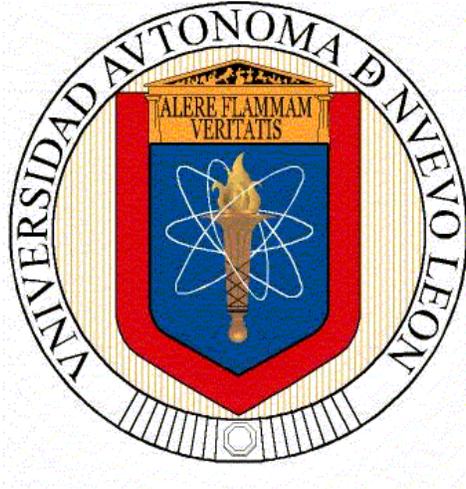


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE HUEVOS DE TRICHURIS  
SUIS EN LA REPARACIÓN DEL TEJIDO INTESTINAL Y  
PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN UN MODELO MURINO DE  
COLITIS.**

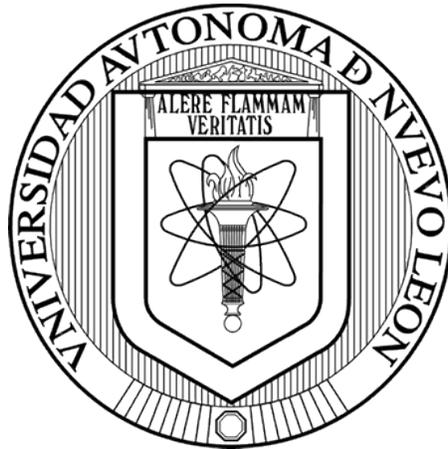
**QUE PRESENTA**

**JUAN ELIUD OBREGÓN CHAGOYA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**JUNIO 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE HUEVOS DE TRICHURIS  
SUIS EN LA REPARACIÓN DEL TEJIDO INTESTINAL Y  
PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN UN MODELO MURINO DE  
COLITIS.**

**QUE PRESENTA**

**MVZ. JUAN ELIUD OBREGÓN CHAGOYA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**JUNIO 2015**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMIA-VETERINARIA



EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE HUEVOS DE TRICHURIS SUIS EN LA  
REPARACIÓN DEL TEJIDO INTESTINAL Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN  
UN MODELO MURINO DE COLITIS.

Aprobación de tesis por el comité particular de

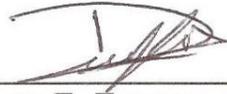
MVZ. Juan Eliud Obregón Chagoya

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan José Zarate Ramos  
Director de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar  
Co-Director

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Moisés Armides Franco Molina  
Co-Director externo

  
\_\_\_\_\_  
MSc. Alicia Magdalena Nevárez Garza  
Co-director

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Diana E. Zamora Avila  
Co-director

ESCOBEDO, N.L. MÉXICO

JUNIO 2015

## **DEDICATORIA**

A mis padres Juan Obregón Rubio y Hortensia Chagoya Alemán, quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera y por su interminable apoyo en todo momento de mi vida.

A mis hermanas Nydia Hortensia Obregón Chagoya y Velia Carolina Obregón Chagoya por el apoyo que me brindaron para seguir adelante siempre.

Para mis amigos que son las personas que han estado más cerca de mí en estos años de universidad impidiendo que me sienta solo, apoyándome y regañándome cuando era necesario, y haciéndome pasar momentos inolvidables.

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. Juan José Zarate Ramos por la colaboración como director principal en la presente investigación, así como sus sabios consejos.

Al Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar por su colaboración como co-director, por apoyarme con sus conocimientos, clases y regaños que me ayudaron para poder terminar este trabajo.

Al MSc Alicia M. Nevares Garza por su participación como co-director, por apoyarme con sus conocimientos, consejos y apoyo que me ayudaron a poder terminar este trabajo.

A la facultad de Biología, especialmente al departamento de Inmunología con el Dr. Moisés A. Franco Molina y a Erika Evangelina Coronado Cerda que me permitió el uso del equipo de citometría de flujo y por su apoyo en los análisis realizados.

A la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila, por su apoyo y colaboración como co-director, revisión y orientación en lo referente al trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio Erika Jeanneth, Cinthia Mabel, Abel Antonio, Israel Alejandro, por su ayuda sin las cuales este trabajo hubiera sido más difícil, así como su amistad.

A los entrañables amigos que he conocido durante este periodo de mi vida, a Cecilia Ramírez, Alejandra Patraca, Oscar Garza y Andrea González.

## ABREVIATURAS

EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
CU	Colitis ulcerativa
EC	Enfermedad de Crohn
<i>T. suis</i>	<i>Trichuris suis</i>
Th	Células T cooperadoras
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
5-ASA	Acido 5 aminosalicílico
AZA	Azatioprina

TNBS	Acido trinitobenceno sulfónico
DNBS	Acido sulfónico dinitrobenceno
VO	Vía oral
IP	Intraperitoneal
PE	Ficoeritrina
NaOH	Hidróxido de sodio

# ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO .....	v
ÍNDICE DE GRAFICAS .....	vii
RESUMEN .....	viii
1.- INTRODUCCION .....	1
2.- REVISION BIBLIOGRAFICA .....	3
2.1.- EL PARÁSITO DE <i>Trichuris suis</i> .....	3
2.1.1.- Morfología .....	3
2.1.2.- Ciclo biológico de <i>Trichuris suis</i> .....	4
2.2. – ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL .....	5
2.2.1.- Etiología y patogénesis .....	5
2.2.2.- Tratamiento .....	6
2.2.2.1.- Aminosalicilatos .....	7
2.2.2.2.- Corticoides .....	8
2.2.2.3.- Inmunomoduladores .....	10
2.2.2.3.1.- Antimetabolitos de la purina .....	10
2.2.2.3.2.- Ciclosporina .....	11
2.2.2.3.3.- Metotrexato .....	11
2.3.- HELMINTO TERAPIA .....	12
3.- OBJETIVO .....	16
3.1.- Objetivo general .....	16
3.2.- Objetivo particulares .....	16
4.- HIPOTESIS .....	16
5.- JUSTIFICACIÓN .....	17
6.- MATERIALES Y METODOS .....	18
6.1.- Diagrama de flujo del experimento .....	18
6.2.- Lugar del estudio .....	19
6.3.- Elección de los animales .....	19
6.4.- Formación de los grupos de animales .....	19
6.5.- Inducción experimental de la colitis .....	20

6.6.- Obtención del material biológico para realizar la inoculación experimental .....	20
6.7.- Inoculación experimental de huevos de <i>T. suis</i> .....	21
6.8.- Sacrificio y Toma de muestras .....	21
6.9.- Estudio histopatológico.....	21
6.10- Análisis de citocinas por citometría de flujo.....	21
7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
8.- RESULTADOS.....	24
8.1.- Inducción enterocolítica en ratones balb/c con TNBS .....	24
8.2.- Resultados de la medición de las citocinas.....	28
9.- DISCUSION .....	32
10.- CONCLUSIONES .....	36
11.- BIBLIOGRAFÍA.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Corte histológico del Intestino día 3 (H&E).....	24
Figura 2.- Corte histológico del intestino día 5 (H&E).....	25
Figura 3.- Corte histológico de intestino al día 15 (H&E).....	25
Figura 4.- Corte histológico de intestino al día 20 (H&E).....	26
Figura 5.- Corte histológico de intestino al día 28 (H&E).....	26
Figura 6.- Corte histológico de intestino al día 41 (H&E).....	27
Figura 7.- Corte histológico de intestino al día 41 (H&E).....	27

## ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1.- Producción de TNF- $\alpha$ .....	28
Grafica 2.- Producción de INF- $\gamma$ .....	29
Grafica 3.- Producción de IL-5 .....	30
Grafica 4.- Producción de IL-4 .....	30
Grafica 5.- Producción de IL-2 .....	31

## RESUMEN

El *Trichuri suis* (*T. suis*) es un helminto de la familia Trichuridae que parasita el tracto entérico de los cerdos. La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad del tracto gastrointestinal que se manifiesta como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. Se sugiere que los factores ambientales y genéticos son importantes en la patogénesis de la EII que está asociado con la desregulación del sistema inmune. Las células del sistema inmune se dividen en dos subgrupos Th1 y Th2. La enfermedad de Crohn se mantiene por una respuesta inmune de Th1, mientras que las helmintiasis polarizan una respuesta inmune de Th2. En este trabajo, se analizó el efecto de la administración de huevos de *T. suis* en el tracto digestivo de ratones con un proceso inflamatorio a nivel entérico. La colitis fue inducida mediante la administración de ácido trinitobenceno sulfónico (TNBS), el tratamiento se realizó administrando una dosis de 750 huevos de *Trichuris suis* en intervalos de 7 días durante un periodo de 3 semanas. Los ratones fueron sacrificados para la evaluación histológica y la toma de muestra de sangre para el análisis de citocinas. El análisis histológico reveló que la colitis se mantuvo hasta 41 días con 5 dosis de TNBS. El tratamiento con huevos de *T. suis* en el modelo de colitis resultó en un incremento en la IL-4 y en una reducción no significativa del TNF y la IL-2, lo cual se correlacionó con el análisis histológico donde se reveló la presencia de inflamación y el inicio de un proceso de reparación.

