Se realizó la concentración de proteínas mediante centrifugación en tubos con membranas de 15kDa (Amicon Ultra-15) a 6755rpm/30min/4°C. Se dializó el concentrado de proteínas contra PBS, cambiando esta solución cada 12 horas. El dializado se colectó y se guardó en alícuotas a -70°C hasta su uso posterior.

### **Obtención del extracto crudo de *H. nana* (HnEC)**

Se obtuvieron *H. nana* adultas de la misma manera como se indicó en el punto anterior. Después del tiempo de cultivo, se colectaron y se maceraron con ayuda de un pistilo de plástico dentro de un tubo cónico de 1.5mL, en un baño de hielo. Posteriormente se agregaron 3mL de solución A (buffer de fosfatos 6.7mM con 0.04M KCl y 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) y se procesaron en un sonicador (Omni-ruptor 250, Fisher Scientific) a una pulsación del 20%, dando tres ciclos de 3 minutos con intervalo de un minuto entre cada ciclo. Después, el homogenizado se centrifugó a 3500rpm/30min/4°C, se colectó el sobrenadante, se le agregó inhibidores de proteasas y se guardó a -70°C para su uso posterior.

### **Cuantificación de proteínas de los productos antigénicos**

Se realizó una curva estándar de Albumina Sérica Bovina (BSA) en PBS, con las siguientes concentraciones: 0, 100, 200, 300, 400 y 500µg/mL. En una microplaca (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp Surface) se colocaron 10µL de cada uno de los puntos de la curva estándar y de las muestras (productos HnES y el HnEC) por duplicado. Se agregaron 200µL/pozo de reactivo de Bradford diluido 1:4 con agua destilada, de acuerdo con el instructivo del proveedor (Protein Assay, Bio-Rad) y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación. La lectura se realizó a 570nm de longitud de onda utilizando un lector de microplaca (iMark, BioRad).

### **Análisis de los productos antigénicos**

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12% para el corrimiento de las muestras. Para la preparación de las muestras, se agregó el volumen de muestra correspondiente a 20µg de proteína más un volumen igual de buffer de corrida (Biorad) en un tubo cónico de 0.6mL, se calentó en termobloque (Digital Dry Bath, Labnet) a 96°C/15min y se colocó en el pozo del gel correspondiente. Las muestras se dejaron correr en una cámara de electroforesis (BioRad) con buffer de corrida



(Tris 0.05M/Glicina 0.38M/SDS 0.1%) a 100V durante 2 horas aproximadamente. Al finalizar, el gel se retiró de la cámara y se tiñó con azul de coomasie durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron lavados de 15 minutos con solución desteñidora (CH<sub>3</sub>OH 40%/CH<sub>3</sub>COOH 10%) hasta que se apreciaron claramente las bandas de proteína.

### **Evaluación de la concentración de endotoxinas en los productos antigénicos**

Se hizo el ensayo LAL (Limulus amebocyte lysate) mediante el método de microplaca de acuerdo con el instructivo del comerciante (Lonza, Pharma&Biotech). Se preparó la curva estándar de endotoxina con las concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.1 UE/mL. Posteriormente se colocaron 50µL de cada punto de la curva estándar, así como de las muestras por duplicado. Se añadieron 50µL/pozo del reactivo LAL y se dejó durante 10 minutos, después se añadieron 100µL/pozo de solución sustrato y se dejó incubar durante 6 minutos más. Finalmente, la reacción se detuvo añadiendo 100µL/pozo de una solución 25%v/v de ácido acético. Los valores de absorbencia se leyeron a 415nm en el lector de microplaca.

### **Administración de los productos antigénicos**

Previo a la administración de los productos antigénicos, a todos los animales de los grupos experimentales se les tomó una muestra de sangre mediante un pequeño corte en la punta de la cola, para la posterior medición de algunos parámetros basales. En el experimento con HnES, a los grupos correspondientes (HnES+STZ y HnES) se les administró 50µg de los productos ES vía intraperitoneal semanalmente, durante cuatro semanas. Para la administración del HnEC, a los grupos HnEC+STZ y HnEC se les administró 70µg del EC vía intraperitoneal semanalmente, durante cuatro semanas.

## **Inducción de diabetes con STZ**

Siete días después de la última administración de los productos HnES o del HnEC, a todos los grupos experimentales se les realizó una medición de glucosa en sangre para determinar los valores basales de glucosa, así como el peso. A los grupos de ratones experimentales y grupo STZ se les administró una dosis diaria de 50mg/kg de STZ (Sigma) disuelta en buffer de citratos ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0.1M/ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  0.1M, pH 4.5) por vía intraperitoneal durante cinco días consecutivos.

## **Evaluación de la inducción de diabetes experimental**

Siete días después de la última administración de STZ, se realizó la medición de glucosa en sangre en los ratones con cinco horas de ayuno, con ayuda de un glucómetro comercial (Accu-check, Roche) tomando una gota de sangre de la cola del animal. También se tomó el peso de los animales. Esto se hizo semanalmente, durante tres semanas consecutivas. Los animales se consideraron como diabéticos cuando sus niveles de glucosa fueron superiores a 200mg/dL (Amdare et al, 2014).

## **Necropsia y obtención de muestras**

Un día después de la última medición de glucosa, los animales se sacrificaron mediante sobredosis de sevoflurano y se tomó muestra de sangre, se extrajo el bazo, páncreas e intestino delgado de cada animal.

La sangre obtenida de cada animal se colocó en tubos cónicos de 1.5 mL que se dejaron incubando durante 30 minutos a 37°C y después se centrifugaron a 2000rpm/10min/4°C. Se colectó el suero y se almacenó a -70°C hasta su uso posterior.

El intestino delgado de cada ratón se colocó en una caja de Petri, se introdujo una cánula corta en uno de los extremos y se llenó con 4mL de PBS, esto con la finalidad de remover el contenido intestinal, y después se cortó en fragmentos de 0.5cm con ayuda de tijeras de disección. El tejido macerado junto con el contenido

intestinal se colocó en un tubo de 15mL, se le agregó inhibidores de proteasas y se puso en agitación en frío durante 20 minutos. Después se centrifugó a 3500rpm/20min/4°C y se colectó el sobrenadante, el cual se guardó en alícuotas a -70°C hasta el momento de su uso.

El páncreas de cada animal, después de su extracción, se colocó en un tubo de 15mL con solución de formalina bufferada (PBS y formol al 10%) durante 24 horas para su posterior tratamiento para la obtención de cortes histológicos para el análisis microscópico

### **Cultivo de células de bazo**

El bazo se lavó con PBS, se colocó en una caja Petri estéril y se mantuvo en refrigeración hasta su uso posterior. Los bazos de los roedores se colectaron por grupo experimental y se pusieron en DMEM adicionado con antibiótico-antimicótico, se maceraron con ayuda de un émbolo estéril y malla de nylon. El filtrado se colocó en tubos de 15mL y se pasó por un gradiente de densidad (Lymphoprep, Axis-Shield) centrifugando a 1200rpm/40min/25°C. Se colectó la interface rica en linfocitos, se le añadieron 5mL de DMEM y se centrifugó a 1500rpm/15min/4°C; esto se realizó tres veces realizando cambios de medio, con el fin de lavar las células. Después, las células se resuspendieron en DMEM adicionado con antibiótico-antimicótico y 10% de suero fetal bovino. Las células viables se cuantificaron en cámara de Neubauer con azul tripano. En placas de 24 pozos (Corning) se sembraron  $1 \times 10^6$  células por pozo, se dejaron en incubación a 37°C/5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas, después se les adicionó un estímulo con 10, 20 y 30µg de HnEC, o 10µg de Concanavalina A (ConA) y se dejó un pozo sin estímulo como control. Se dejaron nuevamente en incubación durante tres días. Pasado este tiempo, se recolectó el sobrenadante, se centrifugó a 1500rpm/10min/4°C y se guardó en refrigeración a -70°C para su uso posterior.

### **Determinación de anticuerpos contra *H. nana***

Se realizó la determinación de anticuerpos IgG totales, así como de las subclases IgG1 e IgG2a en los sueros obtenidos de ratones, mediante ELISA. Se utilizaron placas de 96 pozos (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp Surface), recubiertas con 100µL por pozo de HnEC (10µg/mL) en buffer de carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.03M/ $\text{NHCO}_3$  0.07M, pH 9.6). Las placas se bloquearon con 200µL/pozo de solución de Block comercial (Blocking Reagent for ELISA, Roche) y se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se agregaron 100µL/pozo de los sueros diluidos 1:200 en PBS con Tween 20 al 0.1% (Sigma). Para la determinación de IgG total el tiempo de incubación con los sueros fue de 1 hora, mientras que para IgG1 e IgG2a fueron 24 horas a 4°C. Se utilizaron anticuerpos anti-ratón IgG acoplados a peroxidasa (Invitrogen) en una dilución 1:2000 para la determinación de IgG total, y para la detección de las subclases IgG1 e IgG2a se utilizaron anticuerpos anti-ratón IgG1 y anti-ratón IgG2a una concentración de 20µg/mL (AffiniPure Goat, Jackson ImmunoResearch), seguido de un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (HRP-Rabbit AntiGoat IgG) diluido 1:2000 (Invitrogen). Cada uno de estos anticuerpos se incubó por una hora a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS con Tween al 0.1% después de cada incubación. El revelado de las placas se hizo con el sistema sustrato/cromógeno comercial  $\text{H}_2\text{O}_2$ /OPD (SigmaFast) y la reacción se detuvo con 50µL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. La lectura de las placas se realizó a 490nm de longitud de onda en lector de microplaca.

