



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INMUNOMODULACIÓN POR EL CESTODO *TAENIA CRASSICEPS*: IMPACTO EN
LA ARTRITIS REUMATOIDE EXPERIMENTAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

AAXIN MICHEL ORTIZ FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
COMITÉ TUTOR: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DRA. NORMA MORENO MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**INMUNOMODULACIÓN POR EL CESTODO *TAENIA CRASSICEPS*: IMPACTO EN LA
ARTRITIS REUMATOIDE EXPERIMENTAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

AAXIN MICHEL ORTIZ FLORES

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**DRA. NORMA MORENO MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2013

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de diciembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **ORTÍZ FLORES AAXIN MICHEL** con número de cuenta 400070917, quien optó por la presentación de Tesis en la modalidad de réplica oral de un artículo científico publicado, el cual lleva por título "**INMUNOMODULACIÓN POR EL CESTODO *Taenia crassiceps*: IMPACTO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE EXPERIMENTAL**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS**:

Presidente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Vocal: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
Secretario: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA
Suplente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Suplente: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de mayo de 2013.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A los apoyos recibidos:

CONACYT, Número de Becario: 210548

PAPIIT, Número del Proyecto: IN212909

A los miembros del Comité Tutor:

DRA. NORMA MORENO MENDOZA

DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A los miembros del Jurado:

Dr. Abraham Landa Piedra

Dr. Emilio Rojas del Castillo

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Dr. Julio César Carrero Sánchez

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Por sus valiosas observaciones en la edición de la Tesis

A los miembros de mi Comité Tutor

Por sus valiosos comentarios y guía durante proceso

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala

A la Unidad de Biomedicina

Al Laboratorio 8 de Inmunoparasitología

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Por su apoyo durante el proceso experimental

A la MVZ. Leticia Flores

A la Biol. Ana F. Chávez Sánchez

Por su apoyo y enseñanzas

A la M. en C. Imelda Juárez Avelar

A la M. en C. Yadira Ledesma Soto

Por sus enseñanzas y colaboración durante la elaboración de la Tesis

A mi tutor, Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Por sus enseñanzas y apoyo.

DEDICATORIAS

A mi mamá por su amor y apoyo incondicional.

A mi Caleb por toda la alegría y amor.

A mis hermanos Eunice, Daniel y Carlos por su cariño.

A mi tía Fabiola, a mi tío Francisco y especialmente a mis tías Olga y Rocío por toda su ayuda, apoyo y cariño.

A mis primos, Olga, Christian, Alám, Aaron, Said, Lalo, Yose y especialmente Agni por su apoyo y los buenos tiempos. A todos mis sobrinos por ser un rayo de sol. A Griselda por toda su ayuda.

A Lupe y Javier por brindarme su apoyo.

A todos mis amigos y compañeros por siempre estar conmigo, Angélica, Arlett, Gabi, Ime, Yad, Chio, Nan, Sandra, Ale, Alice, Dianita, Bere, Dani, Blanca, Mireya, Laura, Miriam, Alberto, César, José Luis y Vic.

A todas las personas que me ayudaron.

A mi Abuelo Gerardo por una vida de enseñanzas, amor y cariño.

Índice

Abreviaciones.	8
Resumen.	9
Abstract.	9
Introducción.	10
Artritis Reumatoide.	10
Patogénesis de la AR.	11
Modelos animales de AR.	13
Hipótesis de la higiene y helmintos.	14
<i>Taenia crassiceps</i> y la respuesta inmune inducida por la infección.	15
Hipótesis.	18
Objetivos.	19
Resultados.	20
Artículo.	21
Discusión.	30
Conclusiones.	34
Bibliografía.	35

Abreviaciones

AR	Artritis reumatoide
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (del inglés Major histocompatibility complex)
SE	Epítopo compartido (del inglés shared epitope)
TNF- α y β	Factor de necrosis tumoral alfa y beta
IL	Interleucina
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa (del inglés severe combined immunodeficiency)
Th	Célula T cooperadora (del inglés T helper)
IFN- γ	Interferón gama
CIA	Artritis inducida por cólogena (del inglés collagen induced arthritis)
RANKL	Ligando del Receptor activador de NF κ B (del inglés receptor activator of NF κ B ligand)
RANK	Receptor activador de NF κ B (del inglés receptor activator of NF κ B)
NF κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (del inglés nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
OPG	Osteoprotegerina
MMP	Metaloproteasas
CFA	Adyuvante completo de Freund (del inglés complete Freund's adjuvant)
HAO	Ovoalbúmina agregada por calor (del inglés heat aggregated ovalbumin)
OMS	Organización mundial de la salud
Ig	Inmunoglobulina
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible (del inglés inducible nitric oxide synthase)
ON	Óxido nítrico
RM	Receptor de manosa
MAA	Macrófagos alternativamente activados
PDL-1 y 2	Ligandos de muerte programada 1 y 2 (del inglés programmed death ligand 1 and 2)
CII	Colágeno 2

Resumen

Nuestro grupo reportó previamente que la infección con *Taenia crassiceps* reduce la incidencia y severidad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como diabetes tipo 1 experimental y encefalomiелitis autoinmune experimental. El objetivo de este trabajo fue determinar si la infección con *T. crassiceps* afectaría el desarrollo de la artritis reumatoide experimental (AR). La AR fue inducida a través de la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ transgénicas y la inmunización con un antígeno de OVA, en ratones BALB/c machos. Encontramos que los ratones infectados con el parásito e inducidos con AR experimental mostraron puntajes clínicos similares al grupo de ratones no infectados con AR experimental; las citocinas sistémicas no se afectaron mientras que los anticuerpos anti-colágeno II tuvieron títulos más altos en los grupos infectados. La evaluación histológica presentó daño en ambos grupos experimentales infectados y no infectados e inducidos con AR experimental. Aunque algunas moléculas de superficie como PDL-2 y RM, las cuales se asocian con mecanismos inmunomoduladores, estaban reguladas positivamente en el grupo infectado e inducido con AR comparado con el grupo no infectado y con AR. Estas moléculas no ejercieron ningún cambio en el proceso de la AR experimental. Por lo cual determinamos que la infección con *T. crassiceps* no influye en el desarrollo de la AR experimental.

Abstract

It was previously reported by our group that infection with *Taenia crassiceps* reduces incidence and severity of inflammatory and autoimmune experimental diseases such as type 1 diabetes and experimental autoimmune encephalomyelitis. In this research, we set out to study whether infection with *T. crassiceps* would affect the development of experimental rheumatoid arthritis (RA). RA was induced through the adoptive transfer of T CD4⁺ transgenic cells and immunization with an OVA antigen, in male BALB/c mice. We found that mice infected with the parasite and induced with experimental RA showed similar clinical scores as the non-infected experimental RA group; systemic cytokines were not affected while anti-CII Abs were higher in the infected group. Histological evaluation showed damage in both infected and non-infected experimental RA-induced groups and although some surface molecules such as PDL-2 and MR which are associated with immunomodulatory mechanisms were up-regulated in the infected and RA-induced groups as compared to the uninfected RA group, they did not exert any changes in the outcome of experimental RA. Thus, we determined that infection with *T. crassiceps* does not influence the outcome of experimental RA.

Introducción

Artritis Reumatoide

La incidencia de las enfermedades autoinmunes inflamatorias como la esclerosis múltiple, diabetes tipo I, la enfermedad de Crohn y artritis reumatoide (AR), se han incrementado en países desarrollados en las últimas tres décadas (Zaccone P., *et al.* 2006). Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por el ataque a órganos, que no son reconocidos por el sistema inmune como propios. La predisposición a la autoinmunidad está bajo control de múltiples genes, aunque los factores ambientales y nutricionales también podrían participar. Los países en los que ha aumentado la autoinmunidad, al mismo tiempo han tenido grandes mejorías en el nivel socioeconómico y de sanidad. Esto ha reducido la exposición a infecciones y se piensa que estas condiciones contribuyen al incremento en la autoinmunidad (Zaccone P., *et al.* 2006).

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por la inflamación y sensibilidad de las articulaciones y la destrucción del sinovio lo cual lleva a la incapacidad física y mortalidad prematura; se estima que la AR tiene una prevalencia del 1% en la población mundial. La AR es considerada como una enfermedad autoinmune (Aletaha D., 2010), aunque se asocian factores genéticos y ambientales a la etiología (Barberá A. y Domínguez M., 2004). La presencia de autoanticuerpos como el factor reumático y proteínas citrulinadas en la sangre pueden preceder las manifestaciones clínicas por muchos años (Firestein G., 2003).

Dentro de los factores de riesgo reconocidos para la AR ha sido aparente el hecho de que el fondo genético tiene importancia en la susceptibilidad y severidad de la AR. Uno de los genes más estudiados se encuentra en el locus del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), en donde pacientes que presentan el alelo HLA-DRB1, el cual codifica para una secuencia de 5 amino ácidos (QKRAA o QRRRA) conocido como el epítipo compartido (SE), influye en la severidad de la enfermedad, ya que el riesgo de erosión y enfermedad extra-articular es mayor si los pacientes tienen el gen y aumenta aún más si son homocigotos (Firestein G., 2003). Otros genes asociados a la AR son PTPN22, PAD14, CTLA4, FC γ Rs, citocinas y sus receptores como TNF, IL-1 β , IL-10 e IL-18 (McInnes I.B. y Schett G., 2007).

Patogénesis de la AR

Diferentes vías efectoras y de señalización que se llevan a cabo en el sinovio en la AR, tienen como resultado una cascada de eventos patofisiológicos que culminan en la destrucción progresiva de la articulación (Muller-Ladner U., *et al.* 2005). El sinovio, en condiciones normales es un tejido relativamente acelular cubierto por una membrana compuesta principalmente por macrófagos y fibroblastos sinoviales, que recubre las articulaciones. Durante la AR esta membrana se inflama y hay infiltración de diversas poblaciones celulares al sinovio, incluyendo linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y fibroblastos sinoviales, que a veces se agregan en estructuras parecidas a los centros germinales. Esta infiltración lleva a la hiperplasia del tejido y la destrucción local de estructuras articulares (Karouzakis E., *et al.* 2006; Firestein G.S., 2003).

La participación de las células B en la AR no ha sido bien caracterizada pero se han encontrado infiltrados de este tipo en el sinovio inflamado. También se reconoce que las células B participan como células presentadoras de antígeno a células T CD4+, manteniendo de esta forma la producción de citocinas pro-inflamatorias. Otra contribución importante es la producción de anticuerpos, además de auto-anticuerpos, pero a pesar de la investigación extensiva los auto-antígenos iniciadores del proceso de la enfermedad todavía no han sido identificados. Sin embargo, se ha probado la reactividad de algunos anticuerpos circulantes y auto-antígenos, como son colágeno de tipo II, proteoglicanos, proteínas de unión a cartílago, antígenos nucleares, proteínas de choque térmico, proteínas de unión a cadena pesada que pueden ser detectadas en pacientes con AR (Firestein G.S., 2001).

Por lo contrario la participación de células T en la AR ha sido clara, ya que se han encontrado infiltrados de células T en el sinovio de pacientes y cuando han sido trasplantadas a ratones SCID las células T sinoviales transfieren la enfermedad. La participación de células T se ha corroborado ya que el tratamiento con anticuerpos anti-CD2 eliminó las células residentes del tejido sinovial lo cual resultó en una menor producción de citocinas pro-inflamatorias (Hochber M.C., *et al.* 2009).