## 1.- INTRODUCCION

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad inflamatoria crónica recurrente del tracto gastrointestinal que se manifiesta como la colitis ulcerosa (CU) o enfermedad de Crohn (EC) (R. W. Summers, Elliott, Urban, Thompson, & Weinstock, 2005).

La naturaleza crónica y progresiva, así como las secuelas de la EII requieren un tratamiento a largo plazo para poder contrarrestar los efectos inflamatorios y sistémicos. Se han evaluado varios medicamentos para la inducción de la remisión de la EC. Los tratamientos actuales encaminados a mantener un estado de remisión de la EC (Bosques Padilla, 2000).

*Trichuris suis* (*T. suis*) es un helminto de la familia Trichuridae que parasita a los cerdos (García, 1999). Cuando los cerdos ingieren huevos que contienen larvas infectivas, estas son liberadas en el intestino. Los nematodos maduran en el lumen intestinal, una vez que han alcanzado el estado adulto se establecen en el ciego e intestino grueso e inician la producción de huevos mismos que son eliminados a través de las heces del hospedador. Los huevos no son infecciosos hasta que se han incubado en el suelo en condiciones óptimas de humedad y temperatura (R. J. Beer, 1973).

La inflamación crónica de la enfermedad de Crohn se mantiene por una respuesta inmune de células T cooperadoras (Th) en donde se producen grandes cantidades de Interferón gamma (IFN-  $\gamma$ ), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y bajos niveles de Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-10 (IL-10) (Braegger & MacDonald, 1994). Los helmintos polarizan la respuesta inmunitaria de sus portadores a una de tipo Th2, evadiendo la respuesta Th1 que debiera ocurrir bajo condiciones normales. La respuesta inmunitaria tipo Th2 se caracteriza por un aumento de células T CD4+ que secretan citocinas como la IL-4, Interleucina-5 (IL-5),

Interleucina-9 (IL-9) e Interleucina-13 (IL-13); además, los eosinófilos, células cebadas y basófilos, se incrementan en la sangre y en el sitio de infección (Erb, 2007).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la administración de huevos de *Trichuris suis* en el curso de una colitis aguda inducida mediante el uso de TNBS en el cual se evaluó la reparación del tejido y la producción de citocinas en un modelo murino.

## **2.- REVISION BIBLIOGRAFICA**

### **2.1.- EL PARÁSITO DE *Trichuris suis***

El *T. suis* es un nematodo patógeno de los cerdos que se encuentra dentro del 50-70% de las explotaciones de iniciación/finalización. En lechones produce una diarrea acuosa con sangre asociada a la migración de las larvas y la re-emergencia del estadio de Larva 3 de la mucosa del colon. La infección en cerdos con *T. suis* es difícil de diagnosticar ya que sus síntomas se parecen a muchos otros trastornos gastrointestinales comunes en cerdos. Gran parte de la patología se produce mientras el parásito se encuentra en etapas inmaduras y la producción de huevos por las hembras es escasa. El diagnóstico presuntivo de Trichuriasis a menudo se hace en base a la falta de respuesta al tratamiento con antihelmínticos. Por desgracia, los lechones que sobreviven suelen sufrir pérdida de peso significativa, anemia y anorexia, que no se puede recuperar después de que se instituyó el tratamiento antihelmíntico apropiado (Batte, McLamb, Muse, Tally, & Vestal, 1977; Hill, Romanowski, & Urban Jr, 1997; Parthasarathy & Mansfield, 2005).

#### **2.1.1.- Morfología**

Las etapas de huevo y larvas de *T. suis* se pueden caracterizar de la siguiente manera:

El huevo: tiene forma de barril, posee una membrana gruesa que consta de tres capas exteriores y una membrana vitelina fina interior, es operculado en cada extremo.

Larva 1: tiene la presencia de una lanza oral, esófago mal definido y un tracto intestinal que consiste en material granulado indiferenciado.

Larva 2: tiene una diferenciación de los órganos del cuerpo y la presencia de los órganos reproductivos indiferenciados.

Larva 3: desarrollo inicial del sistema reproductivo y desarrollo de una cloaca en el macho distinguiéndose así los sexos.

Larva 4: diferenciación del sistema reproductivo en vagina, útero, oviducto y ovario en las hembras, y los testículos, conducto deferente, conducto eyaculador, espícula y espícula del músculo, en el macho.

Larva 5 y adulto: desarrollo completo de los órganos sexuales, incluyendo la formación del orificio vulvar y los huevos en la hembra y la vesícula seminal en el macho (R. J. S. Beer, 1973a).

### **2.1.2.- Ciclo biológico de *Trichuris suis***

El inicio de la infección por *T. suis* comienza con la etapa de Larva 1 dentro del huevo, el cual se ha demostrado ser influenciado por la temperatura. Después de la ingestión de los huevos por el cerdo, todo el desarrollo larval se produce en la mucosa del intestino en las partes del ciego y el colon. Los huevos eclosionan en la región distal del intestino delgado y en todo el intestino grueso (Kringel, Iburg, Dawson, Aasted, & Roepstorff, 2006). Las larvas penetran la mucosa del ciego y colon a través de las criptas de Lieberkühn, donde entran en las células que recubren las criptas. La fase histotrófica subsiguiente dura 13 días, durante el cual se da una migración gradual de las larvas a partir de las regiones más profundas de la lámina propia a zonas debajo de la superficie del epitelio de la mucosa intestinal. El desarrollo luminal es visto durante el día 16, cuando se observan las extremidades posteriores de las larvas en el lumen del intestino, a partir del día 20 toda la región posterior del cuerpo de la larva está expuesto,

mientras que la región filamentosa del parásito se mantiene incrustada en la superficie de la mucosa. El periodo prepatente dura del día 41 al 47. Se observan cuatro mudas durante el desarrollo en el huésped y se producen en los días 10 (Larva 2), 16(Larva 3), 20(Larva 4), 32(Larva 5) y 37(etapa adulta) (R. J. S. Beer, 1973b; Parthasarathy & Mansfield, 2005).

## **2.2. – ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

### **2.2.1.- Etiología y patogénesis**

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) comprende dos patologías muy relacionadas, la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), las cuales son enfermedades multifactoriales cuya etiología se desconoce. Aunque la patogénesis exacta no se conoce bien, hay evidencia de que se trata de las interacciones entre el sistema inmune, la susceptibilidad genética y el medio ambiente, sobre todo la flora bacteriana. Los mecanismos de iniciación contra la progresión y la cronicidad bien pueden ser distintos (Elson, Sartor, Tennyson, & Riddell, 1995).

La CU es una enfermedad idiopática recurrente-remitente de un trastorno inflamatorio que afecta al colon, caracterizado por diarrea y sangrado rectal, la etiología molecular del desarrollo de CU es compleja e implica la genética, la flora bacteriana, el medio ambiente y otros factores desconocidos. La mayoría de los pacientes desarrollan CU entre las edades de 15 a 30 años, aunque los individuos de 50 a 70 años forman otro grupo de riesgo potencial (Low, Nguyen, & Mizoguchi, 2013) .

Existen distintas definiciones de la EC. No obstante, todas ellas suelen coincidir en que es una enfermedad inflamatoria intestinal de origen idiopático que puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano, la afectación suele ser focal, segmentaria,

asimétrica y discontinua. Puede afectar a todas las capas de la pared del tubo digestivo (transmural) con la consiguiente posibilidad de apariciones de fisuras, fistulas y abscesos (De Dios Duarte, De Roda, Astray, & Diaferia, 2012).

La etiología de la EII se ha estudiado ampliamente en las últimas décadas; sin embargo, se cree que la EII está asociada con la industrialización de las naciones, con las mayores tasas de incidencia y prevalencia en Norteamérica y Europa. La incidencia anual de CU fue de 24.3 por 100.000 personas en Europa, 6.3 por 100.00 personas en Asia y Medio Oriente y de 19.2 por 100.000 personas en Norteamérica. La incidencia anual de EC fue de 12.7 por 100.000 personas en Europa, 5.0 personas en Asia y Medio Oriente y de 20.2 por 100.000 personas en Norteamérica. Los valores de prevalencia más alto reportado para la EII fueron en Europa con CU de 505 personas por cada 100.000; de EC de 322 personas por cada 100.000 y en Norteamérica fueron de CU 249 personas por cada 100.00; EC de 319 personas por cada 100.000 (Molodecky et al., 2012).

### **2.2.2.- Tratamiento**

El tratamiento de la EII se basa en el uso de agentes antiinflamatorios no específicos como son los aminosalicilatos, los corticoides, los inmunosupresores y los fármacos anti-TNF- $\alpha$ . Los objetivos del tratamiento de la EII incluyen la inducción y el mantenimiento de la remisión clínica a largo plazo libre de corticoides, la cicatrización de las lesiones de las mucosas y la reducción de complicaciones como por ejemplo la necesidad de cirugía (Allez et al., 2002). En los Estados Unidos, un paciente con CU tiene un gasto medio anual de entre \$5,066-15,020 dólares y para un paciente con EC el gasto medio anual está entre \$8,265-18,932 dólares (Park & Bass, 2011).