### **Cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo de células de bazo y en lavados intestinales**

Para la cuantificación de citocinas en lavados intestinales, primero éstos se centrifugaron a 10000rpm/10min/4°C y se realizó la cuantificación de proteínas mediante ensayo de Bradford, para ajustar la concentración de proteínas de cada muestra a 7 mg/mL, utilizando PBS como diluyente. Se determinaron las citocinas IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  mediante kits comerciales de ELISA (BD, Bioscience). Para esto se recubrieron placas de 96 pozos con 100µL/pozo de anticuerpo de

captura diluido 1:250 en buffer de carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.03M/ $\text{NHCO}_3$  0.07M, pH 9.5) y se dejaron en incubación toda la noche a 4 C. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 0.05% y se agregaron 200 $\mu\text{L}$ /pozo de solución bloqueadora y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se realizaron 5 lavados más y se agregaron 100 $\mu\text{L}$ /pozo de las soluciones estándar y de las muestras problema, y se incubaron durante 24 horas a 4°C. Después se realizaron cinco lavados y se adicionaron 100 $\mu\text{L}$ /pozo de una dilución 1:250 del anticuerpo de detección biotinilado y del amplificador de la reacción, la estreptavidina peroxidasa diluido 1:250, se dejó incubando 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 7 veces y se agregó 100 $\mu\text{L}$ /pozo del sustrato/cromógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ /TMB, dejándose incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se adicionaron 50 $\mu\text{L}$ /pozo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y la lectura de las placas se realizó a 450nm con corrección de absorbencia a 570nm de longitud de onda en lector de microplaca.

## **Histología**

Después de dejar las muestras de páncreas en una solución de formalina amortiguada durante 24 horas, se lavaron con agua y se pasaron por diferentes soluciones de etanol de concentración ascendente, empezando desde el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y absoluto, dejando reposar el tejido durante 1 hora en cada solución, y después se colocó en xileno durante 20 minutos. Se realizó la inclusión en parafina y se realizaron cortes de 2 $\mu\text{m}$ , los cuales se montaron en un portaobjetos, se desparafinaron con xilol y el tejido se rehidrató con un tren de soluciones de etanol en concentraciones descendentes (señaladas en el tren de deshidratación). Las muestras se tiñeron con hematoxilina y con eosina como colorante de contraste. Finalmente, la preparación se pasó por xilol y se montó con resina para su observación y evaluación bajo el microscopio óptico (Olympus). El grado de insulitis observado en los cortes de páncreas de los ratones en los diferentes grupos experimentales se cuantificó al observar al menos 10 campos con islotes presentes y se calificó en una escala del 0 al 3, donde el 0 corresponde a

islotes normales sin infiltrado de células mononucleares; peri-insulitis o grado 1, cuando se observaron linfocitos alrededor del islote pancreático; insulitis grado 2, cuando <50% del islote mostraron linfocitos; e insulitis grado 3, cuando más del 50% de los islotes estaba infiltrado (Espinoza-Jiménez et al, 2010; Sanches-Peres et al, 2013).

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se hizo con el programa GraphPad Prism 6. Los valores se muestran como media más desviación estándar. Los datos se compararon mediante ANOVA de dos vías con prueba de Tukey como prueba post hoc para comparación entre grupos a diferentes tiempos; prueba de Dunn para la comparación de datos pre y post de un mismo grupo y Kruskal-Wallis para comparación de grupos con una sola muestra. El nivel de significancia estadística fue  $p < 0.05$ .

## Resultados

### **Obtención de los productos de excreción-secreción (HnES) y del extracto crudo (HnEC) de *Hymenolepis nana***

Uno de los primeros retos durante la parte experimental fue la obtención de los productos HnES; en un principio se inoculó a los animales directamente con el sobrenadante del cultivo de las *Hymenolepis* adultas; así mismo los respectivos grupos control recibieron un volumen equitativo de medio de cultivo, ya que este era el vehículo de administración de los productos HnES. El único tratamiento que se le dio al sobrenadante fue la centrifugación a 2800rpm/min/4°C y su posterior filtración con membranas de 0.22µm.

Al encontrar que el medio de cultivo podría influir en el desarrollo de la diabetes en el modelo murino con streptozotocina (STZ) se buscó la forma de aislar los productos HnES y administrarlos junto con un vehículo que no interfiriera de manera significativa con los resultados, optando por realizar un dializado con PBS. Para esto, se procesaron de manera simultánea 8 colectas de sobrenadante que se habían mantenido en congelación a -70°C. El volumen inicial fue de 150mL y se concentró mediante centrifugación en tubos con membranas de 15kDa hasta obtener un volumen final de 5mL, el cual se dializó contra PBS durante 24 horas. Para asegurar que los productos HnES no se habían perdido durante el procedimiento, se realizó un análisis electroforético en gel de poliacrilamida de los productos HnES en condiciones reductoras antes y después del dializado, los cuales se muestran en la figura 3a. En ambos casos se observó una gran similitud en cuanto a las bandas obtenidas tanto antes como después del dializado; se detectaron bandas en los pesos de 100, 75, 50, 43, 41, 21 y algunas menores de 20kDa. Una banda ancha de 75kDa es la que más sobresale en ambas muestras.

De manera alternativa, se obtuvo el HnEC por medio de la maceración de los parásitos, y este se comparó con los HnES. Se observa en el análisis electroforético que ambos productos antigénicos tienen gran similitud. Para el caso del HnEC se detectaron bandas correspondientes a los siguientes pesos moleculares: 100, 85, 75, 50, 43, 41, 31, 22 y algunas bandas menores de 20kDa. Así mismo, la banda

más intensa se observó a los 75kDa (Figura 3b) Ambas muestras comparten las bandas de pesos de 100, 75, 50, 43 y 41 kDa. Obsérvese también que en carril de los productos HnES se aprecia una banda un poco más abajo de la banda ancha de 75kDa, misma que no se observa en el HnEC (Figura 3b).

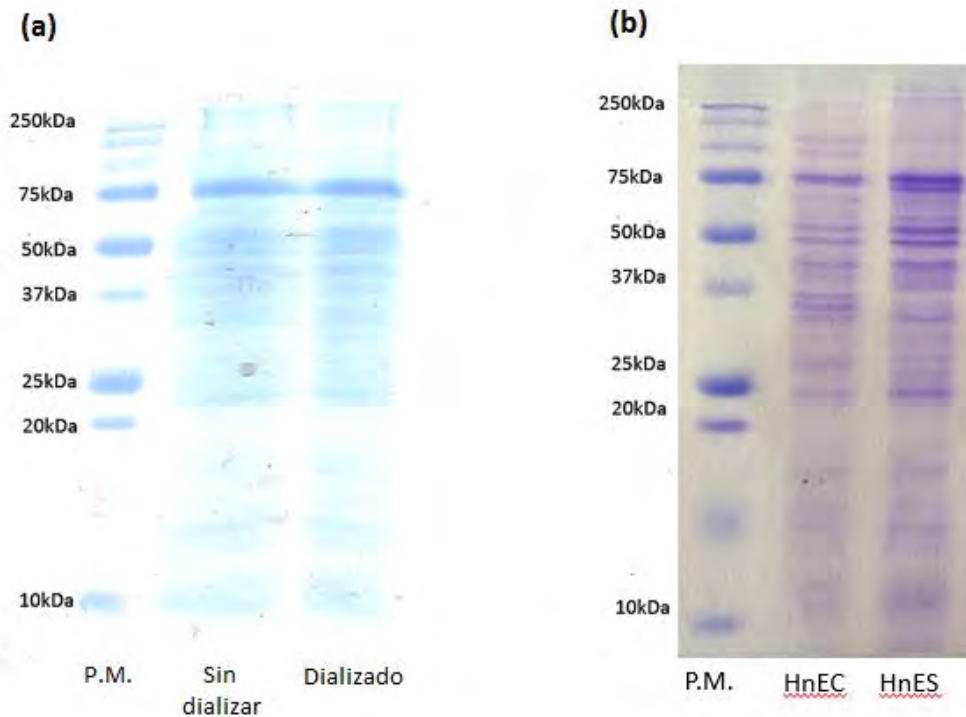


Figura 3. Análisis electroforético de los productos antigénicos de *Hymenolepis nana*. (a) Comparación de los productos HnES antes y después de realizar el dializado en PBS; en el primer carril se muestran los pesos moleculares, en el segundo carril la muestra antes de realizar el dializado y en el tercer carril una muestra después de dializar. (b) Comparación del HnEC y de los productos HnES; los pesos moleculares se muestran en el primer carril, y en los dos siguientes carriles el HnEC y los HnES. Las tinciones de los geles de esta figura se hicieron con azul de coomasie.

### **Determinación de endotoxinas en los productos antigénicos de *H. nana***

Una vez obtenidos los productos HnES y el HnEC, se procedió a cuantificar la cantidad de endotoxinas presentes en cada una de las muestras mediante un ensayo comercial de LAL (Lymulus Amebocyte Lysate). El resultado de la prueba



arrojó que la concentración de endotoxinas en los productos HnES fue de 0.31 UE/mL y para el HnEC fue de 0.37 UE/mL.

### **Evaluación de la diabetes tipo I inducida por STZ**

Para la evaluación del progreso de la enfermedad en ratones tratados y no tratados con los productos HnES y con el HnEC, se registró el peso y se realizó la toma de glucosa sanguínea antes del tratamiento y semanalmente durante tres semanas consecutivas después de la inducción de diabetes en los grupos correspondientes, determinando el porcentaje de pérdida o ganancia de peso de cada grupo (Figura 4). En el experimento donde los animales se trataron con los productos HnES se observó como el grupo al que solo se le administró la STZ bajó de peso significativamente con respecto al grupo control: vimos como a partir de los 14 días después de la inducción de diabetes, el grupo con STZ comienza a bajar de peso de manera significativa ( $p < 0.05$ ) hasta el final del experimento, a los 28 post STZ la pérdida de peso es bastante considerable, ya que pierden cerca del 15%. En cambio, se observó que los demás grupos no muestran una variación de peso; los ratones del grupo al que se le administraron los productos HnES previo a la inducción de diabetes se mantuvieron con un peso constante y no presentaron una variación significativa a lo largo del experimento con respecto al grupo control (Figura 4a).