Las células T han sido implicadas en mediar muchos aspectos de la inflamación de las articulaciones. En general, las células T CD4+ son reconocidas por iniciar la respuesta inflamatoria como células efectoras Th1 pro-inflamatorias (Firestein G., 2003). Con el reciente descubrimiento del linaje Th-17 parece haber una mayor participación de las células T en la patogénesis de la AR. En la respuesta Th-17 es importante la participación de la IL-17 ya que induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios en diversos tipos

de células, estimula la producción de IL-6 y prostaglandina E2 localmente y sinergiza con otras citocinas inflamatorias como IL-1- β , TNF- α , IFN- γ y el ligando CD40. Una respuesta aberrante Th-17 ha sido implicada en la patogénesis de la AR, ya que se ha demostrado que los ratones IL-17 KO no desarrollan artritis inducida por colágeno (CIA) y al bloquear la IL-17 con anticuerpos monoclonales, se ha observado la disminución de la enfermedad en modelos de AR experimental (Lubberts E., 2008).

Aunque la respuesta de células T dependientes de antígeno puede ser importante en la iniciación de la respuesta inflamatoria durante la artritis, hay evidencia de que la respuesta independiente de antígenos puede ser importante también. Las células T sinoviales pueden activar monocitos y macrófagos de manera dependiente de contacto para inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α . Un estudio demostró que las células T sinoviales inducen la producción de quimiocinas CC y CXC de manera dependiente de contacto. Esta función efectora también es compartida con células T activadas con un coctel de citocinas (IL-2, IL-6 y TNF- α). Por otra parte, también se ha reportado que células T activadas por IL-2, IL-6 y TNF- α inducen fibroblastos sinoviales a producir citocinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-8 de manera dependiente de contacto (Andersson A.K., *et al.* 2008).

El papel de las citocinas dentro de un sistema de regulación compleja está relacionada con procesos inmunológicos específicos que promueven autoinmunidad, inflamación crónica y destrucción del tejido (McInnes I.B. y Schett G., 2007). Los macrófagos y fibroblastos sinoviales son una fuente importante de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-8, las cuales participan en la perpetuación de la enfermedad al participar en redes de señalización que activan y promueven la inflamación (Sweeney S.E y Firestein G.S, 2004).

El TNF- α es de gran importancia en la patogénesis de la AR. Se ha encontrado en biopsias sinoviales y al administrar anticuerpos quiméricos específicos contra TNF- α humano, se redujeron los síntomas de la enfermedad y los niveles de proteína C reactiva en sangre. Estas observaciones también se han visto en modelos experimentales. Al administrar anticuerpos monoclonales anti-TNF- α después de la inducción de la AR, se observó una disminución en la inflamación y en el daño a la articulación; por otro lado la sobreexpresión de TNF- α en un modelo transgénico induce artritis espontánea erosiva. El TNF- α está involucrado en una variedad de funciones relevantes asociadas a la patogénesis de la AR, como por ejemplo la activación del endotelio, liberación de quimiocinas, angiogénesis, activación de condrocitos y osteoclastos lo cual promueve la destrucción articular principalmente por la vía de RANK/RANKL (Brennan F.M., y McInnes I.B, 2008).

El ligando del receptor activador de NF κ B (RANKL) es un miembro de la súper familia de TNF- α y es expresado por fibroblastos sinoviales y células T activadas del sinovio. En la AR, la expresión de RANKL es regulada positivamente y constituye un pre-requisito importante para la diferenciación de osteoclastos; su expresión es regulada por citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17. El sistema de retroalimentación es muy importante en la perpetuación de la osteoclastogénesis ya que TNF- α induce la expresión de IL-1 e IL-1R por células del mesénquima y células del linaje de osteoclastos; así como IL-17 induce la expresión de RANKL, TNF- α e IL-1 β por fibroblastos sinoviales. A su vez RANKL induce la diferenciación de los osteoclastos y su actividad de reabsorción de hueso. La interacción de RANKL con su receptor RANK es modulada por osteoprotegerina (OPG), un receptor señuelo soluble, el cual es expresado por células del mesénquima del sinovio; en la AR un desequilibrio entre OPG y expresión de RANKL promueve la pérdida de hueso (Neumann E., *et al.* 2005).

Las células T también contribuyen a la erosión del hueso a través de la osteoclastogénesis. Se ha observado que al hacer co-cultivos de células T y monocitos de pacientes con AR en etapas tempranas, se indujo la diferenciación de osteoclastos dependientes de RANKL. Éste se expresa en células T activadas y fibroblastos sinoviales en la AR (Andersson A.K., *et al.* 2008).

Además de producir citocinas pro-inflamatorias, los fibroblastos también producen metaloproteasas (MMP), enzimas cuya función principal es la degradación de matriz extracelular. Estas se subdividen en cinco grupos dependiendo de su sustrato de proteínas de matriz. Las colagenasas (MMP-1, MMP-13) y estromelisin (MMP-3) son especialmente importantes en la AR. Su síntesis y activación es inducida por varios factores incluyendo citocinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento, proteínas de matriz como fibronectina, ligandos de TLR y especies reactivas de oxígeno. La exposición de fibroblastos a IL-1 β y TNF- α rápidamente induce la expresión de genes de MMP. La IL-17 también contribuye directa o indirectamente al sinergizar con IL-1 β y TNF- α para incrementar la producción de MMP (Bartok B. y Firestein G.S., 2010).

Modelos animales de AR

Los modelos animales son necesarios para dilucidar los mecanismos de la patogénesis en la AR, así como también para el desarrollo de nuevas terapias. El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) es el más conocido, el cual se basa en la generación de anticuerpos anti-colágeno por medio de la inyección de colágeno heterólogo de tipo II en una emulsión con adyuvante completo de Freund (CFA) en ratones DBA/1. La CIA se desarrolla después del día 21 de la inoculación y se espera un pico entre el día 40-50.

Se presenta como poliartritis caracterizada por infiltración e hiperplasia del sinovio, erosión de hueso y cartílago (Brand D.D., *et al.* 2007).

Otro modelo de artritis inducida por antígenos es aquel mediado por la transferencia adoptiva de células T con un TCR transgénico que reconoce un péptido específico de ovoalbúmina de pollo (OVA323-339), con fenotipo Th1 a ratones BALB/c seguido de la inmunización con OVA en CFA y un reto posterior con ovoalbúmina agregada por calor (HAO) en las articulaciones. Este modelo se caracteriza por hiperplasia sinovial, infiltración celular, así como por una producción significativa de anticuerpos anti-colágeno, por lo cual este sistema logra mimetizar algunas de las características patológicas de la enfermedad dado que estas condiciones están presentes en la AR humana (Maffia P., *et al.* 2004).

Debido a que la respuesta inmune de la AR es compleja y que a su vez está fuertemente influida por el fondo genético y el medio ambiente; el uso de modelos experimentales ha aportado ventajas. Algunas de estas son, el estudio puntual de mecanismos de la patogenia, así como de tipos celulares específicos involucrados. Por otro lado, también encontramos desventajas, como que en la mayoría de los modelos no se mimetiza completamente la enfermedad como se observa en humanos, y en otros casos los modelos son muy largos en cuanto a la duración y con una incidencia variable.

Hipótesis de la higiene y helmintos

Esta hipótesis inicialmente se postuló para explicar la correlación inversa entre la incidencia de infecciones y el aumento de las enfermedades alérgicas (Strachan D.P., 1989). Aunque en años recientes se ha ampliado para incorporar también a las enfermedades autoinmunes en general. Entre los diversos agentes infecciosos que pudieran participar en el concepto de ésta hipótesis, se ha puesto particular interés en las infecciones por helmintos dadas las propiedades inmuno-regulatorias de estos parásitos. El interés en la hipótesis de la higiene proviene de observaciones en las últimas dos décadas ya que se ha reportado un incremento notable en la incidencia de enfermedades inflamatorias autoinmunes en países desarrollados, entre las cuales sobresalen la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, colitis y la enfermedad de Crohn. En esos países existen mejores condiciones de higiene y sanidad, por lo tanto hay menor exposición a agentes infecciosos como los helmintos (Zaccone P., *et al.* 2006). Se piensa que el contacto temprano y/o constante con parásitos y sus productos puede modular la respuesta inmune inflamatoria de tal forma que ésta no sea excesiva.

Los helmintos son ampliamente estudiados y son de gran importancia médica ya que más de dos mil millones de personas se ven afectadas en todo el mundo (OMS). Los helmintos comprenden un grupo heterogéneo de parásitos, por lo que presentan gran diversidad biológica. No obstante de presentar diferentes ciclos de vida, modo de infección y órganos blanco, los helmintos parásitos tienen la propiedad de inducir una infección crónica y en algunos casos asintomática. A pesar de sus diferencias, estos organismos inducen una respuesta inmune muy similar y se les reconoce por su distintiva capacidad de evasión y manipulación del sistema inmune del hospedero (van Riet E., *et al.* 2007; Harnett M.M. y Harnett W., 2006).

***Taenia crassiceps* y la respuesta inmune inducida por la infección**

La cisticercosis es una infección causada por la larva del cestodo *Taenia solium*, cuyos hospederos son el humano y el cerdo. Esta enfermedad es un problema de salud pública en nuestro país, así como en toda América, África y Asia, en donde entre el 2-5% de la población son seropositivos a antígenos de cisticercos. La cisticercosis en humanos ocurre por la ingestión de huevos del parásito los cuales son excretados en las heces, que pueden contaminar el ambiente y debido a falta de higiene en el manejo de alimentos. La infección del sistema nervioso central causa neurocisticercosis que tiene diversas manifestaciones clínicas como dolores de cabeza, convulsiones, hidrocefalia, hipertensión, meningitis aséptica, así como estado mental alterado y en muchos casos se requiere de cirugías complicadas. La cisticercosis murina es causada por *T. crassiceps* que es el parásito usado para modelos experimentales; el metacestodo de este parásito se establece fácilmente y se reproduce por gemación en la cavidad peritoneal; cabe mencionar que se ha reportado la infección en individuos inmunosuprimidos (Francois A., 1998, Heldwein K 2006). Ambos parásitos son muy parecidos ya que tienen un ciclo de vida con dos hospederos, similitudes antigénicas, así como estadíos larvarios y morfológicos semejantes. *T. crassiceps* se encuentra naturalmente en el intestino de cánidos en donde se reproduce el adulto, los huevos son excretados en las heces y son consumidos por roedores. El ciclo se completa cuando el roedor es comido por los cánidos. La cisticercosis murina experimental es un modelo útil para entender y definir factores biológicos que afectan la susceptibilidad y resistencia a esta enfermedad (Terrazas L.I. y Rodríguez-Sosa M. 2007).

Después de la infección con *T. crassiceps* en modelos murinos, se observa una rápida respuesta Th1, la cual es transitoria aproximadamente durante las dos primeras semanas, después de las cuales se observa una polarización hacia una fuerte respuesta Th2 (Fig. A) con producción de citocinas IL-4, IL-5, IL-13, principalmente por células CD4⁺ (Terrazas L.I., *et al.* 1998). También se reconoce la participación de IL-

10 clasificada como citocina anti-inflamatoria, así como altos niveles de anticuerpos como IgG1 e IgE, e incremento en células como eosinófilos y mastocitos. A partir de las doce semanas de infección se observa una respuesta mixta Th1/Th2 la cual no ha sido bien caracterizada.