### **2.2.2.1.- Aminosalicilatos**

El ácido 5 aminosalicílico (5-ASA) es un fármaco eficaz de leve a moderado en la inducción y mantenimiento de la remisión para CU, se ha empleado por más de 40 años. Contrariamente a esto, el papel de 5-ASA en la EC es contradictorio. Diversos ensayos que compararon el efecto de 5 ASA con el placebo tienen resultados divergentes. Se realizó un meta análisis de la eficacia del 5-ASA en el tratamiento de la EC activa y se realizaron otros 2 meta análisis donde se enfocaron el tratamiento como mantenimiento para la EC, pero no obstante no se pudo demostrar su eficacia. En consecuencia, no se recomendó el uso de 5-ASA en EC. Sin embargo, los estudios incluidos fueron diseñados de manera diferente, la población de estudio fue bastante heterogénea y se utilizaron diferentes formulaciones de fármacos y dosis. Un fenotipo seleccionado de pacientes con EC puede beneficiarse de 5-ASA. El 59% de los pacientes obtienen un beneficio a largo plazo con el 23% convirtiéndose en 5-ASA dependientes (Bosques Padilla & Calderón Lozano, 2002; Duricova, Pedersen, Elkjaer, Jensen, & Munkholm, 2010).

El arquetipo para esta clase de medicamentos es la sulfasalazina, que consta de 5-ASA ligados a la sulfapiridina por un enlace azo. La sulfasalazina es más eficaz en el mantenimiento de la remisión en la CU. Cuando se llega al colon, el enlace azo se escinde por la azorreductasa bacteriana, liberando mesalamina y sulfapiridina. La sulfapiridina es absorbida y metabolizada por acetilación hepática o hidroxilación seguido por glucuronidación. Teniendo en cuenta que de forma separada, ya sea el 5-ASA o la Sulfapiridina se absorben en el tracto gastrointestinal superior, el enlace azo, al que están unidas las dos moléculas les impide que sean absorbidas en el estómago y el intestino delgado, y no se liberen hasta que lleguen al colon donde las bacterias escinden el enlace. El 5-ASA es el componente activo en el tratamiento; sulfapiridina

contribuye poco al efecto terapéutico. Aunque la sulfapiridina no sea el componente activo es la que provoca muchos de los efectos secundarios observados en los pacientes que tomaban sulfasalazina. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos tradicionales pueden exacerbar la EII. Para preservar el efecto terapéutico de 5-ASA sin los efectos secundarios de la sulfapiridina, se han desarrollado varios compuestos 5-ASA de segunda generación. Se dividen en dos grupos: profármacos y fármacos recubiertos. Los profármacos contienen el mismo enlace azo como la sulfasalazina pero sustituyen a la sulfapiridina con cualquier otro 5-ASA (olsalazina) o un compuesto inerte (balsalazida). Estos compuestos actúan en sitios similares a lo largo del tracto gastrointestinal como la sulfasalazina (Pithadia & Jain, 2011).

Los efectos colaterales comunes incluyen cefalea, náusea, fatiga y, por lo general, responden a la reducción de las dosis. Las reacciones de hipersensibilidad a la molécula de la sulfa incluyen erupciones cutáneas, neumonitis, anemia hemolítica y supresión de la médula ósea (Bosques Padilla, 2000).

#### **2.2.2.2.- Corticoides**

Las propiedades de glucocorticoides de hidrocortisona y prednisolona son la base del tratamiento de EII. El esteroide preferido es la prednisolona, administrada por vía oral, rectal o parenteral en situaciones de emergencia. Además de sus efectos inespecíficos en la inmunidad humoral y celular, los esteroides inhiben la producción y acción de las citocinas y los mediadores de la inflamación, aumentando la absorción de agua y sodio y mejorando la sensación de bienestar (Bosques Padilla, 2000).

La respuesta a los esteroides en pacientes individuales con EII se divide en tres clases generales: sensibles a esteroides, dependiente de esteroides, y los que no responden a los

esteroides. Los pacientes que responden a los esteroides mejoran clínicamente, por lo general dentro de una o dos semanas, y permanecen en remisión hasta que la dosis de esteroides baja. Pacientes dependientes de esteroides también responden a los glucocorticoides, pero experimentan una recaída de los síntomas cuando la dosis de esteroides baja. Pacientes que no responde a esteroides no mejoran incluso con una dosis alta y prolongada. Aproximadamente el 40% de los pacientes son sensible a esteroides, del 30 al 40% tiene sólo una respuesta parcial o suelen convertirse en dependientes a los esteroides, y de 15 a 20% de los pacientes no responden al tratamiento con esteroides. Los esteroides no son eficaces en el mantenimiento de la remisión en cualquier presentación de EII; por lo tanto, sus efectos secundarios significativos han dado lugar a un mayor énfasis en la limitación de la duración y de la dosis acumulada de esteroides en la EII (Pithadia & Jain, 2011).

La dosis de glucocorticoides va disminuyendo durante semanas o meses. Incluso con esta lenta disminución gradual, se deben hacer esfuerzos para reducir al mínimo la duración de la terapia con esteroides. Una vez que los síntomas del paciente han mejorado se interrumpe el fármaco. El objetivo es eliminar los corticosteroides dentro de un período relativamente corto de tiempo (Faubion, Loftus, Harmsen, Zinsmeister, & Sandborn, 2001).

Los corticosteroides sistémicos tienen un extenso perfil de efectos secundarios. Los efectos secundarios agudos incluyen acné y de cambios de humor severo, que son particularmente comunes en pacientes jóvenes. Cambios visuales pueden ocurrir debido a la hiperglucemia inducida por esteroides. La formación de cataratas es otro efecto secundario posible. La necrosis aséptica, que es el efecto secundario más temido, por lo general ocurre en pacientes que reciben a largo plazo el tratamiento en dosis altas (Vakil & Sparberg, 1989).

### **2.2.2.3.- Inmunomoduladores**

Para el tratamiento de la EII se han adoptado diversos medicamentos inicialmente desarrollados para la quimioterapia del cáncer o como agentes inmunosupresores en el trasplante de órganos. Los medicamentos inmunosupresores pueden ser una terapia adjunta invaluable para el tratamiento de pacientes con enfermedad inflamatoria intratable y enfermedad perianal inoperable. Aunque los agentes inmunosupresores tiene efectos secundarios significativos, éstos son más seguros y mejor tolerados que los inducidos por corticosteroides a largo plazo (Pithadia & Jain, 2011). Hay tres clases de fármacos que son los que se utilizan con más frecuencia: Los antimetabolitos de la purina (azatioprina/6-mercaptopurina), la ciclosporina y el metotrexato (Bosques Padilla & Calderón Lozano, 2002).

#### **2.2.2.3.1.- Antimetabolitos de la purina**

Desde principios de la década de 1970, se han usado para el tratamiento de la EII. Aunque sus efectos son visibles hasta tres meses de haber iniciado el tratamiento. La azatioprina (AZA) y la 6-mercaptopurina son beneficiosos de un 50 a un 70% en pacientes con EC perianal intratable, la EII grave o aquellos que son resistentes o dependientes de esteroides. Existe poca información disponible sobre su efectividad como tratamiento en la CU, a pesar de que han sido beneficiosos en pacientes con esta enfermedad. Estos medicamentos mantienen eficazmente la remisión en ambas enfermedades (Pearson, May, Fick, & Sutherland, 1995).

El uso de estos medicamentos para tratar a los pacientes refractarios no se aceptaba ampliamente debido, en parte, a los resultados inconsistentes obtenidos en las experiencias iniciales; sin embargo estudios recientes han confirmado su eficacia. Pacientes con EC mostraron una mayor remisión con el uso de estos tratamientos que con otros (Bosques Padilla & Calderón Lozano, 2002).

Ambos fármacos, han demostrado su beneficio a largo plazo, además de que su adición permite retirar el uso de esteroides. La AZA se absorbe con rapidez y se convierte en mercaptopurina en los eritrocitos. La subsiguiente conversión en el hígado a metabolitos activos inhibe los ribonucleótidos de la purina y por lo tanto, la síntesis de ADN. Su mecanismo de acción en la EII incluye la inhibición de la función de los linfocitos, primariamente de las células T., ambos fármacos son bien tolerados, aunque una posible complicación es la pancreatitis, que ocurre entre un 3 a un 15% de los pacientes. Ambas, causan supresión de la medula ósea (Bosques Padilla, 2000).

#### **2.2.2.3.2.- Ciclosporina**

Desde mediados de la década de 1980, este fármaco también se ha utilizado para tratar a los pacientes con EII. Este fármaco es más útil en pacientes gravemente enfermos con CU que no responden a los corticosteroides. Sin embargo, de un 70 al 80% de los pacientes requieren cirugía (Loftus, Loftus, & Sandborn, 2003).

La indicación primaria de este medicamento es la CU aguda o EC refractaria. El efecto colateral primario es la disfunción renal. Otras complicaciones incluyen neurotoxicidad, crisis convulsivas, inmunosupresión e infecciones oportunistas (Bosques Padilla, 2000).

#### **2.2.2.3.3.- Metotrexato**

El metotrexato fue diseñado para inhibir la dihidrofolato reductasa, bloqueando así la síntesis de ADN y causando muerte celular. (Pithadia & Jain, 2011). El uso del metotrexato en dosis bajas conserva a largo plazo la tasa de remisión y sin presentar un incremento sustancial en la frecuencia de los efectos adversos (Bosques Padilla & Calderón Lozano, 2002). Debido a su potencial de efecto toxico en la medula ósea y en el hígado, se recomienda realizar controles

periódicos de las funciones hepáticas y la biometría hemática. La toxicidad pulmonar es una reacción de hipersensibilidad rara (Bosques Padilla, 2000).