En el caso del experimento con el HnEC (Figura 4b), se observó que el grupo al que solo se le indujo diabetes registró una disminución de peso a los 14 días post STZ, y se mantuvo por debajo de los demás grupos durante todo del experimento. En contraste, el grupo que se inoculó con el HnEC y se le indujo diabetes presentó una ligera ganancia y mantiene un peso estable, al igual que los demás grupos, que tampoco presentaron variaciones a lo largo del experimento. No se registraron diferencias estadísticamente significativas en este caso.

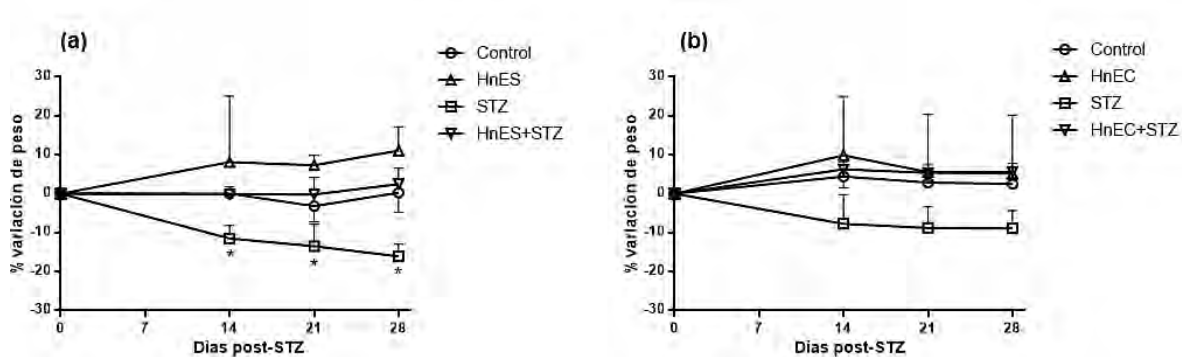


Figura 4. Variación de peso en los diferentes grupos experimentales. (a) Experimento donde se inmunizaron los animales con los productos HnES y (b) donde se empleó el HnEC. Se graficó el promedio de cada grupo con su desviación estándar y se realizó un ANOVA de dos vías y prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas respecto al grupo control (\* $p < 0.05$ ).

Para el caso de los niveles de glucosa en sangre, la muestra se tomó después de que los ratones fueran sometidos a un ayuno de cinco horas, y los animales se consideraron diabéticos cuando los valores de glucosa fueron arriba de 200mg/dL. En el experimento con los HnES (Figura 5a), se observó que tanto el grupo tratado solo con STZ y el grupo HnES+STZ presentó un aumento en los niveles de glucosa sanguínea con respecto al grupo control. A los 14 días después de la inducción de diabetes se observó que este aumento es mayor en el grupo tratado sólo con STZ, que alcanza un valor promedio de 350mg/dL, mientras que el grupo HnES+STZ se mantuvo cerca de los 250mg/dL. A los 21 días los valores del grupo STZ llegan cerca de los 370mg/dL y los del grupo HnES+STZ aún se mantuvieron debajo, alcanzando los 300mg/dL. A los 28 días los niveles de glucosa en el grupo STZ bajaron un poco, cerca de los 350mg/dL mientras los del grupo HnES+STZ aumentaron casi igualando al grupo STZ.

En el experimento con el HnEC (Figura 5b) a los 14 días después de la administración de STZ se observó cómo los cuatro grupos experimentales se mantuvieron debajo de los 200mg/mL, aunque el grupo al que solo se le indujo diabetes registró valores alrededor de 175mg/dL, mientras que el grupo inmunizado previamente se mantuvo debajo, con valores cercanos a 150mg/dL. A los 21 días, el

promedio del grupo STZ fue superior a los 200mg/dL, mientras el grupo con el HnEC y STZ se mantuvo debajo de este nivel. A los 28 días se observa que los niveles de glucosa en el grupo de STZ aumentaron hasta alcanzar valores cercanos a 300mg/dL, en contraste con el grupo HnEC+STZ, cuyos valores disminuyeron hasta cerca de los 150mg/dL.

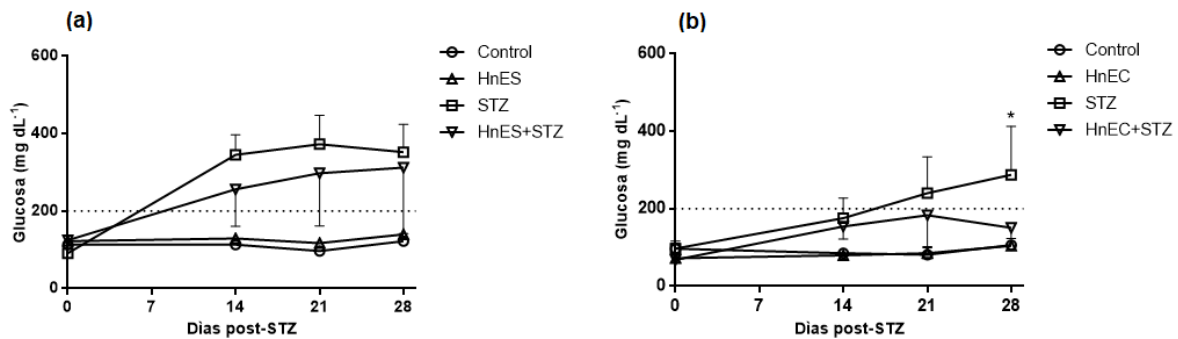


Figura 5. Niveles de glucosa sanguínea en animales tratados con los productos antigénicos de *H. nana* y sus respectivos grupos control. (a) Experimento con los HnES y (b) experimento con el HnEC. Los valores por encima de la línea punteada se consideran diabéticos. Se graficó el promedio con su desviación estándar y se realizó un ANOVA y prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en cada uno de los diferentes tiempos (Diferencias significativas \* $p < 0.05$  respecto al grupo HnEC+STZ).

### Evaluación de la respuesta inmune humoral

En el laboratorio ya se tenía estandarizado el ELISA para la detección de anticuerpos, por lo que se trabajó con las condiciones ya establecidas. Los resultados de la detección de anticuerpos IgG se muestran en la figura 6, se graficó el valor de la densidad óptica obtenida para cada ratón de los grupos experimentales, en muestras de suero obtenidas antes (pre) y después de la inmunización con los productos antigénicos (post). La inmunización de los ratones tanto con productos HnES (Figura 6a) como con HnEC (Figura 6b) indujo la síntesis de anticuerpos IgG. En las gráficas se observa un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los valores de absorbencia en los animales después de la inmunización con alguno de los productos antigénicos de *H. nana*; mientras los valores post de animales no inmunizados se mantienen prácticamente iguales con respecto a las muestras pre

(entre 0.5 y 0.7 aproximadamente). Los animales inmunizados alcanzan valores cerca de 1 en el experimento con los productos HnES y de 1.3 en animales inmunizados con el HnEC.

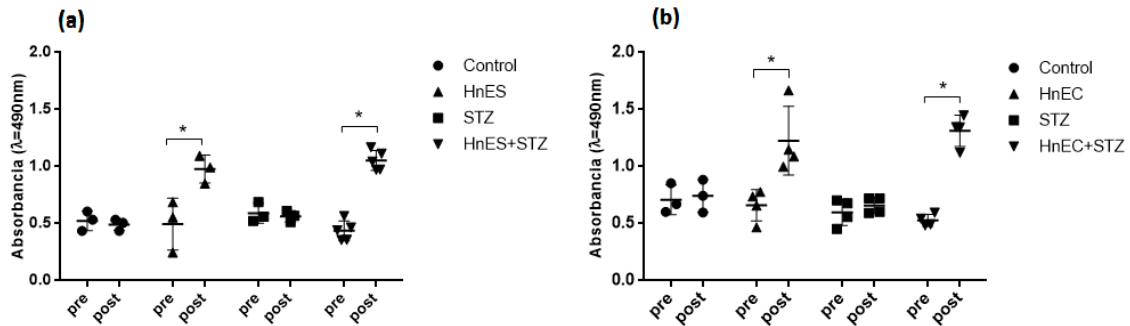


Figura 6. Determinación de anticuerpos IgG en suero de ratones inmunizados con (a) los productos HnES y (b) el HnEC, así como los respectivos grupos control. Cada punto corresponde a los valores obtenidos por ratón y la línea horizontal a la media con su desviación estándar. Diferencias significativas \* $p < 0.05$  con respecto a las muestras pre de cada grupo mediante prueba de Dunn.

También se realizaron los ELISAs para la detección de las subclases IgG1 e IgG2a, correspondientes a los experimentos con los productos HnES y el HnEC (Figura 7). En los ratones que fueron inmunizados con productos HnES se observó un aumento significativo en los anticuerpos IgG1 en los animales post-inmunización (Figura 7a,  $p < 0.05$ ) donde los valores de absorbancia fueron mayores a 1.5. También hubo incremento en los valores de densidad óptica en los anticuerpos IgG2a en los animales post-inmunización (Figura 7b) con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), aunque los niveles de anticuerpos fueron menores, ya que la densidad óptica no sobrepasó el valor de 0.7.

Algo similar se observó cuando los ratones fueron inmunizados con HnEC, donde hubo incremento en los valores de absorbancia de los grupos inmunizados respecto a las muestras pre. Se observó que la producción de IgG1 incrementó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en los animales inmunizados, con valores mayores a 2.5 (Figura 5c). Igualmente hubo un incremento en la producción de la subclase IgG2a,

cuyos valores de densidad óptica también aumentaron significativamente (Figura 5d,  $p < 0.05$ ), aunque estos niveles fueron más bajos que en el caso de IgG1 ya que los valores de absorbencia están cerca de 1.5.