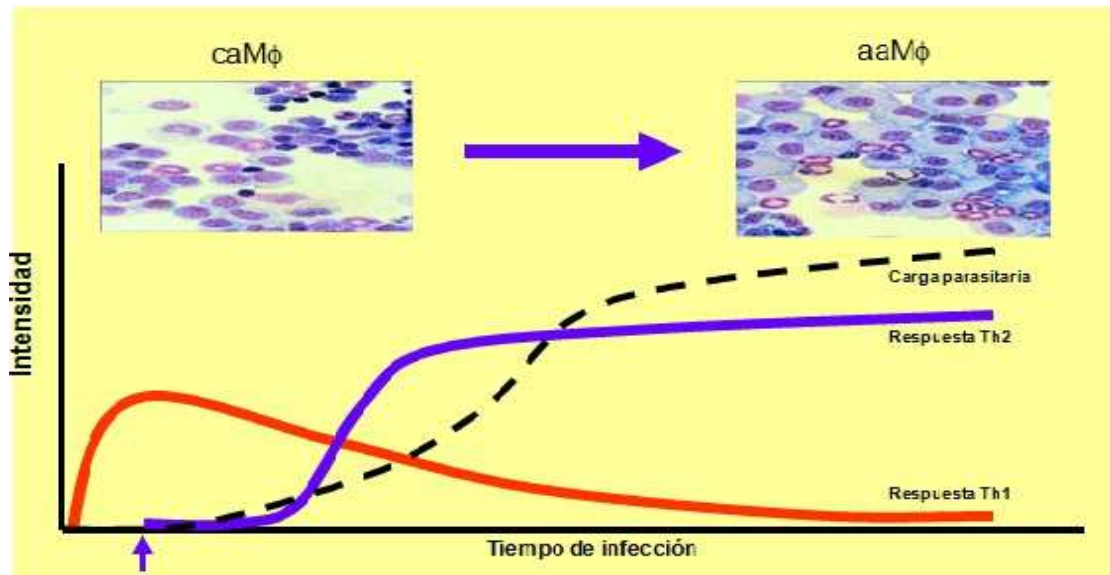


Fig. A. Cinética de la respuesta inmune inducida por la infección intra-peritoneal con metacestodos de *T. crassiceps* en ratones BLAB/c. Se ha descrito que en la etapa aguda existe una respuesta tipo Th1 pero con el aumento de la carga parasitaria se observa un cambio en la respuesta con una polarización hacia una respuesta tipo Th2; así como un cambio en el fenotipo de los macrófagos de clásicamente activados a macrófagos alternativamente activados (Terrazas L.I. y Rodríguez-Sosa M. 2007).

De la misma forma en que se dan los cambios en la respuesta inmune se puede observar una relación directa con las poblaciones de macrófagos reclutados en la cavidad peritoneal. Macrófagos F4/80⁺ obtenidos a diferentes tiempos de la infección se han usado como células presentadoras de antígeno para probar la activación y diferenciación de células T CD4⁺. Los macrófagos de infecciones agudas producen altos niveles de IL-12, iNOS y ON, así como bajos niveles de IL-6 y tienen la habilidad de inducir proliferación de células CD4⁺ antígeno específicas (Rodríguez-Sosa M., *et al.* 2002); este estado de activación de los macrófagos se reconoce como macrófagos clásicamente activados. Por otro lado los macrófagos de infecciones crónicas producen un patrón de citocinas y quimiocinas diferentes, asociadas con una baja habilidad de inducir proliferación antígeno-específica de células CD4⁺. La incapacidad de inducir proliferación no fue debido a deficiencias en la expresión de moléculas accesorias ya que MHC-II, CD40 y B7-2 estaban reguladas positivamente así como CD23 y CCR5 a lo largo de la infección (Rodríguez-Sosa M., *et al.* 2002). Además de estas moléculas otros marcadores que se encuentran elevados en macrófagos provenientes de la infección con *T. crassiceps* son el receptor de manosa (RM),

lectinas de tipo C (mMGL1 y mMGL2), Arg-1, Fizz-1, Ym1, TREM-2, además de moléculas inhibitorias como los ligandos de muerte programada 1 y 2 (PDL-1 y PDL-2); a este perfil de activación se le denomina macrófagos alternativamente activados (MAA) (Raes G., *et al.* 2005; Terrazas L.I., *et al.* 2005) y como resultado neto la infección por *T. crassiceps* genera una respuesta inmune tipo Th2.

Además de inducir una respuesta inmunológica Th2, la infección con *T. crassiceps* puede regular otras funciones de los linfocitos. La activación clásica de células T involucra la interacción entre las membranas de las células presentadoras de antígenos y células T, así como interacción del complejo principal de histocompatibilidad y moléculas co-estimuladoras. Sin embargo en presencia de los MAA, los ligandos PDL-1 y PDL-2 al unirse su receptor PD-1 que se expresa en células T activadas, se inhibe la respuesta proliferativa de células T. Dado que estos ligandos se encuentran incrementados en esta infección se probó su participación en la actividad supresora; el bloqueo de PDL-1, PDL-2 y PD-1 con anticuerpos monoclonales en los co-cultivos de células T y macrófagos provenientes de la infección, redujo significativamente la actividad supresora de los MAA. Por otro lado, también se demostró la habilidad de los MAA en suprimir la respuesta específica de linfocitos T CD4⁺ DO11.10 a la estimulación del péptido de OVA, usando macrófagos provenientes de infección como células presentadoras de antígeno. Se observó que al bloquear PD-1 se re-estableció la respuesta específica de las células T CD4⁺ DO11.10 al péptido de OVA, por lo que se podría decir que los MAA actúan como células supresoras indirectas con capacidad anti-inflamatoria. (Terrazas L.I., *et al.* 2005).

Por otra parte, estudios previos han demostrado que células T esplénicas provenientes de animales infectados con *T. crassiceps* tenían bajas respuestas proliferativas después de ser estimuladas con anti-CD3, concanavalina A o estimulación con antígenos específicos (Rodríguez-Sosa M., *et al.* 2003; Toenjes S.A., *et al.* 1999). También se demostró que la vía PD-1/PDL participa en la modulación de la respuesta proliferativa específica anti-*Taenia*, ya que de nuevo al bloquear PD-1, PDL-1/ PDL-2 en cultivos de esplenocitos derivados de infecciones con *T. crassiceps*, los esplenocitos proliferaron más efectivamente a antígenos del parásito. Estos descubrimientos sugieren la importancia de la vía de PD-1/PDL en regular negativamente respuestas específicas de células T en la cisticercosis (Terrazas L.I., *et al.* 2005).

Hipótesis

La respuesta inmune tipo Th2 anti-inflamatoria generada por la infección con *T. crassiceps*, podría modular la respuesta pro-inflamatoria de la artritis reumatoide experimental, generando una disminución en la patogénesis de la enfermedad.

Objetivo General

Determinar si la respuesta inmune inducida por la infección con *T. crassiceps* influye en el curso del desarrollo y patogénesis de la AR experimental.

Objetivos Particulares

1. Caracterizar el desarrollo de la AR en presencia de la infección previa con *T. crassiceps*.
2. Definir el papel de los MAA inducidos por el parásito en el posible efecto sobre el desarrollo de la AR.
3. Determinar si los MAA pueden mediar la resistencia a la AR por la regulación de la función/proliferación de las células T y la modulación de la respuesta Th1/Th2.

Resultados

Research Article

Taenia crassiceps Infection Does Not Influence the Development of Experimental Rheumatoid Arthritis

Aaxin M. Ortiz-Flores,¹ Yadira Ledesma-Soto,¹ Elsa A. Calleja,² Miriam Rodríguez-Sosa,¹ Imelda Juárez,¹ and Luis I. Terrazas¹

¹ Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

² Carrera de Medicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

Correspondence should be addressed to Luis I. Terrazas; literrazas@campus.iztacala.unam.mx

Received 14 August 2012; Accepted 12 October 2012

Academic Editor: Abhay R. Satoskar

Copyright © 2013 Aaxin M. Ortiz-Flores et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

It was previously reported by our group that infection with *Taenia crassiceps* reduces incidence and severity of inflammatory and autoimmune experimental diseases like type 1 diabetes and experimental autoimmune encephalomyelitis. In this research, we set out to study whether infection with *T. crassiceps* would affect the development of experimental rheumatoid arthritis (RA). We found that mice infected with the parasite and induced with experimental RA showed similar clinical scores as the noninfected experimental RA group; systemic cytokines were not affected while anti-CII Abs were higher in the infected group. Histological evaluation showed damage in both infected and noninfected experimental RA-induced groups and although some surface molecules such as PDL-2 and MR which are associated with immunomodulatory mechanisms were upregulated in the infected and RA-induced group as compared to the noninfected RA group, they did not exert any changes in the outcome of experimental RA. Thus, we determined that infection with *T. crassiceps* does not influence the outcome of experimental RA.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease with an estimate prevalence of 0.5%–1% around the world; it is characterized by inflammation and tenderness of the joints, which could lead to physical incapacity and even premature death due to complications. RA is an autoimmune disease, although the immunopathogenesis of RA is very complex to define due to the fact that a definitive cause of the disease has not yet been elucidated. Furthermore, the genetic background, exposure to environmental factors, and infectious agents contribute to the susceptibility, making it a multifactorial disease [1, 2].

Different signaling and effector pathways take place in the synovium in RA, and as a result a cascade of pathophysiological events leads to the progressive destruction of the joint. In normal conditions the synovium is acellular, and the

membrane is mainly composed of macrophages and synovial fibroblast that surround all of the joints, but in RA the synovial membrane is infiltrated by macrophages, synovial fibroblasts, T cells, and B cells. Chronic inflammation and the hyperplastic synovial membrane lead to articular destruction. Macrophages and synovial fibroblast are important sources of proinflammatory cytokines like TNF- α and IL-1 β ; these cytokines are involved in various mechanisms that perpetuate the inflammatory milieu [3], as they up regulate NF κ B which in turns trigger the release of more pro-inflammatory cytokines and chemokines (e.g., IL-6, IL-8); in addition, these cytokines induce the expression of matrix degrading enzymes, the metalloproteinases (MMP) MMP1, MMP3, MMP8, MMP13, and MMP14 [4]. Furthermore TNF- α and IL-1 β also upregulate (receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand RANKL), which is necessary for the differentiation of osteoclasts; these cells are responsible for bone

remodeling, but in RA the constant up regulation of RANKL leads to bone destruction. The involvement of T cells in RA has been very clear, since T cells have been found in RA patients synovium [5]; classically RA as well as other autoimmune diseases was classified as being one of a Th-1 phenotype based on the cytokine milieu found in experimental models of RA [2]. But with the recent discovery of IL-17 producing Th17 cells, new evidence seems to implicate even more this phenotype that may synergize with TNF- α and IL-1 β , although we cannot rule out the participation of Th1 cells [6].