### **2.3.- HELMINTO TERAPIA**

La evidencia sustancial de los modelos animales de enfermedades humanas apoyan la hipótesis de que la infección por helmintos puede suprimir el desarrollo de otras enfermedades. Estos modelos han evaluado la respuesta fisiológica inmune hacia los helmintos, para poder identificar que parásitos podrían ser útiles terapéuticamente y ayudar a conducir a un conocimiento preciso de los eventos inmunológicos después de la infección, para identificar las formas de intervenir en los procesos de una enfermedad autoinmune o inflamatoria y así eventualmente tratar o curar estas enfermedades. El sistema inmunitario de los mamíferos ha evolucionado bajo presión selectiva para combatir organismos infecciosos: no solo microbios, sino que también para combatir a los parásitos. Esta no es una relación unidireccional. Como el sistema inmune del huésped evoluciona para detectar y, posteriormente, inactivar o destruir invasores, los parásitos han desarrollado estrategias, incluyendo mecanismos para escapar de la detección y la manipulación activa de las células inmunes del anfitrión, para evitar o amortiguar la respuesta del anfitrión. La capacidad de interferir con la respuesta inmune de sus huéspedes ofrece al parásito la capacidad de establecerse, desarrollarse, reproducirse y completar su ciclo de vida (McKay, 2009).

La epidemiología de las enfermedades autoinmunes y las infecciones con helmintos han llevado a sugerir que los helmintos podrían mejorar las condiciones inflamatorias. Esto se ha traducido a las investigaciones clínicas destinadas a la reintroducción segura y controlada a la

exposición de helmintos a pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes, tratando esto en un esfuerzo de mitigar la respuesta inflamatoria (Wolff, Broadhurst, & Loke, 2012).

El uso de helmintos es actualmente un enfoque novedoso para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades alérgicas y autoinmunes. Esta rápida progresión de los estudios observacionales hace unos 20 años en ensayos clínicos con helmintos se pueden atribuir enormes avances en la evidencia no solo pre-clínica y clínica, sino también en una mayor comprensión del complejo inmunológico de los mecanismos que subyacen a estos efectos, los helmintos han ejercido presiones selecciones evolutivas significativas sobre el genoma inmune. Los estudios sobre los helmintos fueron fundamentales en un cambio del paradigma en la inmunología con los últimos descubrimientos de una serie de nuevas poblaciones de células inmunes. Fundamentalmente, estos nuevos descubrimientos subrayan la necesidad de comprender mejor el mecanismo subyacente detrás de los efectos terapéuticos deseables que ofrecen los helmintos (A. R. Khan & Fallon, 2013).

En años recientes ha llamado la atención una nueva alternativa para el tratamiento de EII de humanos, como la EC, por medio de la administración oral del nematodo parásito de cerdos *Trichuris suis*, con base en la capacidad que tiene los helmintos de polarizar la respuesta de las células T cooperadoras (Th) a una de tipo Th2 que inhibe la inflamación (Bautista Garfias, 2009). Los helmintos polarizan la respuesta inmunitaria de sus portadores a una tipo Th2, evadiendo la respuesta Th1 que debiera ocurrir bajo condiciones normales. La respuesta inmunitaria tipo Th2 se caracteriza por aumento de células T CD4+ que secretan citocinas como la IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13; además, los eosinófilos, células cebadas y basófilos, se incrementan en la sangre y en el sitio de infección (Erb, 2007).

La hipótesis de la higiene en EII, afirma que la crianza de niños en ambientes extremadamente higiénicos afecta negativamente al desarrollo inmunológico, lo que predispone a enfermedades inmunológicas como la EII mas tarde en su desarrollo. En el mundo moderno la ausencia a la exposición a parásitos intestinales parece ser un factor ambiental importante en la contribución al desarrollo de estas enfermedades. Los helmintos interactúan tanto con la inmunidad innata y adaptativa del anfitrión para estimular los circuitos de regulación inmune como para amortiguar las vías efectoras que impulsan a una inflamación aberrante. Los primeros prototipos para helminto terapias están dirigidos contra enfermedades inmunológicas, estas son el objetivo de estudio en los Estados Unidos y varios países de todo el mundo (Weinstock & Elliott, 2009).

(Bager et al., 2010), realizo un ensayo clínico para determinar la eficacia de la helminto terapia en la enfermedad de rinitis alérgica, en este estudio se realizó en 100 personas entre las edades de 18 a 65 años con rinitis alérgica diagnosticada, a los cuales se les asignaron la ingestión de 8 dosis con 2500 huevos de *T. suis* con un intervalo de 21 días durante un periodo de 8 meses. Como resultado tuvieron que el tratamiento con los huevos de *T. suis* causaron una respuesta clínica e inmunológica, pero no tuvo ningún efecto terapéutico sobre la rinitis alérgica.

(R. W. Summers et al., 2005; Robert W. Summers, Elliott, Urban Jr, Thompson, & Weinstock, 2005), realizó un estudio para determinar la seguridad y la eficacia del *T. suis* como tratamiento en la EC, en este estudio participaron 29 pacientes con EC, los cuales se les dieron dosis de 2500 huevos de *T. suis*, cada 3 semanas durante un periodo de 24 semanas. Al terminar el estudio, se observó que 23 pacientes respondieron al tratamiento y 21/29 fueron remitidas. No se observaron efectos adversos por el uso de *T. suis*.

(Moreels et al., 2004), realizó un estudio para medir el efecto de la infección con *Schistosoma mansoni* en el curso de una colitis inducida con TNBS en un modelo murino, en el cual se evaluó el daño macroscópico y microscópico mediante histología y la producción de citocinas. Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que la infección con *S. mansoni* redujo significativamente la duración de la colitis inducida por TNBS. Se mostró un aumento en la producción de IL-2 en la inducción con TNBS, mientras que la infección con *S. mansoni* aumentó la IL-4. Concluyendo que la infección con *S. mansoni* atenúa significativamente la colitis producida con TNBS en ratas.

### **3.- OBJETIVO**

#### **3.1.- Objetivo general**

Evaluar el efecto de la administración de huevos de *Trichuris suis* en la reparación del tejido intestinal y producción de citocinas en un modelo murino de colitis.

#### **3.2.- Objetivo particulares**

1. Establecer una inflamación enterocolítica en ratones Balb/c mediante la administración de ácido trinitobenceno sulfónico (TNBS).
2. Evaluar el efecto de la administración de huevos de *T.suis* en la reparación del tejido intestinal por histología.
3. Determinar los niveles de citocinas producidas por las células Th1 (IL-2, TNF e INF- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4 e IL-5) después de la administración de huevos de *T.suis* mediante citometría de flujo.

### **4.- HIPOTESIS**

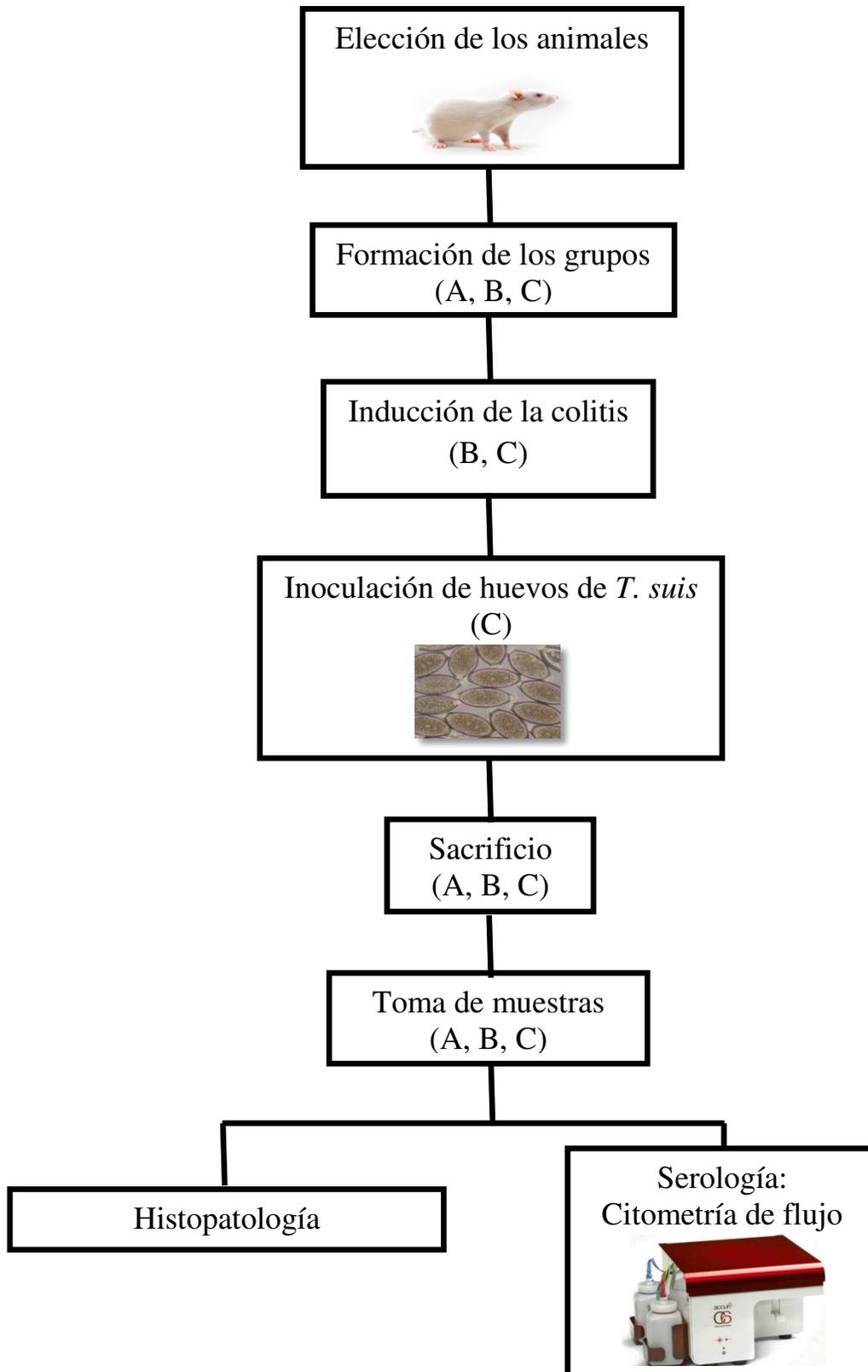
La administración de huevos de *Trichuris suis* a ratones con una inflamación enterocolítica inducida promueve una disminución en el proceso inflamatorio intestinal incrementando la respuesta inmunológica Th2.