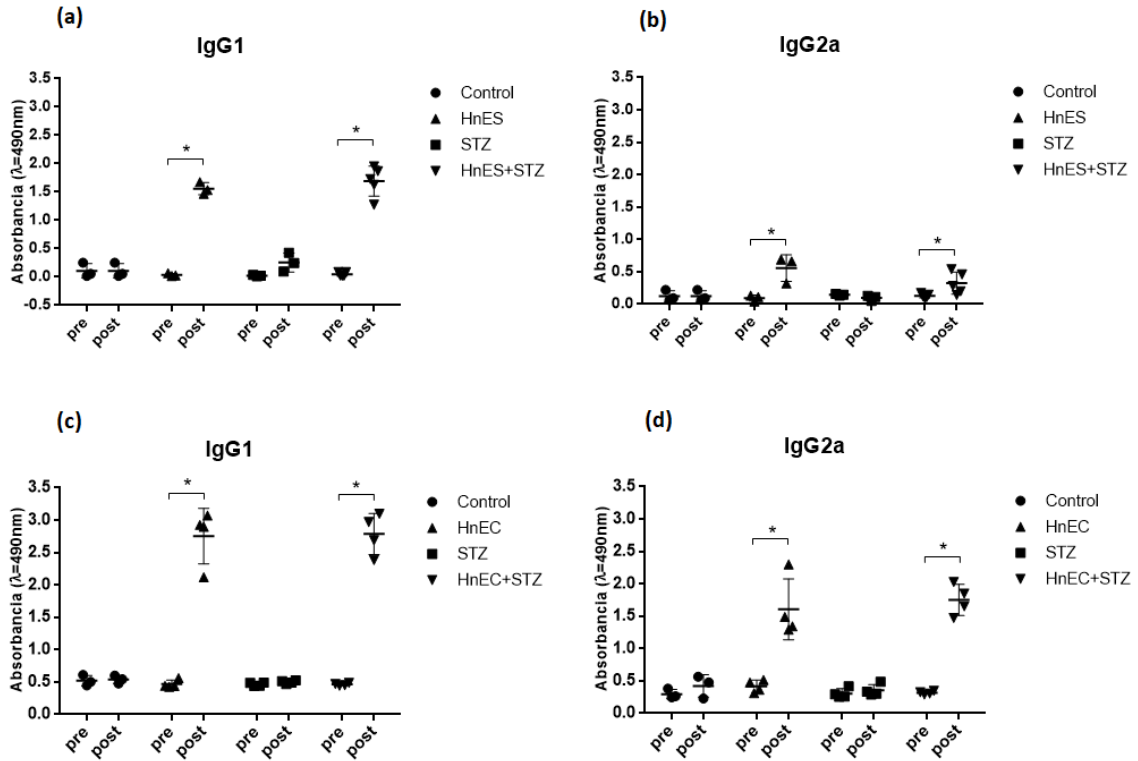


Figura 7. Determinación de las subclases de anticuerpos IgG en sueros de ratones inmunizados con los productos antigénicos de *H. nana*. Las dos primeras gráficas corresponden al experimento con los productos HnES (a) subclase IgG1 y (b) IgG2a. En el grafico (c) se presenta la subclase IgG1 y en (d) IgG2a del experimento con el HnEC. Cada punto corresponde a los valores obtenidos por ratón y la línea horizontal a la media con su desviación estándar. Diferencias significativas  $*p < 0.05$  con respecto a las muestras pre de cada grupo mediante prueba de Dunn.

### **Niveles de citocinas en cultivo de células de bazo y en lavados intestinales**

Para ambos experimentos, tanto con los productos HnES como con el HnEC se cuantificaron cuatro citocinas en lavados de intestino delgado: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4 por el método de ELISA. La cuantificación de las citocinas en el experimento con los productos HnES se presenta en la figura 8, donde se graficó la concentración de las diferentes citocinas por cada ratón de los grupos experimentales. Para el caso de IFN- $\gamma$  (Figura 8a) aunque no se tuvieron diferencias significativas, se observó una disminución en la producción de esta citocina en los grupos HnES y STZ, mientras que el grupo HnES+STZ se mantuvo similar al control. Para la citocina TNF- $\alpha$  (Figura 8b) se observó una disminución en la concentración de ésta en el grupo HnES con respecto al grupo control; de hecho, se registró una diferencia estadísticamente significativa entre estos dos grupos ( $p < 0.05$ ). Los grupos STZ y HnES+STZ se mantuvieron debajo del grupo control, con valores similares entre sí. Para IL-10 (Figura 8c) e IL-4 (Figura 8d) se observó que la concentración de estas citocinas en el grupo HnES+STZ se mantuvo igual al grupo control, mientras que los grupos HnES y STZ se vio disminuida la concentración de ambas. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

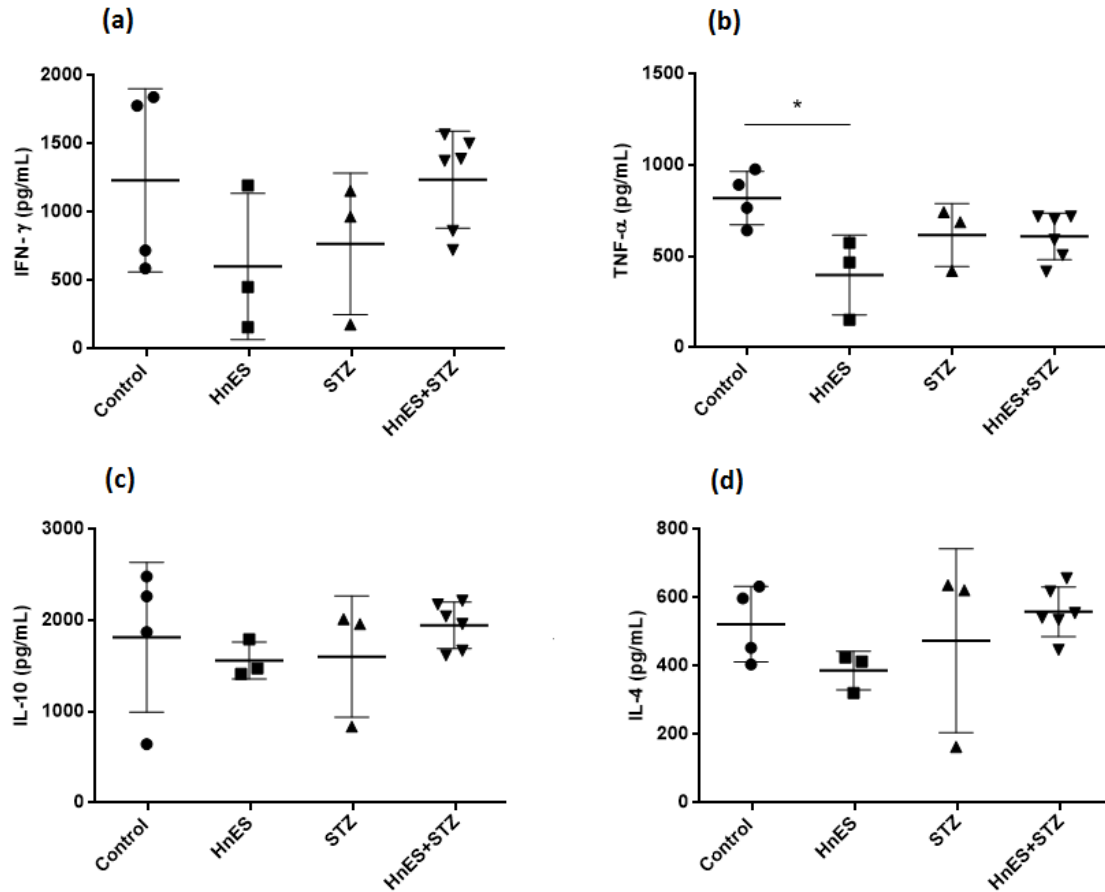


Figura 8. Cuantificación de citocinas en lavados intestinales de ratones inmunizados con los productos HnES. Las citocinas cuantificadas por el método de ELISA fueron IFN- $\gamma$  (a), TNF- $\alpha$  (b), IL-10 (c) e IL-4 (d). Cada punto corresponde a los valores obtenidos por ratón y la línea horizontal a la media con su desviación estándar. Diferencias significativas \* $p < 0.05$  entre grupos con la prueba de Kruskal Wallis.

Para el experimento con el HnEC, el resultado de la cuantificación de las citocinas se muestra en la figura 9, donde se graficó el valor de la concentración de citocinas para cada ratón de los diferentes grupos experimentales. En la figura 9a, correspondiente a IFN- $\gamma$  se observa una disminución en la concentración de esta citocina en el grupo tratado con el HnEC, contrario al grupo de STZ cuya concentración es significativamente más alta; además se observa como el grupo control y el grupo HnEC+STZ mantiene sus niveles similares. En el caso de TNF- $\alpha$  (Figura 9b) se puede apreciar como la producción de esta citocina es menor en el grupo HnEC+STZ frente a los demás, mientras que el grupo control registró una alta

concentración de TNF- $\alpha$ . Para IL-10 (Figura 9c) los valores se mantienen similares en los grupos control, HnEC y STZ, mientras se observa una disminución de esta citocina en el grupo HnEC+STZ; no se reportaron diferencias estadísticamente significativas. Y para la citocina IL-4 (Figura 9d) se observa un ligero aumento en el grupo con STZ respecto al grupo control, mientras que en el grupo HnEC+STZ la concentración de IL-4 disminuye.