Most of the insight that have been gained in the development in the field of immunology have been made possible by the use of experimental murine models; the gold standard model for the induction of RA has been the collagen induced arthritis (CIA) model, that is based on the induction of type II collagen (CII) antibodies by immunization of DBA/1 mice with heterologous CII in Complete Freund's Adjuvant (CFA), with onset of the disease around day 40–50 postinoculation of the CII, resulting in infiltrating and hyperplastic synovium with erosion of bone and cartilage. Among other models of experimental RA, one that is able to break self-tolerance by inducing CII Abs production without the immunization of CII, is an experimental model of adoptive T cell transfer, in which DO11.10 CD4⁺ T cells (which specifically recognize a small ovalbumin peptide, OVA_{323–339}) are skewed to a Th-1 phenotype by IL-12 and after culture are i.v. transferred followed by immunization of OVA in CFA and challenged with heat aggregated OVA (HAO). This experimental model is characterized by synovial infiltration and CII antibody production [7].

In the last two decades there has been a marked increase in inflammatory autoimmune diseases including multiple sclerosis (MS), type 1 diabetes (T1D), inflammatory bowel diseases (IBD: chron's disease and ulcerative colitis), rheumatoid arthritis (RA), as well as allergy, especially in developed countries. The observation that early and constant contact with pathogens reduced allergy was introduced by David Strachan, which led to the now known hygiene hypothesis, which was later modified to include autoimmune diseases [8]. The increase in hygiene, use of antibiotics, and less contact with infectious agents like helminths and their products appear to be factors in the raise of allergic and autoimmune diseases [9]. Helminth parasites are known to modulate exacerbated immune responses; evidence of this comes from the observations that the incidence of allergy and autoimmune diseases is lower in underdeveloped countries where contact with helminths is constant [9].

The growing reports on experimental models of helminth-based therapy for relieving symptoms of inflammatory autoimmune diseases have showed promising results [10], recently our group has proven that infection with *Taenia crassiceps* reduced incidence and severity to T1D [11] and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE, a model for MS) [12], and protection was associated with the immune-regulatory mechanisms induced by the parasite. Thus, the focus of this research was to characterize the immune response induced by the infection with *T. crassiceps* on the outcome of experimental RA.

2. Material and Methods

2.1. Mice. Six-to seven-week-old male BALB/cAnN mice were purchased from Harlan Laboratories (Mexico) and were used as adoptive transfer recipients. Ten-to twelve-week-old male DO11.10 BALB/c TCR Tg mice that contain CD4⁺ T cells expressing a TCR that recognizes the chicken OVA_{323–339} peptide complexed with the MHC class II molecule I-A^d (detected by the clonotypic mAb KJ1.26) were obtained from The Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine USA); all animals were housed in a pathogen-free environment at the FES-Iztacala, U.N.A.M. animal facility in accordance with Institutional and National guidelines.

2.2. Parasites and Infection. Metacestodes of *Taenia crassiceps* were harvested in sterile conditions from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2–4 months of infection. The cysticerci were washed four times in sterile phosphate buffered saline 1X (PBS 1X; 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and used for mouse infection. Mice were infected with an intraperitoneal (i.p.) injection of 20 small, nonbudding cysticerci of *T. crassiceps* suspended in 0.3 mL of sterile PBS 1X.

2.3. Induction of Experimental RA. After DO11.10 BALB/c TCR Tg mice were humanly sacrificed, spleens were extracted and CD4⁺ T cells were purified by positive selection with anti-CD4⁺ mAbs bound by anti-IgG MACS beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), according to manufacturer's instructions. APCs were obtained from the peritoneal cavity and cultured for 2 h in supplemented RPMI medium, then washed twice with RPMI to discard nonadherent cells from the plates (Costar, MA, USA). Th1 cell differentiation was carried out culturing 2×10^5 /mL CD4⁺ T cells with 2×10^6 /mL APC, 0.3 μ M OVA_{323–339}, and 5 ng/mL IL-12 (Peprotech Rocky Hill, NJ, USA) and 10 μ g/mL anti-IL-4 mAb. After 72 hours of culture, cells were washed and harvested for cell transfer. A total of 2×10^6 DO11.10 CD4⁺ cells was injected i.v. via the tail vein into BALB/c recipient mice, and control mice received sterile PBS 1X only. One day after adoptive transfer, mice were immunized (subcutaneous, s.c.) with 100 μ g of OVA in CFA [7].

2.4. Assessment of Experimental RA. Ten days after immunization with OVA in CFA, all animals were injected s.c. close to both rear ankle joints with 100 μ g of HAO. Mice were monitored for sign of arthritis, and disease was scored based on erythema and swelling in each paw on a scale of 0–3, giving a maximum score of 6 per mouse. Paw thickness was measured for seven days with a dial caliper (Mitutoyo, Japan).

2.5. Histology. Mice were sacrificed, and hind paws were removed and fixed in paraformaldehyde. Tissue was, then, processed and embedded in paraffin; 7 μ m sections were cut for histological analysis and stained with H&E.

2.6. Anticollagen Specific IgG1 and IgG2 Abs Detection. Briefly, 96 well microplates (Nunc, Denmark) were coated with CII

diluted in 0.1 M de NaHCO₃ (pH 9.6) to a final concentration of 10 µg/mL; 100 µL of the solution was added to each well and stored overnight at 4°C, then plate were washed twice in PBS 1X 0.05% Tween 20 (USB Corporation, USA, washing buffer). Plates were blocked in PBS 1X in 1% BSA (blocking buffer) by adding 200 µL of the solution to each well and incubated 1 h at 37°C, then washed three times in washing buffer. Serum samples were diluted in series starting at 1:50 in blocking buffer, and 100 µL of the diluted samples was added to the microplate and incubated 1 h at 37°C, then washed four times in washing buffer. Peroxidase conjugated antimouse IgG1 and IgG2a (Zymed, USA) was diluted at a concentration of 1:1000 in blocking buffer, 100 µL were added to each well, and they were incubated 45 minutes at 37°C. Microplates were washed four times in washing buffer, 100 µL of hydrogen peroxide (3% H₂O₂) in 11 mL of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) was prepared, and 100 µL of the solution was added as substrate to each well; OD values were measured at 405 nm using the Multiskan Ascent Thermo Lab Systems (AIE, USA) microplate reader.

2.7. Cytokine Detection. Peripheral blood was collected from tail snips at day 2, 5, and 15 postchallenge with HAO. Serum cytokine IL-1β, IFN-γ and IL-4 levels were measured by sandwich ELISA using commercial kits purchased from PeproTech (Mexico) following manufacturer instructions. Briefly, captured antibody 2 µg/mL was diluted in 10 mL of PBS 1X, 100 µL was added to each well in 96 well Maxisorb microplate (Nunc, Denmark), and was incubated overnight at 4°C. Microplates were then washed twice with washing buffer, and plates were then blocked by adding 200 µL of blocking buffer to each well and incubated for 2 h at 37°C. Plates were then washed three times in washing buffer. Recombinant mouse cytokines were used for standard curves starting at a concentration of 50 ng to 0.01 ng. Serum samples were diluted at a concentration of 1:5 in 100 µL of blocking buffer, plates were incubated two hours at 37°C. Plates were washed four times in washing buffer, biotinylated antibody final concentration 1 µg/mL was diluted in blocking buffer, and 100 µL of the solution was added to each well, plates were incubated one hour at 37°C, then washed four times in washing buffer. Avidin (PeproTech Inc, USA) was diluted 1:4000 in blocking buffer; 100 µL of the solution was added to each well, and the plates were incubated 30 minutes at 37°C and then washed five times in washing buffer. 100 µL of the same substrate was used as above. OD values were measured at 405 nm using the Multiskan Ascent Thermo Lab Systems (AIE, USA) microplate reader.

2.8. Isolation of Peritoneal Macrophages. After mice were sacrificed at the end of the experiment peritoneal exudates cells (PECs) were obtained using 5 mL of ice cold sterile PBS 1X, and the red blood cells were lysed by resuspending the cells in Boyle's solution. Following two washes, the viable cells were counted by trypan blue exclusion with a Neubauer hemocytometer. PECs were adjusted 1 × 10⁶/mL in modified RPMI medium.

2.9. Antigen Specific Stimulation. Spleens were removed 15 days post-HAO injection, and total cells were counted by trypan blue exclusion and adjusted to 3 × 10⁶ and then plated to a final concentration of 3 × 10⁵ cells/well. Then, cells were cultured with 50 µg/mL of OVA peptide for 72 h, supernatants were then collected and stored until cytokine determination.

2.10. Analysis of Cell Surface Markers in Macrophages. The Fc receptors in peritoneal macrophages were blocked with anti-mouse CD16/CD32 (Biolegend, CA, USA) and then stained with an FITC-conjugated monoclonal antibody against F4/80, PE-conjugated antibodies against PD-L1 and PD-L2, and APC-conjugated antimannose receptor antibody (all obtained from Biolegend). The stained cells were analyzed on a FACs Calibur flow cytometer using Cell Quest software (Becton Dickinson).

3. Results

3.1. Th1 Polarization Was Induced in the DO11.10 CD4⁺ T Cells. CD4⁺ T cells from spleens of DO11.10 mice were purified by positive selection with anti-CD4⁺ mAbs (97.88% were CD4⁺, Figure 1(a)) and 91.88% were KJ1.26⁺ CD4⁺ (Figure 1(b)), and so more than 90% of the CD4⁺ cells were positive for the OVA TCR. Th1 polarization was then induced in these purified cells by coculture of DO11.10 CD4⁺ T cells and macrophages plus IL-12 and OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide. IFN-γ levels were measured in the supernatants to verify the phenotype, and cells stimulated with OVA plus IL-12 produced significantly higher levels of IFN-γ as compared to the cells that received no stimuli (Figure 1(c)). Therefore, DO11.10 CD4⁺ T cells were polarized to a Th1 phenotype.