## **5.- JUSTIFICACIÓN**

Las causas de la EII son desconocidas, pero el trabajo realizado en el laboratorio y estudios epidemiológicos sugieren que los factores ambientales y genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de estas patologías, las cuales están asociadas con una alteración del sistema inmune a nivel de la mucosa intestinal. Por este motivo la contribución de este estudio al evaluar si la administración de huevos de *Trichuris suis* pueden suprimir la respuesta inmunológica en un proceso inflamatorio intestinal, contribuirá al conocimiento para el desarrollo de nuevas estrategias de terapia.

## 6.- MATERIALES Y METODOS

### 6.1.- Diagrama de flujo del experimento



## **6.2.- Lugar del estudio**

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en el Campus de Ciencias Agropecuarias UANL, los análisis histológicos en el Departamento de Histología y los análisis de citometría de flujo en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Biología de la misma Institución, que se encuentra ubicada en Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

## **6.3.- Elección de los animales**

Los animales incluidos en este trabajo fueron ratones de raza Balb/c de ambos sexos, mayores a siete semanas de edad y con un peso de 30 a 40 g. Dichos animales fueron previamente tratados con antihelmínticos (Parafen®, Aranda).

Los animales fueron colocados en jaulas, en un cuarto aislado de la Facultad de Veterinaria, donde se mantuvieron a una temperatura constante ( $22\pm 1$  °C) con un foto periodo de 12 horas de luz/oscuridad. El agua y el alimento fueron ofrecidas a libre acceso (Tahan et al., 2011).

## **6.4.- Formación de los grupos de animales**

Se organizaron al azar lotes de cinco animales por tratamiento, los cuales fueron designados como A, B y C.

- El primer grupo o grupo A, estuvo integrado por los ratones considerados como controles negativos (grupo sin colitis y sin infección experimental).
- El segundo grupo o grupo B, estuvo integrado por los ratones inducidos mediante TNBS (grupo con colitis y sin infección experimental)

- El tercer grupo o grupo C, estuvo integrado por ratones inducidos y posteriormente con huevos de *T. suis* (grupo con colitis y con infección experimental).

### **6.5.- Inducción experimental de la colitis**

La inflamación colónica fué inducida por la administración de una solución de 0.1 ml que contenía 0.05 ml de TNBS en 50% de etanol; este ultima lisa la barrera de la mucosa y permite la penetración del TNBS en la pared del intestino, todo el manejo se realizó bajo anestesia de Isoflurano (Fluriso, VETone®). A los animales de los grupos B y C, la inducción se realizó por vía intracolónica, en el día 0, 5, 10, 15 y 20 de la prueba.

A los animales del grupo control negativo (A), solo se le aplico por vía intracolónica .10 ml de solución salina fisiológica como placebo, los mismos días que al resto de los animales (W. I. Khan et al., 2002; Moreels et al., 2004).

### **6.6.- Obtención del material biológico para realizar la inoculación experimental**

La cepa de huevos de *T. suis* se obtuvo a partir de cerdos infectados naturalmente. Las larvas se obtuvieron a partir del intestino grueso y del colon. Las larvas hembras fueron lavadas con solución salina, después fueron diseccionadas para la obtención de los huevos de *T. suis*. Los huevos se mantuvieron en un medio de hidróxido de sodio (NaOH) y puestos en la estufa de incubación a una temperatura de 24°C (Dufour & Le Bailly, 2013).

### **6.7.- Inoculación experimental de huevos de *T. suis***

La inoculación de huevos a los ratones se realizó por vía oral (VO) los días 27, 34 y 41 con una dosis de  $\pm 750$  huevos de *T. suis* en 0.10 ml.

### **6.8.- Sacrificio y Toma de muestras**

Una vez terminado el experimento, los animales fueron sacrificados mediante una cámara de cloroformo y por dislocación cervical manual.

De los animales sacrificados se tomaron muestras de sangre mediante punción cardiaca, a partir de las que se obtuvo suero, estas fueron congeladas hasta su análisis.

Durante la necropsia se registraron las alteraciones más importantes, tomándose muestras de los intestinos para realizar los análisis histopatológicos.

### **6.9.- Estudio histopatológico**

Los análisis por histología se realizaron de muestras obtenidas de intestino grueso de las partes del colon y ciego. Estas fueron fijadas en una solución de formaldehído al 10%, para su posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes transversales para la tinción mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina y evaluación microscópica (Mo et al., 2007).

### **6.10- Análisis de citocinas por citometría de flujo**

Para realizar la medición de las citocinas, se utilizó el kit comercial BD<sup>TM</sup> Mouse Th1/Th2 (551287, Biosciences, E.U) en el equipo BD Accuri<sup>TM</sup> C6 citometría (Biosciences) el cual consta de:

- Perlas de captura IL-2, IL-4, IL-5
- Perlas de captura INF- $\gamma$

- Perlas de captura TNF
- Reactivo de detección de ficoeritrina (PE) Th1/Th2
- Citocinas estándar Th1/Th2
- Perlas de configuración del citómetro
- Detector del control positivo PE
- Solución de lavado
- Solución Diluyente

El procedimiento para reconstituir y diluir las citocinas control se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las citocinas control se diluyeron en 2.0 ml de solución diluyente, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y reconstituyó mediante pipeteo. Se identificaron los tubos de 12x75 y se colocaron en el orden siguiente: 1:02, 1:04, 1:08, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256. Se agregan 300  $\mu$ l del diluyente a cada tubo y se realizaron diluciones seriadas: Se transfirieron 300  $\mu$ l de la reconstitución estándar al tubo de 1:02 y se mezcló por pipeteo, se continuaron las diluciones en serie transfiriendo 300  $\mu$ l desde el tubo de 1:02 al 1:04 y así sucesivamente hasta el tubo 1:256. Se consideró como control negativo el diluyente solo.

Posteriormente se procedió a la mezcla de las perlas de acuerdo a las condiciones descritas por el fabricante. Se agitó en vortex cada suspensión de perlas de captura durante 3 a 5 segundos, se añadió una alícuota de 10  $\mu$ l por cada perla de captura, por cada tubo de ensayo a analizar. (ejemplo, 10  $\mu$ l de IL-2 de las perlas x 18 tubos de ensayo = 180  $\mu$ l de IL-2 de perlas requeridas) y se dio vortex. Una vez realizado esto, se prepararon los estándares y las muestras para el análisis: De las perlas de captura mixtas se añadieron 50  $\mu$ l en todos los tubos de ensayo, 50  $\mu$ l de citocinas estándar de ratón Th1/Th2 a los tubos de ensayo, 50  $\mu$ l de cada

muestra y 50  $\mu$ l del reactivo de detección PE de Th1/Th2 a cada una de las reacciones. Las reacciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Se añadió 1 ml de tampón de lavado a cada tubo de ensayo y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadieron 300  $\mu$ l de tampón de lavado a cada tubo para volver a suspender el sedimento de las perlas.

## **7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa Statistix 9.0. Por medio de un análisis de varianza (ANAVA) se compararon los resultados obtenidos en los diferentes grupos y mediante una comparación de medias por Tukey.

## 8.- RESULTADOS

### 8.1.- Inducción enterocolítica en ratones balb/c con TNBS

Después de realizar 5 administraciones de TNBS, se procedió al sacrificio de los ratones y se obtuvieron los intestinos para su fijación y análisis histológico mediante la tinción hematoxilina y eosina. Se observó que al día 3 después de la primera ya se detectaba una atrofia discreta a moderada así como fusión de vellosidades con una severa hiperplasia de las células caliciformes (Fig.1), lo cual indica el inicio del proceso inflamatorio.