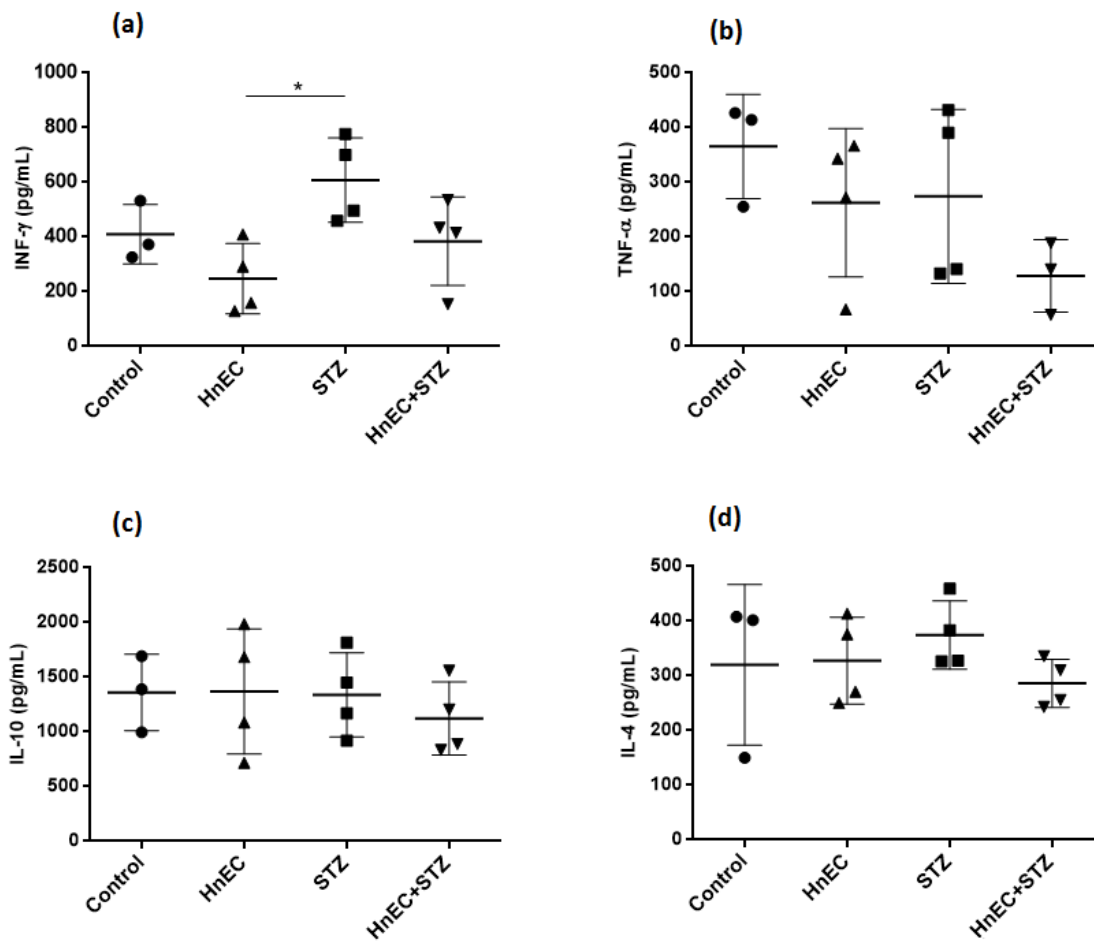


Figura 9. Cuantificación de citocinas en lavados intestinales de ratones inmunizados con el HnEC. Las citocinas cuantificadas por el método de ELISA fueron IFN- $\gamma$  (a), TNF- $\alpha$  (b), IL-10 (c) e IL-4 (d). Cada punto corresponde a los valores obtenidos por ratón y la línea horizontal a la media con su desviación estándar. Diferencias significativas \* $p < 0.05$  entre grupos con la prueba de Kruskal Wallis.



La medición de citocinas en cultivos de bazo no mostró resultados contundentes. Para el caso del experimento con el HnEC solo se registraron lecturas en los cultivos donde se estimuló a las células con ConA, donde lo más relevante fue que la producción de IL-4 fue mayor en el grupo HnEC+STZ (4048 pg/mL) comparado con el grupo STZ (3657.6 pg/mL). En el caso de IFN- $\gamma$  solo se registró lectura para los grupos HnEC y HnEC+STZ; y las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 no mostraron ninguna lectura. En el experimento con los productos HnES también se obtuvieron lecturas solo con ConA. Se observó que la producción de IL-4 fue mayor en el grupo HnES+STZ con respecto a los demás grupos, mientras que IL-10 fue más alta en los grupos HnES y STZ. Para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  tampoco se obtuvieron resultados concluyentes.

### **Análisis histológico de páncreas**

Para determinar los efectos a nivel histológico de los diferentes tratamientos, se realizaron cortes de páncreas de cada uno de los ratones en los diferentes grupos experimentales y se tiñeron con hematoxilina y eosina. En el caso de las muestras del experimento con los productos HnES, no se pudieron obtener los cortes histológicos debido a un problema durante el procesamiento del tejido. Para el experimento con el HnEC, en la figura 10 se muestran secciones de páncreas de ratones con diferentes tratamientos: en el grupo control y el grupo tratado solo con el HnEC (Figuras 10a y 10b) se observó una estructura histológica normal, donde los islotes de Langerhans aparecieron como áreas redondeadas u ovaladas bien definidas y que estaban formados por grupos de células dispuestas de forma irregular. En el grupo tratado con STZ (Figura 10c) se observó una reducción en el número y tamaño de los islotes, así como una degeneración en la estructura de estos. Se presentaron de forma irregular, las células  $\beta$  se observaron con el citoplasma alterado, y también se presentó infiltrado linfoide en la mayoría de los islotes. En cambio, el grupo HnEC+STZ (Figura 10d) se mostró similar al grupo control y HnEC, sin alteraciones morfológicas.

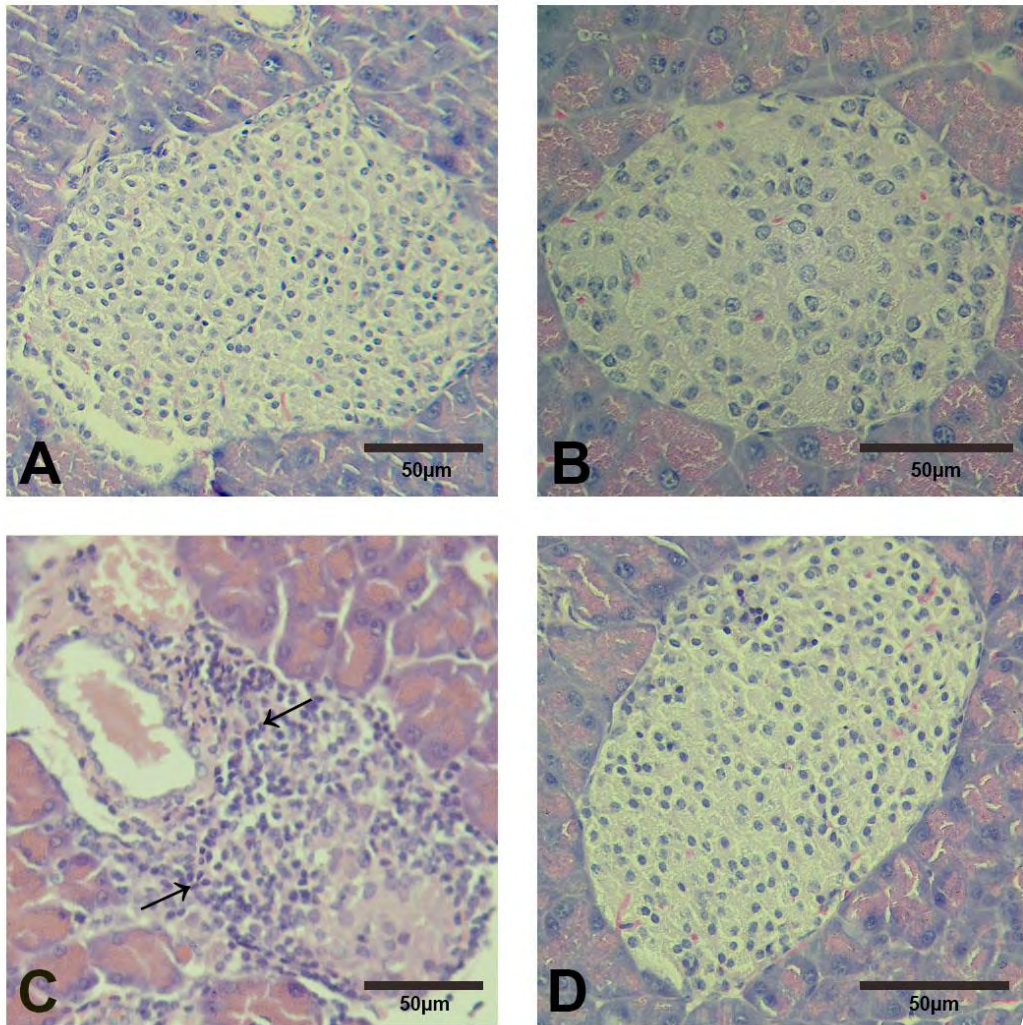


Figura 10. Micrografías de secciones de páncreas teñido con hematoxicilina y eosina. La porción color violeta intenso es el páncreas exocrino (células acinares) mientras que la región más clara es el páncreas endócrino (islote de Langerhans). (A) sección del grupo control; (B) grupo tratado con el HnEC; (C) grupo tratado solo con STZ y (D) grupo HnEC+STZ. Las flechas señalan el infiltrado celular. Las muestras se tomaron al momento de la necropsia, 28 días post STZ.

Así mismo, se revisaron los islotes de 10 campos y se les asignó un grado de insulitis dependiendo de qué condición se observaba en cada islote; una vez asignado el grado de infiltración, se graficó la proporción de los diferentes grados de insulitis en los grupos tratados con el HnEC (Figura 11). Se obtuvo que para el grupo tratado solo con STZ, cerca del 50% de los islotes se observaron con algún

grado de infiltración celular, mientras que en el grupo HnEC+STZ solo un 10% presentó algún grado de infiltración. Tanto el grupo control como el tratado solo con HnEC no mostraron anomalías en los islotes.