3.2. Assessment of Experimental Arthritis. Experimental RA was induced by the transfer of Th1-type DO11.10 CD4⁺ T cells in recipient BALB/c mice (RA), and after 6 weeks of infection with *T. crassiceps* (Tc + RA), control mice received unpolarized cells (Control), as well as the infected group (Tc); all groups were immunized with OVA in CFA followed by a periarticular injection near the ankle joints with HAO in both rear paws. RA was then evaluated in the four experimental groups based on erythema and swelling in each paw on a scale of 0-3, giving a maximum score of 6 per mouse for seven days. The not-transferred DO11.10 CD4⁺ T cell Control and Tc groups showed minimum clinical scores compared to the transferred RA and Tc + RA groups. The RA-induced group reached a peak in clinical signs around day 3 with a clinical score around 3 (Figure 2(a)); thereafter, clinical signs were reduced. Similarly, infected RA-induced mice (Tc + RA) reached a peak between days 2-4 with a maximum score of around 2. Tc+ RA group had slightly lower clinical scores than uninfected RA group, but differences were not significant among the two groups. Significant differences were found among the RA versus Control group on days 2-5, as well as with Tc + RA versus Tc group on days 2-4. Furthermore, measurements of paw thickness showed similar results within groups (Figure 2(b)), again the Control and Tc groups

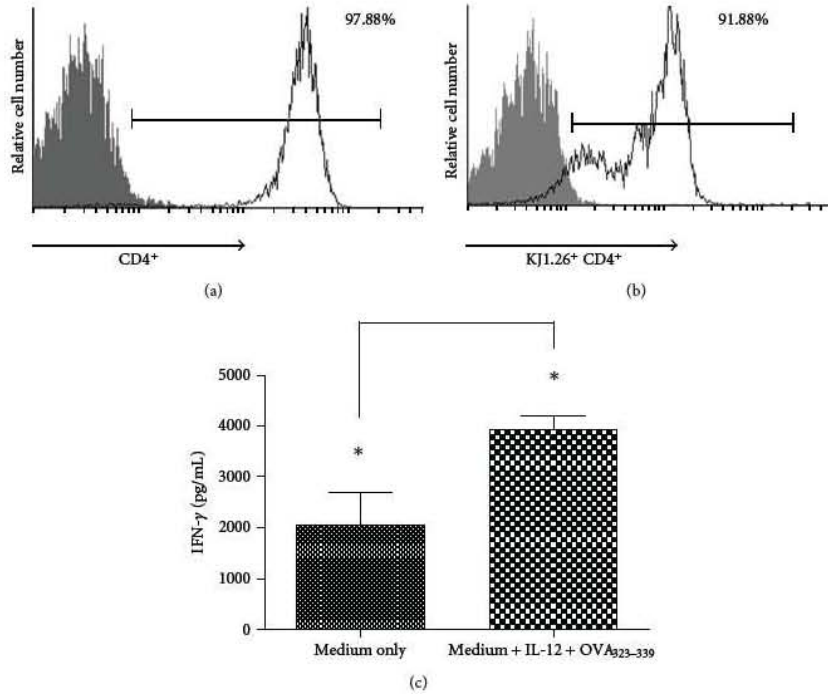


FIGURE 1: KJ1.26⁺ CD4⁺ T cell purification and Th1 polarization of DO11.10 cells. CD4⁺ T cells from spleens of DO11.10 BALB/c TCR Tg mice were purified: (a) 97.88% were CD4⁺ and (b) 91.88% were KJ1.26⁺ CD4⁺. Th1 polarization, then, was induced in purified cells, (c) IFN- γ levels were measured in the supernatant of cocultures of DO11.10 CD4⁺ T cells, and macrophages, IL-12, and OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide were used. * $P < 0.05$, T-test.

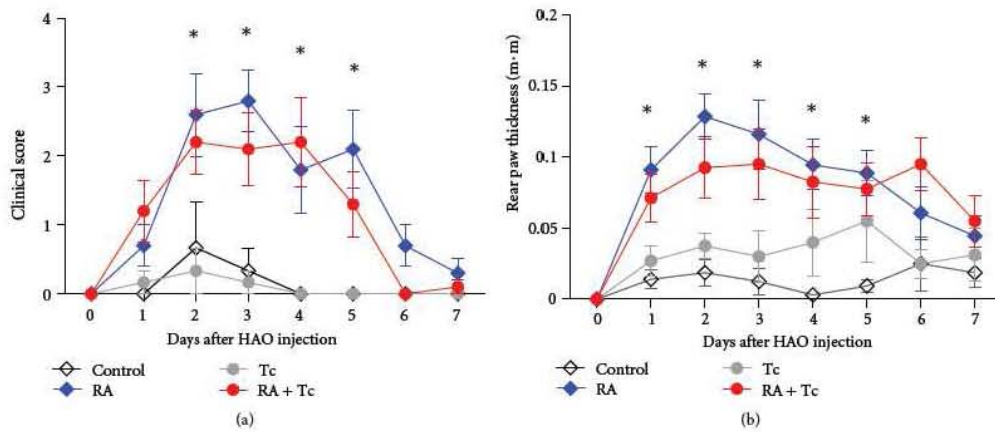


FIGURE 2: Clinical assessment of experimental arthritis. (a) Clinical score was evaluated based on erythema and swelling in each paw on a scale of 0–3, giving a maximum score of 6 per mouse. (b) Paw thickness was measured on both rear paws and was added to obtain an average measure for each mouse; the measures were taken seven days after HAO challenge. Statistical analysis, two-way ANOVA, * $P < 0.05$.

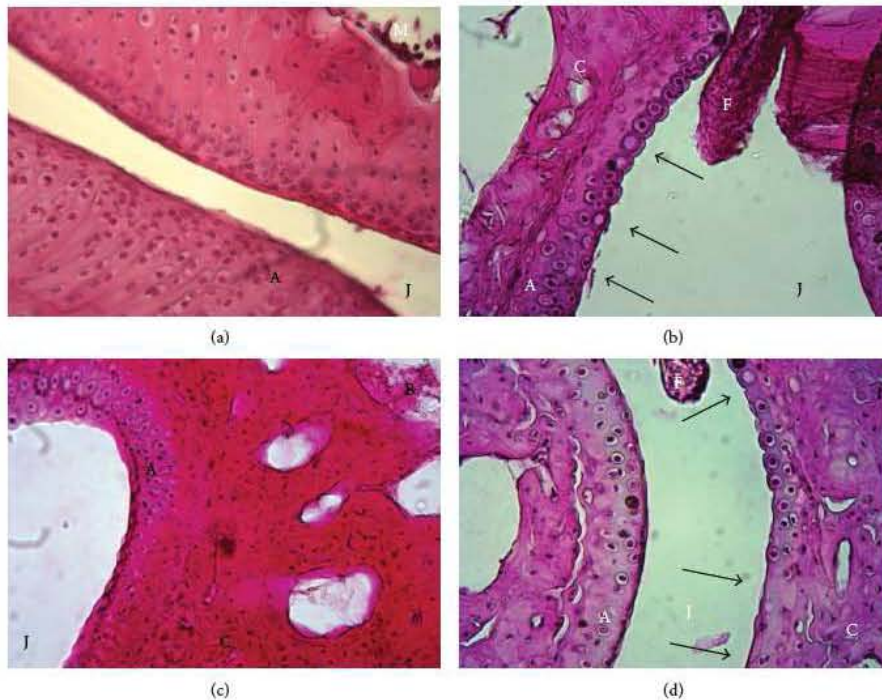


FIGURE 3: Histological evaluation. H and E staining was performed on sections of the distal phalanges joints. (a) Control; (b) RA; (c) Tc; (d) Tc + RA. Arrows show empty chondrocytes as well as isogenic bodies on cartilage. Magnification showed is 40X. J: joint cavity, A: articular cartilage, F: fibrous joint capsule, B: bone, C: calcified cartilage, and M: bone marrow. Arrows show empty chondrocytes as well as isogenic bodies on cartilage.

displayed minimum paw thickness. The RA group showed greater paw swelling than the Tc + RA group, which seem to have a slight tendency to decrease, but was not enough to show statistically significant differences between these groups. In contrast, the Control group showed significant differences with both transferred groups, on days 1–5 with the RA group and on days 2–4 with the Tc + RA group. These similar results obtained from the clinical scores and measurements of the paw thickness showed that infection with *T. crassiceps* does not seem to influence the outcome of experimental RA.

3.3. Histological Evaluation. After experimental RA was induced, 15 days post-HAO injection, all groups of mice were sacrificed; hind limbs were extracted, embedded in paraffin and sections of the distal phalanges joint were stained with H and E. The Control group (Figure 3(a)) and the Tc group (Figure 3(c)) showed normal arrangement of the joint cartilage, unlike the RA group (Figure 3(b)) which displayed empty chondrocytes which are characteristics of cartilage erosion; isogenic bodies were also found which are also commonly found in RA histology due to the fact that chondrocytes are in division trying to replace the loss of these cells in the cartilage of the joints; the same histological

observations were seen in the Tc+RA group as well (Figure 3(d)). Since we found the same type of damage in the Tc + RA group as in the noninfected RA group, these results also indicated that infection with the parasite did not seem to modulate experimental RA.

3.4. Infected- and Experimental RA-Induced Mice Produce Higher Levels of Anti-CII IgG1 and IgG2a Antibodies. Anti-CII antibodies are pathogenic determinants of arthritis, therefore, IgG1 and IgG2a Abs were measured; the Control group produced irrelevant levels of anti-CII IgG1 and IgG2 Abs (Figures 4(a) and 4(b)). Interestingly, both infected groups Tc and Tc + RA produced higher levels of anti-CII IgG1 Abs even than the RA group. A similar finding was observed with anti-CII IgG2a. Labeling experiments have showed that many helminths possess a surface rich in collagen [13], so our data showing higher levels of anticollagen antibodies in the infected groups may be associated with this feature of the helminths surface. Significant differences were also observed in the IgG1 antibodies between the RA versus Tc + RA in the 1 : 10 dilution, whereas in the Control versus Tc + RA groups the difference was observed also in 1 : 20 dilution. In the IgG2a Abs Control versus RA and Control versus Tc + RA showed significant differences in the

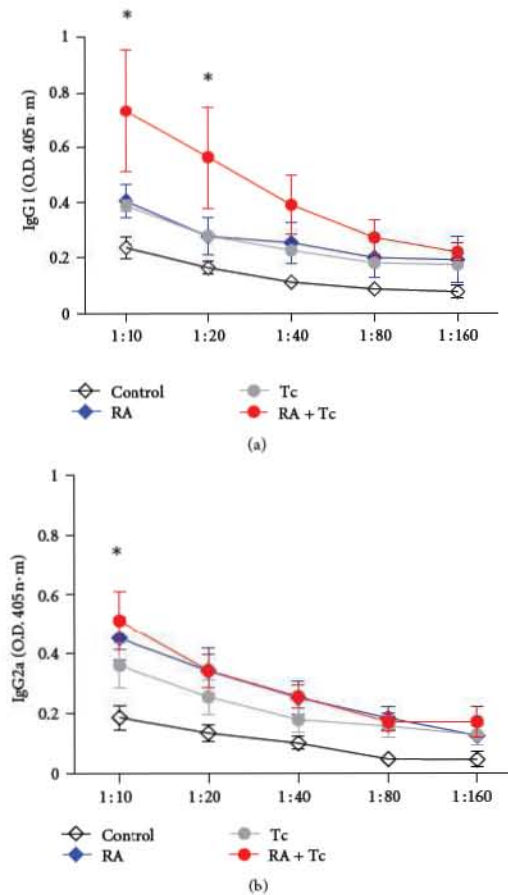


FIGURE 4: Infected and RA-induced mice produce higher levels of serum anti-CII IgG1 and IgG2 antibodies. Levels of (a) anti-CII IgG1; and (b) IgG2a Abs were measured in all of the groups sera were obtained 15 days post-HAO injection. Significant differences were observed in the IgG1 Abs between the RA versus Tc + RA and Tc versus Tc + RA in 1:10 dilution and Control versus Tc + RA in the 1:10 and 1:20 dilutions. In the IgG2a Abs Control versus RA and Control versus Tc + RA showed significant differences in the 1:10 dilution. Statistical analysis, two-way ANOVA, * $P < 0.05$.

1:10 dilution. These results are also in agreement with the data from the clinical score and measurements, since again infection with *T. crassiceps* did not reduce anti-CII IgG1 and IgG2a Abs, on the contrary both specific anti-CII antibodies were augmented.