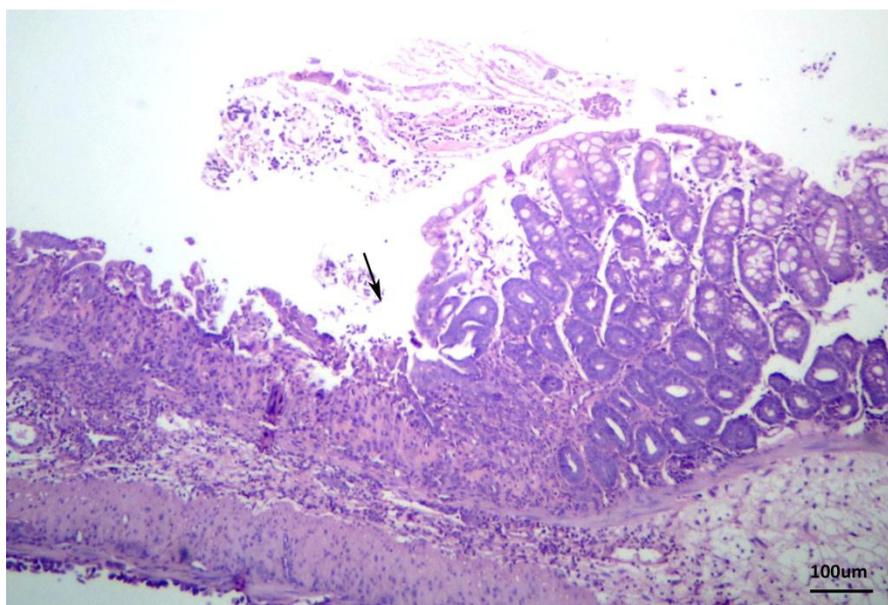


Figura 1.- Corte histológico del Intestino día 3 (H&E)

Al día 5 post inducción se observó necrosis hiperplasia de células caliciformes e infiltración de células mononucleares, lo que muestra progresividad en la inducción de la colitis (Fig.2).

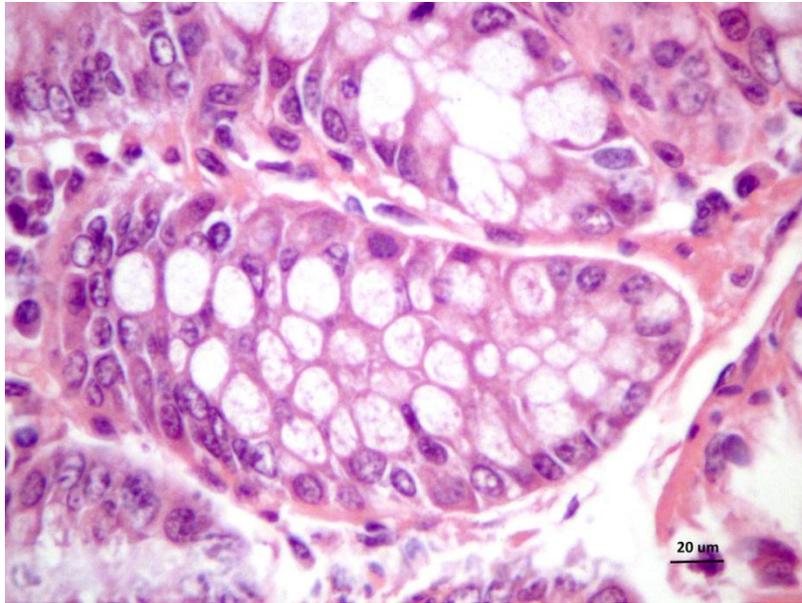


Figura 2.- Corte histológico del intestino día 5 (H&E)

El análisis histológico al día 15 indicó una severa destrucción de células intestinales, descamación, infiltración de células mononucleares e hiperplasia de células caliciformes, progresando así el modelo inflamatorio (fig.3).

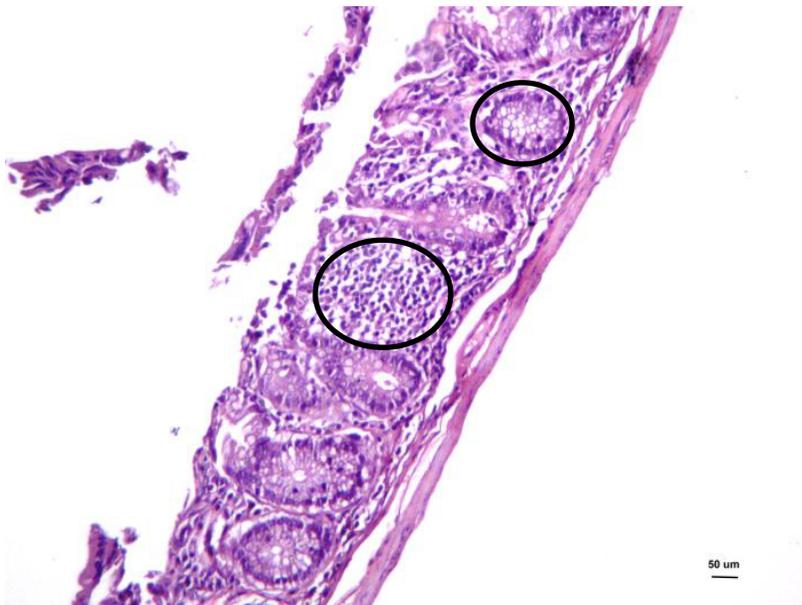


Figura 3.- Corte histológico de intestino al día 15 (H&E).

El siguiente día de análisis microscópico fue al día 20 en el cual se observó atrofia de las vellosidades intestinales y a su vez una fusión y achatamiento de las mismas con una hiperplasia de células caliciformes y dilatación de criptas (fig. 4).

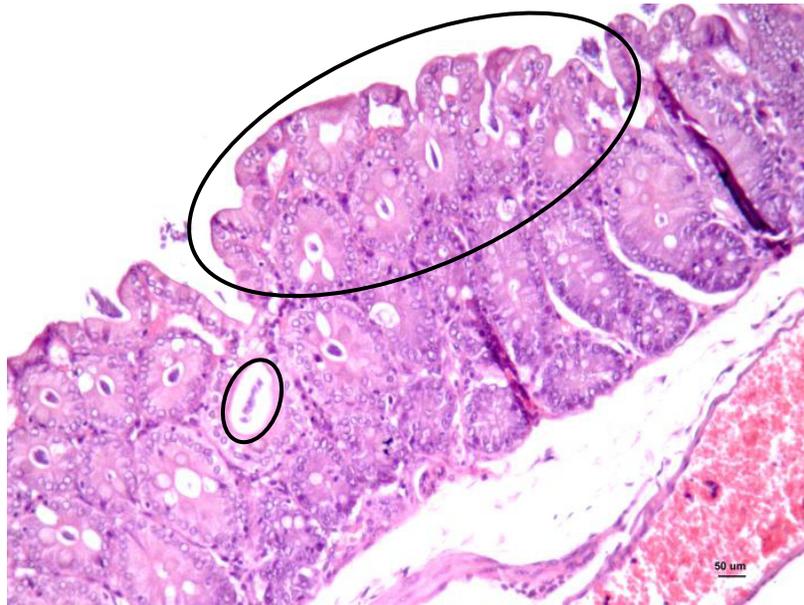


Figura 4.- Corte histológico de intestino al día 20 (H&E).

El análisis histológico al día 28 reveló atrofia junto con fusión de células intestinales, una hiperplasia de células caliciformes junto con edema, lo cual demuestra el mantenimiento de una colitis aguda (fig.5).



Figura 5.- Corte histológico de intestino al día 28 (H&E).

El análisis histológico al día 41 reveló severa descamación epitelial, atrofia y severa fusión de las vellosidades intestinales, lo cual demuestra el mantenimiento de una colitis aguda (fig.6).

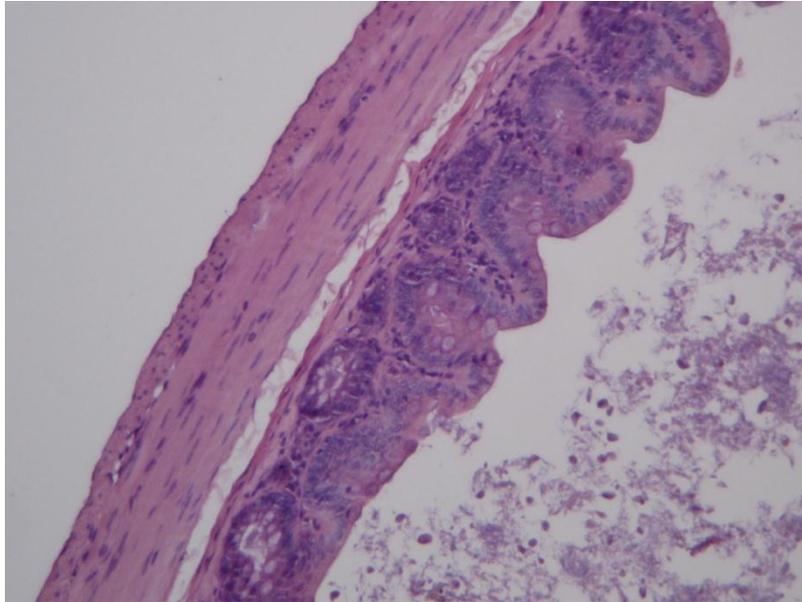


Figura 6.- Corte histológico de intestino al día 41 (H&E).

El análisis histológico al día 41 del tratamiento reveló una discreta atrofia junto con fusión de células intestinales, con una moderada hiperplasia de las células caliciformes, lo cual demuestra aún se encuentra activa la colitis aguda (fig.7).