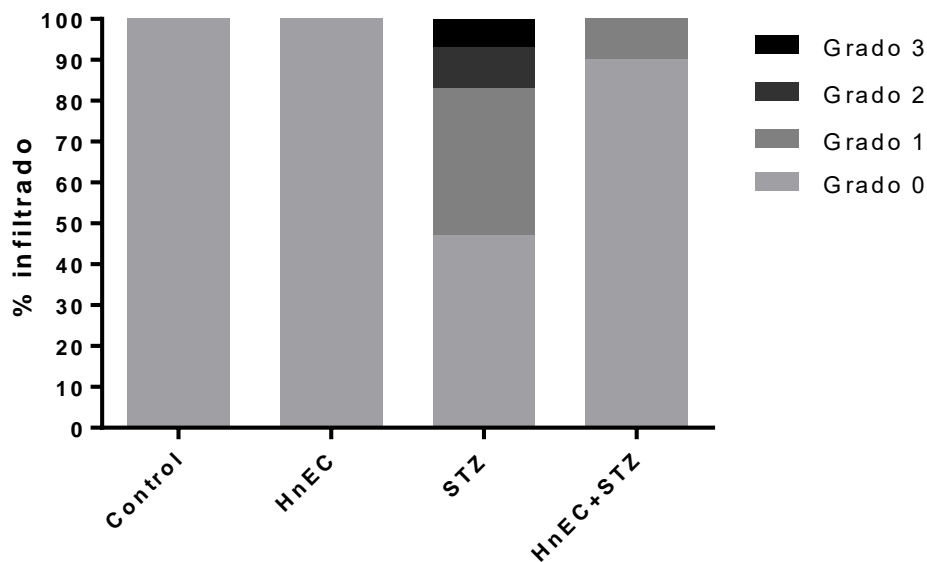


Figura 11. Grado de insulitis observado en los islotes pancreáticos de los ratones de los diferentes grupos para el experimento con el HnEC.

## Discusión

La prevalencia de enfermedades autoinmunes en las últimas décadas ha aumentado a un ritmo preocupante en países industrializados. Tal es el caso de la diabetes tipo 1 (DT1), la cual es una enfermedad crónica en que células del propio sistema inmune atacan y diezman a las células  $\beta$  del páncreas productoras de insulina a través de un perfil inflamatorio tipo Th1, lo cual trae como consecuencia una desregulación en el metabolismo de glucosa en el cuerpo (Muralidhara-Krishna y Srikanta, 2015). Las causas por las que esto ocurre no están del todo esclarecidas, se sabe que el desarrollo de esta enfermedad está mediado por factores tanto genéticos como ambientales; la tasa de concordancia para el desarrollo de diabetes en gemelos homocigóticos es de apenas el 40%, por lo cual sugiere un peso importante de la parte ambiental para la aparición de esta enfermedad (IFD, 2015).

Diversos estudios han mostrado que se presentan bajas tasas de DT1 en individuos con infecciones crónicas de parásitos como los helmintos, en comparación con aquellos individuos que no presentan infecciones. La protección que confieren estas infecciones ante las enfermedades como la DT1 parece deberse a un mecanismo de inmunomodulación estimulado por el parásito como mecanismo de defensa ante la respuesta del hospedero (Weinstock y Elliott, 2014). Esto ha despertado un gran interés en las últimas décadas, ya que ha sido centro de diversas investigaciones que buscan en estos parásitos posibles agentes terapéuticos contra las enfermedades autoinmunes.

Se han reportado diversos estudios donde infecciones con helmintos o el tratamiento con sus productos de excreción-secreción protegen o disminuyen los efectos de enfermedades autoinmunes, y en el caso de DT1 se ha reportado que la infección con *Litomosoides sigmodontis*, *Taenia crassiceps* y *Trichinella spiralis* protegen contra el desarrollo de la insulitis (Weinstock y Elliott, 2014). También la administración de proteínas secretadas por *Brugia malayi*, *Fasciola hepática* y *Schistosoma mansoni* han demostrado tener un efecto positivo contra el desarrollo de DT1 en modelos animales (Amdare et al, 2015; Lund et al, 2014; Zacccone et al, 2003).

En el caso de *Hymenolepis nana*, un helminto causante de hymenolepiasis que afecta a humanos y ratones, no hay estudios que indaguen sobre su potencial como posible agente terapéutico en el caso de DT1, por lo cual en este trabajo se propuso determinar el efecto de la administración de sus productos antigénicos en el desarrollo de la diabetes experimental murina inducida por la streptozotocina (STZ).

En este experimento, se obtuvieron tanto los productos de excreción-secreción como el extracto crudo de *H. nana*. Estos, al requerir ser administrados en animales, fueron sometidos a una cuantificación de endotoxinas presentes mediante un ensayo comercial de Lymulus Amebocyte Lysate (LAL) para determinar si cumplían con las normas establecidas para su administración. La determinación mediante este ensayo arrojó que la cantidad de endotoxinas en los productos HnES fue de 0.31 UE/mL y para el HnEC fue de 0.37 UE/mL, lo cual estuvo debajo de los límites aceptados, ya que de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, 2015), el límite calculado para un ratón de 25g y al que se le administró un volumen de 0.1mL de productos antigénicos (HnES o HnEC) es de 1.25 UE/mL.

Diversos modelos animales se han desarrollado para el estudio de la diabetes tipo 1, entre los que destaca el uso de la STZ, una molécula obtenida de *Streptomyces achromogenes* que promueve el daño a las células  $\beta$  del páncreas. Su mecanismo se debe en gran parte a que posee una estructura muy similar al de la molécula de glucosa: básicamente se trata de una molécula de glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitroseaurea que, al ser internalizado y liberado en la célula, desencadena un deterioro metabólico por necrosis celular, formación de ROS y destrucción del ADN. Para su uso se han establecido dos dosificaciones: la primera refiere a una dosis única alta que induce un efecto toxico directo. La segunda forma, y la cual se utilizó en el presente trabajo, fue el esquema de múltiples dosis bajas, el cual consistió en administrar 50mg/kg de STZ durante 5 días consecutivos. Administrada de este modo, se induce una diabetes insulínopénica en la que interviene el sistema inmune, ya que ocurre una liberación de autoantígenos relevantes que participan en la activación de la autoinmunidad celular específica

hacia células  $\beta$  pancreáticas (Arias-Díaz y Balibrea, 2007). También se ha observado que la toxicidad inicial de la STZ que causa la destrucción parcial de células  $\beta$  es de corta duración, dejando una fracción residual que sobrevive al daño y, el deterioro funcional de esta fracción sobreviviente se debe en gran parte a la toxicidad inducida por la hiperglucemia (Wu y Yan, 2015).

Para la evaluación del desarrollo de diabetes en el presente trabajo se realizó una toma de glucosa previo a la administración de STZ, y posteriormente a los 14, 21 y 28 días. Se tomó como referencia el trabajo de Amdare y colaboradores, donde el nivel de glucosa considerado como diagnóstico de diabetes mellitus en ratones es arriba de 200mg/dL (Amdare et al, 2014).

De acuerdo con esta información, para el experimento donde se inmunizó a los animales con los productos HnES se pudo observar que los grupos control y HnES mantienen sus niveles de glucosa en rangos normales durante todo el experimento, mientras que los grupos STZ y HnES+STZ sobrepasan este nivel a los 14 días después de la inducción de diabetes. Sin embargo, se pudo ver como los valores promedio del grupo inmunizado con los HnES previo a la inducción de diabetes mantienen valores más bajos de glucosa sanguínea que aquellos ratones que solo se les administró STZ. Al observar esto, se analizaron los valores individuales de glucosa de cada ratón en los distintos tiempos, y se observa que la incidencia de diabetes es del 100% en el grupo de STZ, mientras que en el grupo de HnES+STZ la incidencia es del 67%, por lo que la administración de los productos HnES protegió al 33% de los ratones de desarrollar diabetes.

En cuanto a los niveles de glucosa en el experimento con e HnEC, se observó que el promedio de los niveles de glucosa de los cuatro grupos experimentales se mantiene debajo de los 200mg/dL hasta los 14 días después de la administración de la STZ; sin embargo, después de los 21 días los niveles del grupo que al que solo se le administró STZ suben por encima de este límite y se mantienen así hasta el final del experimento. En cambio, el promedio de los ratones a los que previamente se inmunizó con el HnEC se mantiene debajo de los 200mg/dL durante todo el experimento. Analizando los valores individuales, se obtuvo que la incidencia

de diabetes en el grupo STZ fue del 67%, lo cual es admisible ya que en diversos estudios se han reportado porcentajes de incidencia en un amplio rango que va del 50 hasta el 90% después de la tercera semana de administración de la STZ. Esto se debe a que la incidencia de diabetes generada por la administración de bajas dosis repetidas de STZ depende de la actividad del fármaco y de la sensibilidad de los ratones hacia este, lo cual varía por las condiciones generales del ratón, tales como el peso, la edad, la dieta o el ambiente en el que se encuentren (Tesch y Allen, 2007). Así pues, encontramos que bajo estos parámetros la incidencia de diabetes en el grupo HnEC+STZ es menor que en el grupo tratado solo con STZ; de hecho únicamente un 25% de la población obtuvo niveles arriba de los 200mg/dL a los 21 días después de la inducción de diabetes, mientras que a la siguiente semana la incidencia se reduce al 0%, lo cual muestra que la administración preventiva del HnEC disminuyó los niveles de glucosa en los ratones y protegió al 75% de los animales de desarrollar diabetes mellitus durante todo el experimento. El rango de protección en otros estudios con helmintos es variable. Por ejemplo, en un estudio donde se utilizaron los productos ES de *Brugia malayi* junto con antígenos larvarios de *Wuchereria bancrofti* se obtuvo una protección contra el desarrollo de diabetes del 73%, un resultado similar se obtuvo con la infección previa con *Taenia crassiceps*, donde la protección fue del 60%; mientras que la inmunización previa con antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni* protegió en un 100% a los ratones (Amdare et al, 2016; Espinoza-Jimenez et al, 2009; Zacccone et al, 2003).