3.5. Infection with *T. crassiceps* Does Not Modify Systemic Serum Cytokine Levels. Sera from all experimental groups were obtained 5 days post-HAO injection; Th1-type cytokines IL-1 β (Figure 5(a)), IFN- γ (Figure 5(b)) and Th2-type

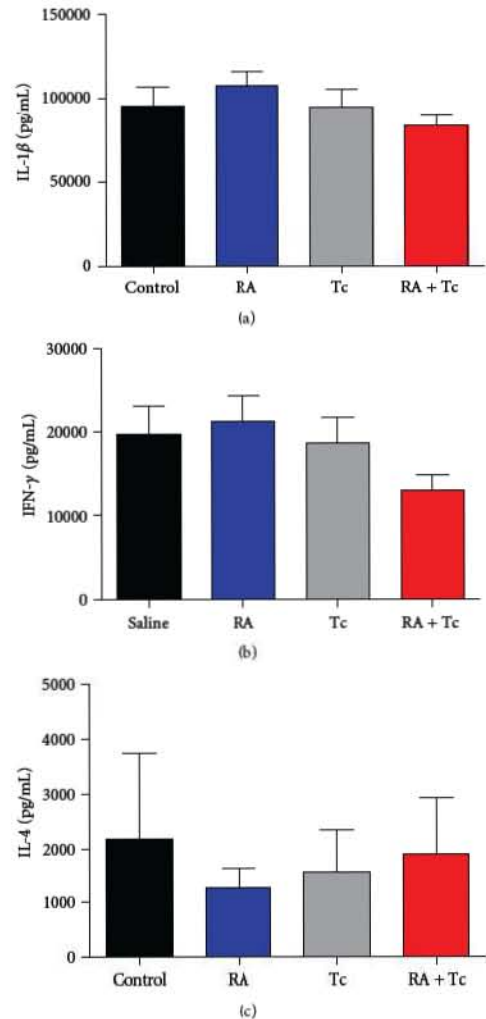


FIGURE 5: Infection with *T. crassiceps* does not modify systemic serum cytokine levels. Sera were obtained 5 days post-HAO injection, IL-1 β , IFN- γ , and IL-4 cytokine levels were measured. No significant differences were observed within the groups.

cytokine IL-4 (Figure 5(c)) levels were measured. We did not observe significant differences within the groups. Although we did observe a tendency to decrease the levels in the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IFN- γ in the infected groups and even more in the Tc + RA group, however, such differences did not reach significant values. Also the Tc + RA group displayed higher levels of IL-4 than Tc group; thus, this effect could be attributed to the parasite. The Control group had higher levels of IL-1 β and IFN- γ than expected; this could have been the result of the strong Th1-type response

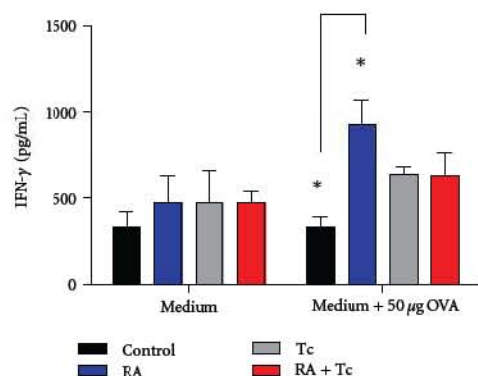


FIGURE 6: Antigen specific IFN- γ production. Splens were extracted and cultured with medium alone or with OVA to determine IFN- γ levels. Significant differences were only observed in the Control versus RA group after stimulation. Statistical analysis, two-way ANOVA, * $P < 0.05$.

induced by the immunization with OVA in CFA followed by the injection of the joints with HAO.

3.6. Antigen Specific IFN- γ Production. In order to determine if the antigen specific response was modified by the presence of *T. crassiceps* infection, total splenocytes were extracted and cultured with medium alone or stimulated with OVA to determine IFN- γ levels in the supernatants. Significant differences were observed in the Control versus RA group after stimulation with OVA, as expected after RA induction with OVA mice produced significant amounts of the Th1 cytokine (Figure 6). In agreement with previous works [14], *T. crassiceps* infection suppresses the antigen specific response of CD4⁺ cells; thus, culture of splenocytes from *T. crassiceps*-infected groups did not produced significant amounts of IFN- γ after they were stimulated with OVA peptide.

3.7. AAM Surface Markers Are Upregulated in the RA-induced *T. Crassiceps*-Infected Mice. Flow cytometry was performed in order to analyze the presence of AAM during RA in mice-bearing *T. crassiceps*. MFI was analyzed on the AAM markers PD-L1 (Figure 7(a)), PD-L2 (Figure 7(b)), and MR (Figure 7(c)), and we found that the Tc + RA group had significantly increased expression of PDL-2 and MR on AAM than the noninfected groups; but in comparison with the Tc group, the differences were not statistically significant, although in both cases again it seems to be a pattern to increase in the Tc + RA group in contrast to the Tc group. AAM are known for their suppressive capacity; PD-ligands down-regulate T cell proliferation through direct contact with their receptor PD-1, usually expressed in T-activated cells [14]. The higher expression of PDL-2 and MR in Tc + RA could be an effect of the immunomodulatory mechanisms turned on for this parasite to down regulate the inflammatory response from the RA.

4. Discussion

In recent years there has been development of the now-called "helminth therapy" which basically states that infection with helminths or their products could potentially alleviate and improve inflammatory autoimmune diseases, due to the fact that helminths induce Th2 type phenotype that is able to antagonize the Th1 type phenotype of inflammatory autoimmune diseases as well as induce a series of regulatory cells such as AAMs, Tregs, and myeloid suppressor cells [10]. Proof of this comes from epidemiological observations, clinical studies as well as by experimental models and recent reviews [15].

Our group has recently demonstrated that infection with *T. crassiceps* reduces the incidence and severity of T1D [11], EAE [12], and colitis (unpublished observations) in murine models, and such protection has been associated with immunoregulatory mechanisms induced by this parasite. In contrast, the results showed by this study indicated that infection with *T. crassiceps* metacestodes does not alter the outcome of experimental RA.

Our data revealed that quantification of IgG2a anti-CII antibodies which are used as an indication of RA, showed, as expected, in the Control group almost no production of anti-CII Abs, and the RA group did show significant amounts of antibodies in accordance with the disease, but unexpectedly the Tc + RA group had higher levels of IgG2a Abs compared to the RA group; apparently this could be due to the composition of the parasite itself [13] since the helminth own collagen could be interfering with the actual levels of CII antibodies due to the disease; this is an interesting fact that has not been reported before. Also the level of pro-inflammatory systemic cytokines showed similar results as the assessment of arthritis, where a tendency to decrease in the Tc + RA group was observed, but the other groups had similar amounts of IL-1 β and IFN- γ ; this could be due to the strong effects of the immunization with CFA plus OVA as well as the challenge injection with HAO. Infection with *T. crassiceps* increased expression of PDL-2 and MR which are markers of AAM in the Tc + RA compared to the RA non-infected group; it has been showed that infection with this parasite increased expression of PDL-1 and PDL-2 on AAM [14]; these ligands are involved in the PDLs pathway which is responsible for the inhibition of proliferative response of T cells in a contact-dependent manner. Thus, the increase of PDL-2 expression could be an attempt to inhibit the inflammatory response from arthritis, but, in this case the parasite immune modulation is just not enough to overcome the intense inflammatory response of the experimental RA.

The gold standard model for the induction of experimental RA has been the collagen-induced arthritis (CIA) model, with onset of the disease around day 40-50 after inoculation of the CII, resulting in infiltrating and hyperplastic synovium, erosion of bone and cartilage, thus, displaying a very similar pathology as in humans [16]. Amelioration of CIA has been proven successful in infection with *Schistosoma mansoni* [17] and *S. japonicum* where is stage-dependent [18]; in both cases proinflammatory cytokines were down-regulated in infected mice as compared to noninfected. On the other

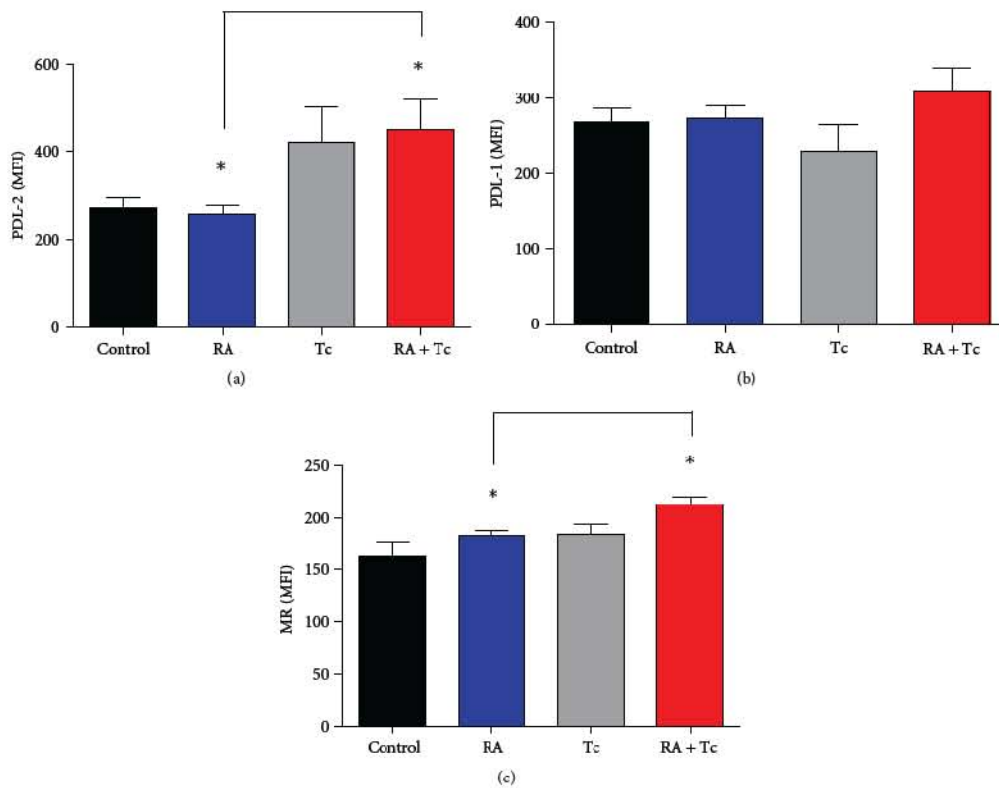


FIGURE 7: Flow cytometry analysis for alternatively activated macrophage (AAM) surface markers. AAM markers are up-regulated in the experimental rheumatoid arthritis induced on *T. crassiceps*-infected mice. Analysis of medium fluorescence intensity (MFI) on AAM markers PD-L1, PD-L2, and MMR was done. Statistical analysis, one-way ANOVA, * $P < 0.05$.

hand, Osada and Kanazawa tried schistosome worm antigens (SWAP) or egg antigens (SEA), and either of them had effects on CIA [15]. Spontaneous arthritis is also another model used for studying this inflammatory disease; here it has been demonstrated that a gastrointestinal helminth such as *Nippostrongylus brasiliensis* [19] was able to down-modulate experimental arthritis. However, it is clear that one can expect that not all the helminth infections as well as the same helminth parasite would be able to cure or ameliorate every single inflammatory disease; in line with this idea, there has been occasions where infection with helminth parasites can turn out a whole range of possibilities as is the case in infection with *Hymenolepis diminuta*, where the infection with this parasite has augmented oxazolone-induced colitis in mice [20]; also this infection did not show any effects in acetic acid-induced ulceration in rats [21]; but, interestingly, infection with *H. diminuta* can be protected in dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS)-induced colitis [22]. Therefore, even when infection is carried out with the same parasite, the outcome of the diseases can greatly vary, as in the case

of *H. diminuta* even when in theory the same disease was being reproduced, although different methods of induction of the disease were used the results reflected an ample spectrum of possibilities. Moreover, another disease where any effect of a helminth infection was not detected was in EAE developed in mice carrying a gastrointestinal infection with *Strongyloides venezuelensis* [23]. Taken together all these data accumulated on helminth therapy, we suggest that more detailed studies are necessary before “generalize” that any single helminth parasite or their derivatives would be useful for any inflammatory or autoimmune disease.