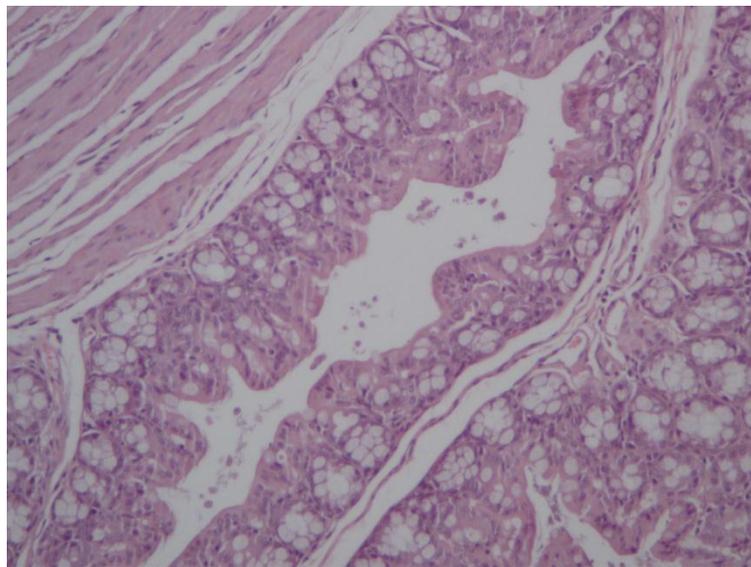
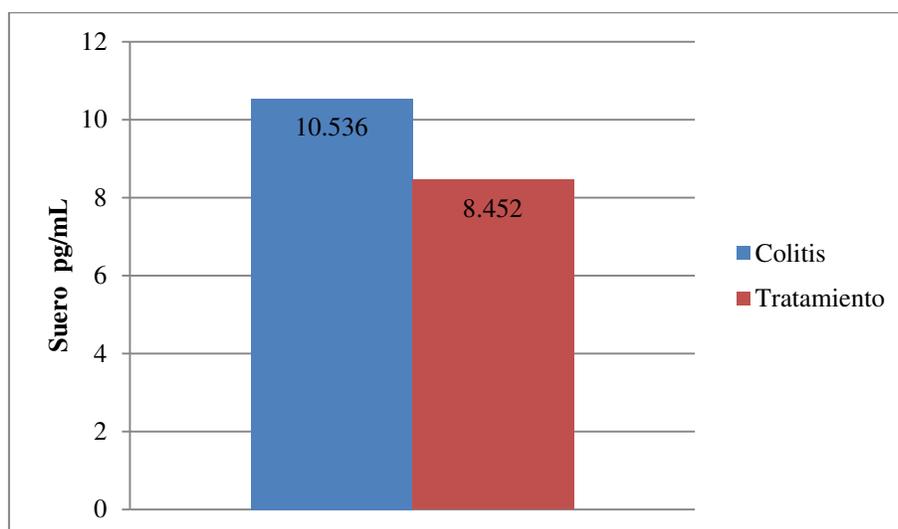


Figura 7.- Corte histológico de intestino al día 41 (H&E).

## 8.2.- Resultados de la medición de las citocinas

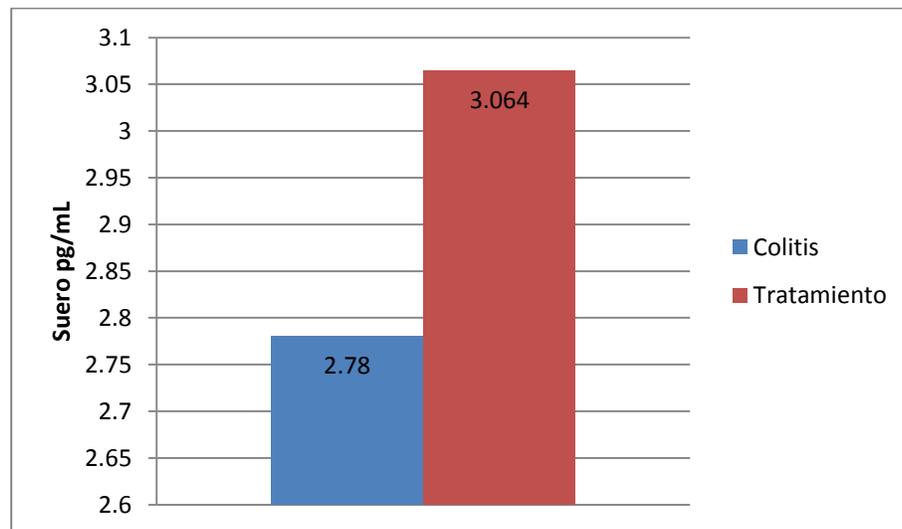
En las siguientes graficas se muestran los resultados de las muestras de suero obtenidas al final del experimento, las cuales fueron medidas mediante el kit de citometria Th1/Th2.

La gráfica 1, muestra la concentración promedio de la producción de TNF- $\alpha$ , a pesar de que los resultados no fueron estadísticamente significativos ( $p>0.05$ ). Se observa una disminución en la concentración promedio entre el grupo C con colitis aguda inducida y tratado con huevos de *T. suis* (8.452) y el grupo B con colitis aguda inducida y sin tratamiento con huevos de *T.suis* (10.536).



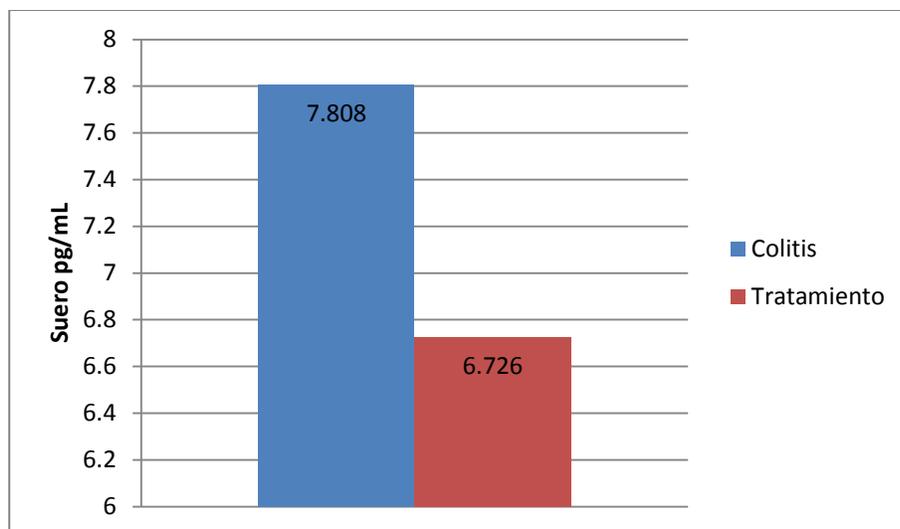
Grafica 1.- Producción de TNF- $\alpha$

La grafica 2, muestra la concentración promedio de la producción de INF- $\gamma$  en la cual se observa un incremento estadísticamente no significativo ( $p>0.05$ ) en la concentración promedio en el grupo C con colitis aguda inducida y tratado con huevos de *T. suis* (3.064) en comparación con el grupo B con colitis aguda inducida y sin tratamiento con huevos de *T. suis* (2.78).



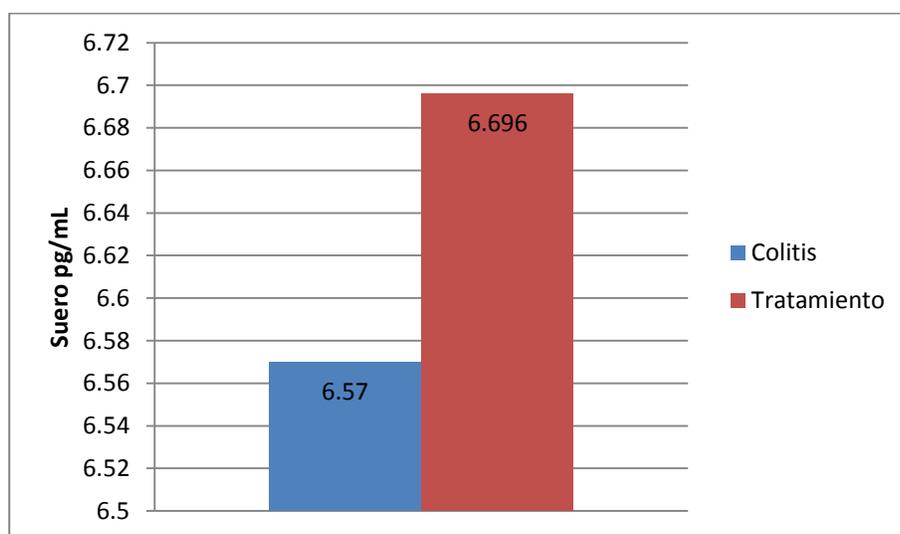
Grafica 2.- Producción de INF- $\gamma$

La grafica 3, muestra la concentración de la producción de IL-5, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ) al disminuir la concentración promedio de la IL-5 en suero en los animales con colitis aguda inducida y tratado con huevos de *T. suis* (6.726) y los animales con colitis aguda inducida y sin tratamiento con huevos de *T. suis* (7.808).