Otro factor importante en el monitoreo del desarrollo de la diabetes es el peso de los individuos. Uno de los signos clínicos que tiende a presentarse a la par de los altos niveles de glucosa sanguínea es una pérdida notable de peso, lo cual se debe a que el organismo pierde la capacidad de metabolizar adecuadamente la glucosa, por lo que esta se deshecha y el organismo busca otras fuentes de energía, lo que resulta en una pérdida de masa corporal y de peso (IDF, 2015). En el experimento con los productos HnES pudimos observar que el grupo tratado solo con STZ baja de peso de manera considerable con respecto al grupo control, observamos como al final del experimento el grupo registró una pérdida del 15% respecto a su peso inicial. Por el contrario, el grupo tratado de manera preventiva con los productos

HnES no registró variaciones en su peso, el cual se mantiene de manera estable durante todo el experimento, por lo que la administración previa de los HnES evitó que los ratones perdieran peso.

De manera similar, en el experimento con el HnEC se observó como el grupo STZ presentó una pérdida de peso que, aunque no fue estadísticamente significativa en este caso, es evidente respecto a los demás grupos. También observamos como el grupo HnEC+STZ no registra variaciones en su peso, e igualmente podemos decir que la administración previa del HnEC previno que los ratones perdieran peso después de la inducción de diabetes. Esto es similar a lo observado en un experimento realizado con los productos ES de *Strongyloides venezuelensis*, donde los ratones tratados previamente con los antígenos no mostraron pérdida de peso después de la inducción de diabetes, manteniéndose estables durante todo el experimento (Sanches-Peres et al, 2013).

Además de los síntomas clínicos característicos del progreso de la diabetes, el tratamiento preventivo con los productos antigénicos de *H. nana* también tuvo efectos positivos a nivel histológico en el páncreas. Después de obtener los cortes de páncreas del experimento con el HnEC, éstos se tiñeron con hematoxilina y eosina y se observaron al microscopio. Se observó que el grupo control y el tratado con el HnEC no presentaban anomalías, mientras que el grupo tratado solo con STZ presentó infiltrado leucocitario en los islotes, además que el número de islotes observados fue menor en este grupo; esta disminución en el número y tamaño de islotes observados concuerda con lo reportado en modelos animales con STZ (Zhang et al, 2012). En cambio, en el grupo tratado previamente con el HnEC mostró menor grado de infiltración, ya que solo se observaron islotes con un infiltrado grado 1, por lo que la administración previa del HnEC redujo el daño en páncreas durante la inducción de diabetes.

Como ya se ha reportado, la infección con helmintos induce una respuesta inmune que es polarizada hacia un fenotipo Th2, lo cual se refleja en la producción de anticuerpos y citocinas (Lebrun y Spiegelberg, 1987; Maizels et al, 1993) Para este trabajo se evaluó la producción de anticuerpos IgG totales contra el HnEC



como indicador de una respuesta inmune en general hacia *Hymenolepis nana*, y además se seleccionó la subclase IgG1 como indicador de una respuesta tipo Th2, y la subclase IgG2a para Th1.

En la evaluación de los anticuerpos IgG totales contra los productos antigénicos, se observó que tanto la inmunización de los productos HnES y con el HnEC desencadena una producción de IgG, lo cual se puede observar al comparar los valores pre inmunización de cada ratón con respecto a las muestras post, que correspondieron a los sueros obtenidos al momento de la necropsia, lo cual ocurrió 60 días después de la primera inmunización; dichos valores son estadísticamente significativos. Aunque no se tiene reportado la temporalidad de los anticuerpos en la inmunización con antígenos de *H. nana* como tal, en el caso de la infección con el parásito se ha reportado que después de 70 días post infección oral, los niveles de IgG anti *H. nana* (del parásito adulto) son bajos, casi indetectables; esto se atribuye a que los ratones de la cepa BALB/c expulsan el parásito 30 días después de la infección y son poco sensibles a una reinfección (Ito et al, 1988). En el presente trabajo se encontró que en la inmunización tanto con los productos HnES con el HnEC inducen la producción de IgG total que es detectable después de 60 días.

Al analizar las subclases de anticuerpos IgG inducidos post inmunización con los extractos antigénicos HnES y HnEC, se observó producción tanto de IgG1 e IgG2 en los ratones y fueron estadísticamente significativos para ambos antígenos. Sin embargo, cuando los ratones se inmunizaron con HnEC, los valores de IgG1 post inmunización incrementaron 6.2 veces, mientras que la IgG2a sólo aumentó 4.2 veces. Algo similar se observó cuando se utilizó HnES para inmunizar a los animales, donde los valores de IgG1 fueron mayores que IgG2a, por lo que se demostró que tanto los productos HnES como el HnEC poseen la capacidad de inducir la síntesis de IgG1 en mayor proporción, lo cual es indicativo de una polarización hacia la respuesta Th2. Esto es consistente con otros reportes de inmunización con productos antigénicos de helmintos, como en el caso de *Nippostrongylus brasiliensis* o de *Heligmosomoides polygyrus*, donde también predomina la expresión la subclase IgG1 (Hewitson et al, 2015; Kamata, 1995).

En cuanto a las citocinas, en este trabajo se cuantificaron IL-10 e IL-4 como características de una respuesta Th2 y las citocinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  como indicadores de la respuesta Th1. En el experimento con los productos HnES se pudo observar que los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son menores en los grupos tratados solo con los HnES, mientras que en los demás grupos se mantienen los niveles muy parecidos al grupo control. En el experimento con el HnEC se observa un aumento de IFN- $\gamma$  en el grupo tratado solo con STZ, mas no de TNF- $\alpha$ . En ambos experimentos se esperaba un aumento de estas citocinas en los grupos tratados solo con STZ, ya que el desarrollo de la diabetes está relacionado con la evolución de una respuesta tipo Th1, en donde linfocitos T diferenciados secretan citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , lo que promueve la migración de células T CD8+ hacia los islotes pancreáticos, lo que lleva a la destrucción de las células  $\beta$  productoras de insulina (Finkelman et al, 1988). Sin embargo, no fue posible apreciar esto de manera significativa. En otros experimentos con helmintos, donde los niveles de citocinas fueron cuantificados en suero, los resultados son diversos. Por ejemplo, en el trabajo de Espinoza-Jiménez y colaboradores se reportó que la infección previa de ratones BALB/c con *T. crassiceps* no mostraba diferencia significativa en la producción de TNF- $\alpha$  con respecto al grupo tratado solo con STZ; sin embargo, también utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 y en ellos se registró un aumento significativo de esta citocina en los ratones tratados con STZ, mientras que el grupo infectado y control mantuvieron niveles más bajos (Espinoza-Jiménez et al, 2009).

Para el caso de las citocinas del perfil Th2, la IL-10 e IL-4, se pudo observar un ligero aumento en la producción de estas citocinas en el grupo tratado con los productos HnES previo a la inducción de diabetes, esto con respecto al grupo tratado únicamente con STZ; aunque dicho aumento no es significativo. Y en el experimento con el HnEC se observó una pequeña disminución de la producción en el grupo HnES+STZ, aunque tampoco son estadísticamente significativos estos valores. En este caso se esperaba ver un aumento en la producción de citocinas de perfil Th2 en el caso de los grupos inmunizados con los productos antigénicos, ya que estas citocinas están ligadas a una disminución en el ambiente inflamatorio y a la producción de anticuerpos, lo cual es un mecanismo producido por helmintos para

modular la respuesta inmune del hospedero, y que es el punto clave de las terapias con parásitos (Amdare et al, 2015). Trabajos previos con *Heligmosomoides polygyrus* y *Nippostrongylus brasiliensis* reportaron un aumento de citocinas del perfil Th2. (Finkelman et al, 2004; Holland et al, 2000). Clásicamente se admite que las respuestas Th1/Th2 son mutuamente excluyentes, sin embargo, existe evidencia de respuesta no tan polarizada y que la infección por helmintos se acompaña de la producción de IL-4, IL-5, IL-10, pero también IFN- $\gamma$  (Svetic, 1993).

## Conclusiones

En el presente trabajo se obtuvieron los productos de excreción-secreción y el extracto crudo de *Hymenolepis nana* con concentraciones de endotoxinas en niveles adecuados para su administración por vía intraperitoneal en ratones. La inmunización con estos antígenos indujo la síntesis de anticuerpos IgG en los animales, los cuales fueron detectados en suero 60 días post-inmunización y que, al analizar las subclases, se obtuvo que la producción de IgG1 predomina sobre la de IgG2a, por lo que el tipo de respuesta inducida por los productos antigénicos está polarizada hacia un tipo Th2. De igual manera se observó un efecto protector de los productos antigénicos ante el desarrollo de diabetes tipo 1, ya que tanto los productos HnES como el HnEC protegieron a los ratones de perder peso; así mismo los niveles de glucosa sérica después de la inducción de diabetes se mantuvieron más bajos en ratones protegidos con los productos antigénicos de *H. nana* que en los ratones sin inmunizar y a los que se indujo diabetes. También se observó que, a nivel histológico, los páncreas de ratones a los que solo se les administró streptozotocina presentaban mayor grado de infiltrado celular que aquellos inmunizados previamente con el HnEC. La cuantificación de citocinas en lavados intestinales mostró una disminución de citocinas pro-inflamatorias en el grupo tratados con HnEC+STZ, aunque dicha disminución no fue estadísticamente significativa, mientras que la medición de citocinas en sobrenadantes de cultivo celular de bazo no mostró resultados contundentes.

Con base en lo encontrado, se sugiere evaluar la concentración de citocinas en otro fluido corporal, como en suero. También realizar la detección inmunohistoquímica de insulina en tejido pancreático, para evaluar su presencia en los diferentes grupos experimentales. Así mismo, realizar la detección de anticuerpos contra la insulina a diferentes tiempos, esto como indicador de progresión de la diabetes en los animales. Finalmente, se podría evaluar el efecto de los antígenos de *H. nana* en algún otro modelo de diabetes con el fin de estudiar más a fondo el papel que juegan los antígenos de *H. nana* como agentes reguladores.