5. Conclusions

Based on the different outcomes of the many studies on “helminth therapy” and even though our group has previously proven that infection with *T. crassiceps* reduces incidence and severity of other inflammatory and autoimmune diseases, it is feasible that *T. crassiceps*, or any other helminth

infection, does not affect the development of some disorders like experimental RA since most of inflammatory or autoimmune diseases have many different components involved that may be not affected by these parasites. Thus, in the context of the potential use of helminths or their molecules as a way to treat or improve the outcome of inflammatory or autoimmune diseases, it deserves larger and deeper studies before giving the title of a "close reality" to the use of such strategy.

Acknowledgments

This work was supported by Grant IN213512 from PAPIIT-UNAM and Grant 167799 from CONACYT. A. M. Ortiz-Flores was supported by a fellowship from CONACYT-Mexico and PAPIIT-UNAM. The authors thank MVZ Leticia Flores and Tomas Villamar for their excellent care of animals and Biologist Ana F. Chavez Sanchez for histology assistance. This article is part of a requirement for A. M. Ortiz-Flores to obtain the Master's degree in Biological Sciences in the field of Experimental Biology from UNAM.

References

- [1] S. E. Gabriel and K. Michaud, "Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 11, no. 3, article 229, 2009.
- [2] G. S. Firestein, "Evolving concepts of rheumatoid arthritis," *Nature*, vol. 423, no. 6937, pp. 356–361, 2003.
- [3] F. M. Brennan and I. B. McInnes, "Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 11, pp. 3537–3545, 2008.
- [4] A. K. Andersson, C. Li, and F. M. Brennan, "Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 10, no. 2, article 204, 2008.
- [5] C. M. Weyand, "New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis," *Rheumatology*, vol. 39, no. 1, supplement, pp. 3–8, 2000.
- [6] J. P. Van Hamburg, P. S. Asmawidjaja, N. Davelaar et al., "Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 63, no. 1, pp. 73–83, 2011.
- [7] P. Maffia, J. M. Brewer, J. A. Gracie et al., "Inducing experimental arthritis and breaking self-tolerance to joint-specific antigens with trackable, ovalbumin-specific T cells," *Journal of Immunology*, vol. 173, no. 1, pp. 151–156, 2004.
- [8] D. P. Strachan, "Hay fever, hygiene, and household size," *British Medical Journal*, vol. 299, no. 6710, pp. 1259–1260, 1989.
- [9] P. Zacccone, O. T. Burton, and A. Cooke, "Interplay of parasite-driven immune responses and autoimmunity," *Trends in Parasitology*, vol. 24, no. 1, pp. 35–42, 2008.
- [10] D. M. McKay, "The therapeutic helminth?" *Trends in Parasitology*, vol. 25, no. 3, pp. 109–114, 2009.
- [11] A. Espinoza-Jiménez, I. Rivera-Montoya, R. Cárdenas-Arreola, L. Morán, and L. I. Terrazas, "Taenia crassiceps infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes," *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 850541, 11 pages, 2010.
- [12] J. L. Reyes, A. F. Espinoza-Jiménez, M. I. González, L. Verdía, and L. I. Terrazas, "Taenia crassiceps infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis," *Cellular Immunology*, vol. 267, no. 2, pp. 77–87, 2011.
- [13] R. M. Maizels, E. J. Pearce, D. Artis, M. Yazdanbakhsh, and T. A. Wynn, "Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 10, pp. 2059–2066, 2009.
- [14] L. I. Terrazas, D. Montero, C. A. Terrazas, J. L. Reyes, and M. Rodríguez-Sosa, "Role of the programmed death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis," *International Journal for Parasitology*, vol. 35, no. 13, pp. 1349–1358, 2005.
- [15] Y. Osada and T. Kanazawa, "Parasitic helminths: new weapons against immunological disorders," *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 743758, 9 pages, 2010.
- [16] D. L. Asquith, A. L. Miller, I. B. McInnes, and F. Y. Liew, "Autoimmune disease: rheumatoid arthritis," *European Journal of Immunology*, vol. 39, pp. 1991–2058, 2009.
- [17] X. Song, J. Shen, H. Wen et al., "Impact of Schistosoma japonicum infection on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: a murine model of human rheumatoid arthritis," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 8, Article ID e23453, 2011.
- [18] Y. He, J. Li, W. Zhuang et al., "The inhibitory effect against collagen-induced arthritis by Schistosoma japonicum infection is infection stage-dependent," *BMC Immunology*, vol. 11, article 28, 2010.
- [19] M. C. Salinas-Carmona, G. de la Cruz-Galicia, I. Pérez-Rivera et al., "Spontaneous arthritis in MRL/lpr mice is aggravated by Staphylococcus aureus and ameliorated by Nippostrongylus brasiliensis infections," *Autoimmunity*, vol. 42, no. 1, pp. 25–32, 2009.
- [20] A. Wang, M. Fernando, G. Leung, V. Phan, D. Smyth, and D. M. McKay, "Exacerbation of oxazolone colitis by infection with the helminth Hymenolepis diminuta: involvement of IL-5 and eosinophils," *American Journal of Pathology*, vol. 177, no. 6, pp. 2850–2859, 2010.
- [21] D. M. McKay and J. L. Wallace, "Acetic acid induced ulceration in rats is not affected by infection with hymenolepis diminuta," *Journal of Parasitology*, vol. 95, no. 2, pp. 481–482, 2009.
- [22] M. M. Hunter, A. Wang, K. S. Parhar et al., "In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 4, pp. 1395–1405, 2010.
- [23] F. Chiuso-Minicucci, D. B. Van, S. F. G. Zorzella-Pezavento et al., "Experimental autoimmune encephalomyelitis evolution was not modified by multiple infections with Strongyloides venezuelensis," *Parasite Immunology*, vol. 33, no. 5, pp. 303–308, 2011.

Discusión

Basados en la hipótesis de la higiene, recientemente se ha desarrollado la idea de la "terapia de helmintos". La cual postula que la infección con helmintos o sus productos puede potencialmente aliviar y mejorar los síntomas de enfermedades inflamatorias autoinmunes; debido a que los helmintos inducen un fenotipo Th2 el cual puede antagonizar el fenotipo Th1/Th17 de las enfermedades autoinmunes inflamatorias (McKay D.M., 2009). Prueba de esto viene de observaciones epidemiológicas, estudios clínicos así como también de modelos experimentales como fue revisado recientemente por Osada y Kanazawa en el 2010, y por McKay en el 2009.

Existe una creciente evidencia epidemiológica en cuanto a los efectos protectores de la infección con helmintos en enfermedades alérgicas y autoinmunes; se ha visto en individuos infectados con *Schistosoma*, en los cuales se han reducido las enfermedades atópicas (Araujo M.I, *et al.* 2004). En Japón, se demostró una correlación inversa entre enfermedades autoinmunes del hígado y la infección con *Strongyloides stercoralis* (Aoyama H., *et al.* 2007). En una revisión de estudios transversales se observó la relación entre la respuesta a la reacción atópica y las infecciones con helmintos. Se observó un gran número de estudios con efectos protectores a la respuesta de la prueba cutánea de alergias relacionado a la infección con helmintos. Cabe resaltar que algunos estudios no fueron significativos y se reportó una asociación positiva a la atopía en la infección con *Ascaris lumbricoides* (Flohr C., *et al.* 2009). Este mismo efecto también se ha demostrado con otras enfermedades ya que se encontró una relación inversa entre la infección con geohelmintos (principalmente *N. americanus*) y el *asthma*. Aunque en un estudio se encontró que, *A. lumbricoides* aumenta el riesgo de *asthma* (Leonardi-Bee J., *et al.* 2006), a su vez la infección con *T. trichiura* no tuvo ningún efecto significativo en esta enfermedad (Flohr C., *et al.* 2009).

Por otro lado, en modelos experimentales se ha demostrado una mejoría en enfermedades alérgicas y autoinmunes; como el *asthma*, hipersensibilidad en las vías respiratorias, encefalomiелitis autoinmune experimental, diabetes tipo I y colitis; por la infección con diversos helmintos, como *Schistosoma mansoni* y *S. japonicum*, *Acanthocheilonema vitae*, *Fasciola hepatica*, *Litomosoides sigmodontis*, *Heligmosoides polygyrus*, *Hymenolepis diminuta*, *T. suis* y *A. summ* o sus productos (Zaccone P., *et al.* 2006; McKay D.M., 2009; Osada Y. y Kanazawa T., 2010).

Particularmente en el caso de *T. crassiceps*, nuestro grupo demostró recientemente que la infección con este parásito reduce la incidencia y severidad de DT1 (Espinoza-Jiménez A. *et al.*, 2010), EAE (Reyes J.L.

et al., 2011) y colitis (observaciones no publicadas) en modelos murinos; la protección fue asociada con mecanismos inmunoreguladores inducidos por el parásito.

Por lo cual, en el presente trabajo se estudió el impacto de la infección con *T. crassiceps* en el desarrollo de la AR experimental inducida por un antígeno. La AR se valoró por la puntuación clínica, que se basa en la evaluación del eritema e inflamación de las extremidades. Observamos que el grupo de AR (inducido con AR) obtuvo el mayor puntaje comparado con el grupo de Tc + AR (infectado con *T. crassiceps* e inducido con AR), aunque se observó una ligera disminución, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. De igual forma la medición directa de las articulaciones presentó el mismo patrón. La valoración nos reveló que la infección con *T. crassiceps* no influyó en la disminución de la inflamación y eritema de las articulaciones. Estas observaciones, coincidieron con los cortes histológicos los cuales mostraron que ambos grupos de ratones AR y Tc +AR manifestaban las mismas características de daño por la erosión del hueso.

Además, al llevar a cabo la cuantificación de anticuerpos anti-CII, los cuales son usados como una indicación de la AR. Los datos revelaron que, como se esperaba el grupo Control tuvo una producción insignificante de anticuerpos anti-CII, el grupo de AR sí presentó valores significativos de anticuerpos, pero inesperadamente el grupo de Tc +AR mostró niveles más altos de anticuerpos IgG2a comparado con el grupo de AR. Lo anterior podría ser debido a la composición de la cutícula del parásito ya que experimentos de marcaje han demostrado que la superficie de los helmintos es rica en colágena (Maizels R.M., 2009). Por lo cual, la colágena del propio helminto podría estar interfiriendo con los niveles de anticuerpos de CII que son debidos propiamente a la AR; este es un dato interesante ya que no ha sido reportado antes.