## Referencias.

Akirov A, Pinhas-Hamiel O. Co-occurrence of type 1 diabetes mellitus and celiac disease. *World J Diabetes*. 2015; 6(5): 707–714.

Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(6): 375-88.

Alvarez-Fernandez B, Rodríguez-Bataz E, Díaz-Chiguer D, Marquez-Navarro A, Sanchez-Manzano R, Noguera-Torres B. Mixed *Hymenolepis* species infection in two family members: a case report from an urban area of Chilpancingo, Guerrero, México. *Trop Gastroenterol*. 2012; 33(1): 83–84.

Amdare M, Khatri V, Yadav SP, Tarnekar A, Goswami K, Reddy VR. *Brugia malayi* soluble and excretory-secretory proteins attenuate development of streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. *Parasite Immunol*. 2015; 37; 624-634.

Amdare M, Khatri V, Yadav SP, Tarnekar A, Goswami K, Reddy VR. Therapeutic potential of the immunomodulatory proteins *Wuchereria bancrofti* L2 and *Brugia malayi* abundant larval transcript 2 against streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. *Journal of Helminthology*. 2017; 79(3), 269-281.

Arias-Díaz J, Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*. 2007; 22(2): 160–168.

Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B. y Want, L. Glucose metabolism and regulation beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum*. 2004; 17(4), 183-190.

Bloomfield S, Stanwell-Smith R, Crevel R, Pickup J. Too clean, or not too clean: the Hygiene Hypothesis and home hygiene. *Clinical and Experimental Allergy*. 2006; 36(4): 402–425.

Cooke A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: How might infection modulate the onset of type 1 diabetes? *Immunology*. 2009; 126(1): 12–17.

Coppieters KT, Dotta F, Amirian N, Campbell PD, Kay TW, Atkinson MA et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J Exp Med.* 2012; 209(1): 51-60.

Diana J, Gahzarian L, Simoni Y, Lehuen A. Innate Immunity in Type 1 Diabetes. *Discov Med.* 2011; 11(61): 513-20.

Espinoza-Jiménez A, Rivera-Montoya I, Cárdenas-Arreola R, Morán L, Terrazas L. *Taenia crassiceps* Infection Attenuates Multiple Low-Dose Streptozotocin-Induced Diabetes. *J Biomed Biotech.* 2010; 2010.

Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol.* 1988; 40: 1022-1027.

Finkelman, F.D., Shea- Donohue, T., Morris, S.C. Gildea, Lucy, Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L. and Urban, J.F. Interleukin-4- and Interleukin-13 - mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological Reviews.* 2004. 201: 139-155.

Funda DP, Kaas A, Bock T, Tlaskalová-Hogenová H, Buschard K. Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999; 15(5): 323-7.

Graham, M. L., Janecek, J. L., Kittredge, J. A., Hering, B. J. y Schuurman, H. J. The Streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comparative Medicine.* 2011. 61(4), 356-360.

Greenwood BM. Autoimmune disease and parasitic infections in Nigerians. *Lancet.* 1968; 2(7564): 380-2.

Hernandorena B. González JC, García JC. Animales de laboratorio en la endocrinología: Biomodelos de la diabetes mellitus tipo 1. *Revi Cubana Endocrinol.* 2001; 12(3): 168-77.

Hewitson JP, Filbey KJ, Esser-von Bieren J. Concerted Activity of IgG1 Antibodies and IL-4/IL-25-Dependent Effector Cells Trap Helminth Larvae in the Tissues

following Vaccination with Defined Secreted Antigens, Providing Sterile Immunity to Challenge Infection. PLoS Pathogens. 2015; 11(3).

Holland, M., Marcus, Y., Riches, P. and Maizels, R. 2000. Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. Eur J Immunol 30:1977-1987.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015.

International Diabetes Federation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. Geneva, Switzerland: 2006.

Ito A. Basic and applied problems in developmental biology and immunobiology of cestode infections: *Hymenolepis*, *Taenia* and *Echinococcus*. Parasite Immunol. 2015; 37: 53-69.

Ito A, Honey RD, Scanlon T, Lightowlers MW, Rickard MD. Analysis of antibody responses to *Hymenolepis nana* infection in mice by the enzyme-linked immunosorbent assay and immunoprecipitation. Parasite Immunol. 1988; 10(3): 265–277.

Jackson JA, Friberg IM, Little S, Bradley JE. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? Immunology. 2009; 126(1): 18–27.

Kamata I, Yamada M, Uchikawa R, Matsuda S, Arizono N. Cysteine Protease of the Nematode *Nippostrongylus brasiliensis* Preferentially Evokes an IgE/IgG1 Antibody Response in Rats. Clin Exp Immunol. 1995. 102: 71-77.

Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. World J Diabetes. 2015; 6(6): 850–867.

Kostraba JN, Cruickshanks KJ, Lawler-Heavner J, Jobim LF, Rewers MJ, Gay EC et al. Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. Diabetes. 1993; 42(2): 288-295.

Lebrun P, Spiegelberg HL. Concomitant immunoglobulin E and immunoglobulin G1 formation in *Nippostrongylus brasiliensis*-infected mice. *J Immunol*. 1987. 139: 1459-1465.

Li M, Song LJ, Qin XY. Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *J Cell Mol Med*. 2014; 18(5): 749–758.

Lund ME, O'Brien BA, Hutchinson AT, Robinson MW, Simpson AM, Dalton JP. Secreted proteins from helminth *Fasciola hepática* inhibit the initiation of autoreactive T cell responses and prevent diabetes in the NOD mouse. *PLoS ONE*. 2014; 9(1).

Maizels R, Bundy D, Selkirk M, Smith D, Anerson R. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*. 1993. 365: 797-805.

Maizels RM, McSorley HJ, Smyth DJ. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? *Clin Exp Immunol*. 2014; 177(1): 38–46.

Marek-Trzonkowska N, Myśliwec M, Siebert J, Trzonkowski P. Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2013; 14(5): 322–332.

Mohan JF, Petzold SJ, Unanue ER. Register shifting of an insulin peptide–MHC complex allows diabetogenic T cells to escape thymic deletion. *J Exp Med*. 2011; 208(12): 2375-2383.

Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M. Immunogenetics of type 1 Diabetes Mellitus. *Mol Aspects Med*. 2015; 42: 42–60.

Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Agudelo CA, Hidron A, Eberhard ML, Mathinson BA et al. Malignant transformation of *Hymenolepis nana* in a human host. *N Engl J Med*. 2015; 373(16): 1845-1852.

Muraille E, Leo O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol*. 1998; 47(1): 1-9.



Muralidhara-Krishna CS, Srinikanta S. Type 1 diabetes pathogenesis-prevention??? Indian J Endocrinol Metab. 2015; 19(1): S58-S63.

Nielsen DS, Krych Ł, Buschard K, Hansen CH, Hansen AK. Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes. FEBS Lett. 2014; 588(22):4234-43.

Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. JAMA. 2003; 290(13): 1713–1720.

O'Neill SK, Liu E, Cambier JC. Change you can B(cell)eive in: recent progress confirms a critical role for B cells in type 1 diabetes. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity. 2009; 16(4): 293-298.

Rodacki M, Svoren B, Butty V, Besse W, Laffel L, Benoist C et al. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. Diabetes. 2007; 56(1): 177-85.

Sanches-Peres R, Chiuso-Minicucci F, Camargo L, Domingues A, Zorzella-Pezavento SFG et al. Previous contact with *Strongyloides venezuelensis* contributed to prevent insulinitis in MLD-STZ diabetes. Exp Parasitol. 2013; 134(2): 183-189.

Santamaria P. The Long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. M Immunity. 2010; 32(4): 437–445.

Svetic A. A Primary Intestinal Helminthic Infection Rapidly Induces a Gut-Associated Elevation of Th2-Associated Cytokines and IL-3. J Immunol. 1993, 150: 3434-3441.

Shepherd C, Navarro S, Wangchuk P, Wilson D, Daly NL, Loukas A. Identifying the immunomodulatory components of helminths. Parasite Immunol. 2015; 37(6) 293–303.

Shi M, Wang A, Prescott D, Waterhouse CC, Zhang S, McDougall JJ et al. Infection with an intestinal helminth parasite reduces Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in mice. Arthritis Rheum. 2011; 63(2): 434-44.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989; 299(6710): 1259-1260.

Szkudelski T. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin in B cells of the rat pancreas. *Physiol res*. 2001; 50(6): 536-546.

Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology*. 2007; 12(3): 261-266.

Thompson RC. Neglected zoonotic helminths: *Hymenolepis nana*, *Echinococcus canadensis* and *Ancylostoma ceylanicum*. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(5): 426-432.

United States Pharmacopeia 39, Chapter 85, Bacterial Endotoxins Test, 161-167, U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2015.

Weinstock JV, Elliott DE. Helminth infections decrease host susceptibility to immune-mediated diseases. *J Immunol*. 2014; 193(7): 3239-3247.

Wong FS, Wen L, Tang M, Ramanathan M, Visintin I, Daugherty J, Hannum LG et al. Investigation of the Role of B-Cells in Type 1 Diabetes in the NOD Mouse. *Diabetes*. 2004; 53 (10): 2581-2587.

World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. 2006. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.

Wu, J. y Yan, L. J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2015. 8, 181-188.

Yeung WG, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ*. 2011; 342: d35.

Zaccone P, Fehérvári Z, Jones FM, Sidobre S, Kronenberg M, Dunne DW. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. Eur J Immunol. 2003; 33: 1439-1449.

Zaccone P, Hall, SW. Helminth Infection and type 1 diabetes. Rev Diabet Stud. 2012; 9(4): 272–286.

Zhang Y, Bone RN, Cui W, Peng JB, Siegal GP, Wang H, Wu H. Regeneration of pancreatic Non- $\beta$  endocrine cells in adult mice following a single diabetes inducing dose of streptozotocin. PLoS ONE. 2012; 7(5).