Asimismo, el nivel de citocinas sistémicas pro-inflamatorias mostró resultados similares a la evaluación clínica. Se observó una tendencia a disminuir en el grupo de AR + Tc pero el resto de los grupos presentaron niveles similares y más elevados de IL-1 β e IFN- γ . Lo anterior podría ser debido a los fuertes efectos de la inmunización con CFA y OVA, así como por la inyección de HAO a nivel sistémico.

La infección con *T. crassiceps* aumentó la expresión de PDL-2 y MR, los cuales son marcadores de MAA, en el grupo de AR+Tc comparado con el grupo de AR no infectado. Se ha demostrado que la infección con el parásito incrementa la expresión de PDL-1 y PDL-2 en MAA (Terrazas L.I., 2005). Estos ligandos están involucrados en la vía de los PDL la cual es responsable de la inhibición de la respuesta proliferativa de células T de manera contacto dependiente. El incremento de PDL-2 podría ser un intento de inhibir la

respuesta inflamatoria de la artritis, pero los mecanismos de inmunomodulación no son suficientes para contrarrestar la respuesta inflamatoria de la AR. Otra posibilidad es que, en el presente trabajo los MAA fueron obtenidos después de la semana 12 post-infección y hemos observado que la expresión de estos ligandos, no es tan marcada en etapas tan crónicas de la infección. Esto podría explicar la no tan marcada diferencia en la expresión de los PDL en ambos grupos de ratones infectados.

Dentro de los modelos experimentales de AR, el modelo estándar es el de artritis inducida por colágeno (CIA). En éste, la artritis se desarrolla aproximadamente alrededor del día 21 de la inmunización con una emulsión compuesta por colágeno de tipo II heterólogo y CFA; después se alcanza un punto máximo en la inflamación entre el día 40-50 post inmunización. La cepa de ratones que se utiliza en la CIA es la cepa DBA/1, aunque ahora se reconoce la susceptibilidad en otras cepas de ratón que tengan haplotipos MHC II H-2^q, H-2^r o H-2^b. La patogénesis de este modelo resulta en infiltración e hiperplasia del sinovio, erosión del cartílago y hueso reflejando una patología similar a los humanos (Asqith D.L., *et al.* 2009). Debido a que el modelo de CIA es el modelo estándar en la inducción de AR, se han realizado ya estudios de inducción de CIA e infección con helmintos. Se ha demostrado una mejora en la CIA por la infección con *S. mansoni* (Osada Y., *et al.* 2008) y en etapas agudas de la infección con *S. japonicum* (He Y., *et al.* 2010), en ambos casos las citocinas pro-inflamatorias fueron reguladas negativamente en los ratones DBA/1 infectados comparados con los no infectados. El mismo fenómeno se ha observado con *A. summ* (Castro Rocha F.A. *et al.* 2008) y la glicoproteína ES-62 de *A. vitae* (McInnes I.B. *et al.* 2003). Por otro lado, Osada y Kanazawa usaron antígeno del gusano adulto de *Schistosoma spp.* (SWAP) o antígeno de huevo (SEA) y ninguno de los dos antígenos tuvo efectos en la CIA (observaciones no publicadas). A diferencia de la CIA, hasta la fecha no se han llevado a cabo estudios de inducción de AR por transferencia de células T CD4⁺ transgénicas e inmunización con antígeno de OVA e infección con algún helminto.

Por otra parte el modelo de AR inducida por antígeno tiene la ventaja de ser más corto en cuanto al tiempo, lo cual lo hace un buen modelo para la investigación de la AR en etapas agudas de la enfermedad. Aunque también puede ser una desventaja, ya que se induce una inflamación transitoria, con un pico en la inflamación entre el día 2-3, que para el día 7 está drásticamente disminuida. Comparado con el modelo de CIA, en el cuál se observa un aumento de la inflamación alrededor del día 21 después de la inmunización con CII. La cinética puede variar pero se observa un aumento progresivo que a veces se puede ver hasta el día 60 post-inmunización de la CII. Es también importante considerar la cepa de ratón que se usa, en el modelo de CIA la cepa más usada es DBA/1 ya que es una cepa susceptible a la AR. En el modelo de AR inducida por la transferencia de células T CD4⁺ transgénicas e inmunización con un antígeno de OVA, la

cepa de ratón utilizada fue BALB/c, la cual es resistente a la AR. Aunque al utilizar el modelo antes mencionado no es necesario utilizar una cepa susceptible, el posible impacto podría verse reflejado en la corta duración de la cinética de la inflamación (Brand. D.D., *et al.* 2007).

En ocasiones la infección con helmintos puede generar múltiples resultados cuando se utiliza como un posible modulador de enfermedades inflamatorias, como es el caso de *H. diminuta*. La infección con el parásito aumenta los síntomas de la colitis inducida por oxazolona en ratones (Hunter M.M., *et al.*, 2007), ahora en el caso de la ulceración inducida por ácido acético en ratas no mostro ningún efecto la infección (McKay D.M. y Wallace J.L., 2009) y por lo contrario si se encontró protección en colitis inducida por dinitrobenzeno sulfónico (Hunter M.M., *et al.* 2005). A pesar de que la enfermedad inflamatoria intestinal se puede inducir usando diferentes modelos, la inflamación crónica del intestino es la base común. Sin embargo, aunque la infección se llevó a cabo con el mismo parásito los resultados reflejan un amplio espectro de posibilidades.

Son muchas las variables que se tienen que considerar para entender por qué la infección con *T. crassiceps* no influyó en el desarrollo de la AR experimental con el modelo de AR inducida por la transferencia de células T CD4⁺ transgénicas e inmunización con un antígeno de OVA. Desde el modelo de la AR, la cepa de ratón, infección con el parásito o sus productos, inducción de la AR en diferentes etapas del curso de la infección, determinación de citocinas a nivel sistémico o *in situ*.

Nuestro grupo ha demostrado previamente que la infección con *T. crassiceps* reduce la incidencia y severidad de otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En el presente trabajo se comprobó que, la infección con *T. crassiceps* no modula el desarrollo de la AR experimental inducida por la transferencia de células T CD4⁺ transgénicas e inmunización con un antígeno de OVA.

Conclusiones

- ❖ La infección con *T. crassiceps* no disminuyó la inflamación y eritema de las articulaciones en ratones BALB/c con AR experimental inducida por un antígeno.
- ❖ La evaluación histológica demostró que los ratones infectados con *T. crassiceps* e inducidos con AR y el grupo de ratones no infectados y con AR, manifestaban las mismas características de daño por la erosión del hueso.
- ❖ Los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti-colágeno son mayores en el grupo de ratones infectados con *T. crassiceps* e inducidos con AR que los no infectados con AR.
- ❖ Los niveles de citocinas IL-1 β , IFN- γ e IL-4 no tuvieron diferencias significativas entre los grupos de ratones infectados con *T. crassiceps* e inducidos con AR y los no infectados con AR.
- ❖ Los marcadores PDL-2 y RM de MAA se encontraron regulados positivamente en el grupo de ratones infectados e inducidos con AR.
- ❖ La infección con *Taenia crassiceps* no modula el desarrollo de la artritis reumatoide con el modelo experimental de artritis inducida por un antígeno.

Bibliografía

Aletaha D., *et al.* 2010. Rheumatoid arthritis classification criteria. *Arthritis & Rheumatism*. Vol 62, No. 9 2669-2581.

Aoyama H., *et al.* 2007. An inverse relationship between autoimmune liver diseases and *Strongyloides stercoralis* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol.76. No.5:972-976.

Araujo M.I., *et al.* 2004. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. *Journal of infectious diseases*. Vol.190:1997-1803.

Barberá A y Domínguez M.C. 2004. Características e inmunopatogénesis de la artritis reumatoide. Estado actual en el tratamiento. *Biología Aplicada*. 21:189-201.

Bartok B y Firestein G.S. 2010. Fibroblast-like synoviocytes key effector cells in RA. *Immunological Reviews* 2010. Vol. 233:233-255.

Brand D.D., *et al.* 2007. Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*. Vol. 2 No. 5. 1269-1275.

Castro Rocha F.A., *et al.* 2008. Protective Effect of an Extract from *Ascaris suum* in Experimental Arthritis Models. *Infection and Immunity*. Vol.76 No.6:2736-2745.

Flohr C., *et al.* 2009. Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*. Vol. 39 No.1:20-32.

Francois A., *et al.* 1998. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: A new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? *Am. J. Surg. Pathol.* Vol. 22(4):488-492.

Harnett W. y Harnett M.M. 2006. Molecular basis of worm-induced immunomodulation. *Parasite Immunology*. Vol 28:535-543.

Heldwein K. *et al.* 2006. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*. Vol. 75(1):108-111.

Hochber M.C., *et al.* 2009. *Rheumatoid Arthritis*. Mosley Elsevier.

Hunter M.M., *et al.* 2007. Helminth infection enhances disease in a murine Th2 model of colitis. *Gastroenterology*. Vol 132:1320-1330.

Hunter M.M., *et al.* 2005. Neutralizing anti-IL10 antibody blocks the protective effect of tapeworm infection in a murine model of chemically induced colitis. *Journal of Immunology*. Vol 174(11):7368-7375.

Karouzakis E., *et al.* 2006. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunology Letters*. 106:8-13.

Leonardi-Bee J., *et al.* 2006. Asthma and current intestinal parasite infection. Systemic review and meta-analysis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Vol. 174:514-523.

Lubberts E. 2008. IL-17/Th17 targeting: On the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine*. Vol. 41: 84-91.

McInnes I.B., *et al.* 2003. A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *The Journal of Immunology*. Vol. 171:2127-2133.

McInnes I.B. y Schett G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature reviews immunology*. Vol. 7:429-441.

Muller-Ladner U., *et al.* 2005. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. Vol1. No.2:102-110.

Neumann E., *et al.* 2005. The RANK/RANKL/Osteoprotegerin system in rheumatoid arthritis: New insights from animal models. *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 52 No.10:2960-2967.

Osada Y., *et al.* 2008. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *International Journal for Parasitology*. Vol. 39 No. 4: 457-64.

Raes G., *et al.* 2005. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* Vol.77:321-327.

Rodriguez-Sosa M., *et al.* 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-Biasing ability. *Infection and Immunity* Vol. 70:3656-3664.

Rodríguez-Soza M., *et al.* 2003. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and Immunity*. Vol. 71:1247-1254.

Sweeney S.E. y Firestein G.S. 2004. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol.36. No.3:372-378.

Terrazas L.I y Rodriguez-Sosa M. 2007. Advances in the immunobiology of cisticercosis: Lessons from a murine model. En: Terrazas L.I. *Advances in the immunobiology of parasitic diseases*. Tlalnepantla. Research Signpost. Chapter 7. 11-139.

Terrazas L.I., *et al.* 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cisticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*. Vol. 84:74-81.

Toenjes S.A., *et al.* 1999. The systemic immune response of Balb/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology*. Vol. 118:623-633.

Van Riet E., *et al.* 2007. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology*. Vol.212 475-490.

Zaccone P., *et al.* 2006. Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunology*. Vol. 28:515-523.