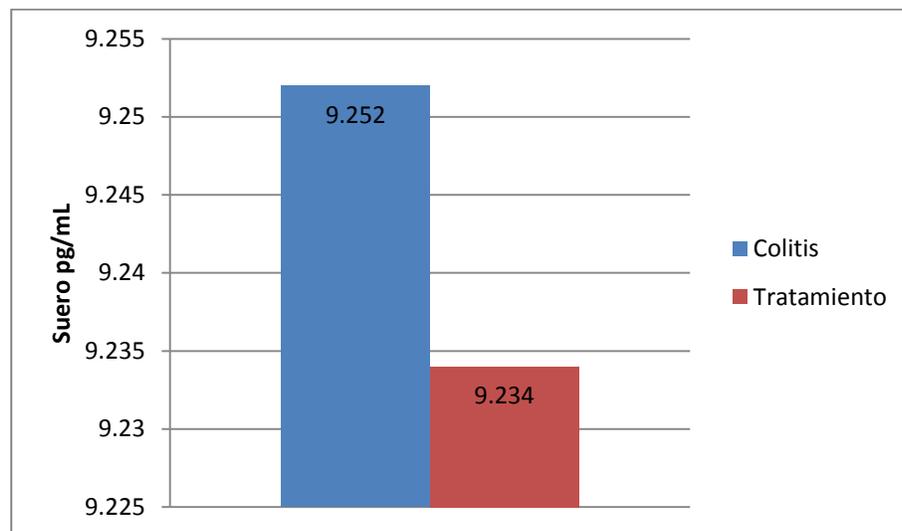
Grafica 3.- Producción de IL-5

La grafica 4, muestra la concentración promedio de la producción de IL-4 en la cual se observa un incremento en el grupo C con colitis aguda inducida y tratado con huevos de *T. suis* (6.696) en comparación con el grupo B con colitis aguda inducida sin tratamiento con huevos de *T. suis* (6.57), los resultados no fueron estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ), sin embargo, se muestra que hubo una respuesta a la administración de los huevos de *T. suis*.



Grafica 4.- Producción de IL-4

La grafica 5, muestra la concentración promedio de la producción de IL-2 donde no se observó una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, se observa una disminución de la producción promedio entre los ratones del grupo B con colitis aguda inducida sin tratamiento con huevos de *T. suis* (9.252) y el grupo C con colitis aguda inducida con tratamiento con huevos de *T. suis* (9.234).



Grafica 5.- Producción de IL-2

## 9.- DISCUSION

Un punto crucial en el estudio de la EII es sin duda la consecución de un modelo experimental adecuado. En el cual el curso de la enfermedad sea similar al del humano. El cual se ha estudiado en diferentes modelos murinos (Elliott et al., 2003; Elliott et al., 2004; Hunter, Wang, Hirota, & McKay, 2005; W. I. Khan et al., 2002; Mo et al., 2007; Moreels et al., 2004).

Un aspecto para el desarrollo de trabajos de este tema, es la inducción de una colitis aguda, el cual se considera un punto clave en la investigación de esta enfermedad. En un mismo modelo animal la inducción de esta se puede hacer mediante diferentes métodos (Elson et al., 1995; Low et al., 2013).

Otro de los aspectos en el uso de la helminto terapia es el uso de los helmintos para las diferentes enfermedades a investigar (McKay, 2009; McSorley, Hewitson, & Maizels, 2013; Reddy & Fried, 2007; Wolff et al., 2012). Algunos de los helmintos que se usan para estas terapias son *Trichinella spiralis*, *Trichuris suis*, *Schistosoma mansoni*, *Ascaris suum*, *Dirofilaria immitis*, *Heligmosomoides polygyrus*, etc. (Cooke et al., 1999; Hübner, Stocker, & Mitre, 2009; Imai, Tezuka, & Fujita, 2001; Klaver et al., 2013; Lima et al., 2002) . Entre las enfermedades a investigar están la esclerosis múltiple, rinitis alérgica, EII, asma, diabetes mellitus, etc. (Bager et al., 2010; Fleming, 2013; Hübner et al., 2009; Weinstock & Elliott, 2009).

Elliott et al., 2003, realizaron un trabajo en el cual infectaron de manera experimental a ratones de raza Balb/c, por vía intraperitoneal (IP) a una dosis de 10,000 huevos de *Schistosoma* no viables al día 0, 10 días después se re expusieron a la misma dosis. A los 4 días de la última exposición (14) los animales se sometieron a 0.10 ml de TNBS en 50% de

etanol, estos animales fueron sacrificados a los días 3, 5, 10 y 14 después de la inducción con TNBS. Los resultados obtenidos en las pruebas histológicas mostraban que el *Schistosoma* atenuaba la respuesta hecha por el TNBS.

W. I. Khan et al., 2002, infecto de manera experimental a 7 ratones de la cepa C57BL/6 de 8 a 10 semanas de edad con 375 larvas infectivas de *T. spiralis* por vía oral (VO), se les indujo una colitis con ácido sulfónico dinitrobenceno (DNBS) vía intracolónica a los 21 días post infección. El daño macroscópico fue evaluado al día 3 y 7 después de la inducción de la colitis. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un aumento significativo en la producción de IL-12 e INF- $\gamma$  en los ratones infectados con *T. spiralis*. A su vez se observaron altos niveles de IL-4 e IL-14 en los ratones con *T. spiralis*.

Hunter et al., 2005, infecto de manera experimental a ratones balb/c de 7 a 9 semanas de edad con 5 cisticercos de *H. diminuta* viables por vía oral, la colitis fue inducida mediante DNBS vía intrarectal a los 8 días post infección. El sacrificio fue realizado a las 72 horas o 7 días después de la inducción. Los resultados histológicos demostrados en este trabajo fueron que con el tratamiento con DNBS se observó una descamación del tejido, ulceración transmural e infiltración de células inflamatorias pero no se observaron cambios significativos con los ratones que se infectaron con *H. diminuta*. En cuanto al análisis de las citocinas que se realizaron mediante RT-PCR se mostró que en los ratones que recibieron el DNBS hubo un incremento significativo del mRNA de TNF- $\alpha$  así mismo reveló que no hubo significancia en los valores de INF- $\gamma$  e IL-12 y el IL-4 no fue detectado. En contraste a los ratones infectados con *H. diminuta* se mostraban elevadas el mRNA de IL-4 e IL10.

Moreels et al., 2004, realizó una infección experimental a ratas Wistar con 2000 cercarias de *S. mansoni* viables por vía transcutánea mediante un anillo metálico adherido al abdomen. La inducción de la colitis es inducida una semana post-infección con 0.5 ml TNBS en 10% de etanol. El sacrificio fue realizado al día 1, 4, 7, 14, 21 y 28 post inducción. Los resultados que se mostraban fueron que aunque el *S. mansoni* impidió un aumento en la secreción de IL-2 e inducía un aumento en la producción de IL-4, no era estadísticamente significativo. También se observó un aumento en la producción de IFN- $\gamma$ , aunque el aumento no fue estadísticamente significativo. En relación con la histología la colitis inducida con TNBS a los 7 días se observó una infiltración de células inflamatorias, destrucción de la mucosa y edema de la lámina propia. Al día 21 se observaba un infiltrado leve y al día 28 no se mostraban daños histológicos en la mucosa. Los animales tratados con *S. mansoni* se observó una disminución significativa del daño inflamatorio y del infiltrado celular.

En nuestro caso decidimos utilizar el método de colitis experimental por TNBS, que es un método que presenta similitudes histológicas e inmunológicas con la EC. Fue descrito inicialmente por (Morris et al., 1989), que administraban 30 mg del hapteno TNBS, pero en nuestro grupo de investigación decidimos utilizar este método modificado por (Elliott et al., 2003). Para la experimentación se realizó la inducción por vía intracolónica, en el día 0, 5, 10, 15 y 20 de la prueba.

Para la realización de la infección experimental en los animales se decidió el uso de huevos de *T. suis* obtenidos a partir de cerdos infectados naturalmente, la dosis utilizada para inducir la infección experimental fue de  $\pm 750$  huevos por animal, los cuales fueron inoculados por vía oral al día 7, 14 y 21 después de la última inducción del TNBS.

Con respecto a las lesiones histopatológicas en nuestro caso para el grupo B no presento las lesiones macroscópicas reportadas en la literatura revisada, aunque si presentó las alteraciones histológicas presentándose un infiltrado de células mononucleares, descamación del epitelio, hiperplasia de las células caliciformes con una moderada atrofia y fusión de las vellosidades intestinales. Ahora las lesiones vistas en el grupo C igualmente no presentaban cambios macroscópicos, en cuanto a las lesiones microscópicas después de 3 aplicaciones del tratamiento hubo una ligera recuperación del tejido aunque aún presentaba la atrofia y fusión de las vellosidades intestinales.

## 10.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir:

La administración de TNBS a diferentes intervalos de tiempo permite establecer una colitis aguda con una duración de hasta 41 días.

Los animales tratados con tres administraciones de huevos de *T.suis* no son suficientes para revertir un proceso inflamatorio agudo.

El tratamiento con huevos de *T. suis* en el modelo de colitis resulta en un incremento en la IL-4.

La administración de huevos de *T.suis* resulta en una reducción estadísticamente no significativa del TNF y la IL-2.

Es necesario realizar ajustes a la concentración y frecuencia de las administraciones de los tratamientos con huevos de *T.suis* que nos permita mejorar la estimulación de Th2 que resulte en una disminución de la inflamación.

## 11.- BIBLIOGRAFÍA

- Allez, M., Lemann, M., Bonnet, J., Cattan, P., Jian, R., & Modigliani, R. (2002). Long term outcome of patients with active Crohn's disease exhibiting extensive and deep ulcerations at colonoscopy. *Am J Gastroenterol*, 97(4), 947-953.
- Bager, P., Arnved, J., Rønborg, S., Wohlfahrt, J., Poulsen, L. K., Westergaard, T., . . . Melbye, M. (2010). Trichuris suis ova therapy for allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Allergy Clin Immunol*, 125(1), 123-130.e121-123.
- Batte, E. G., McLamb, R. D., Muse, K. E., Tally, S. D., & Vestal, T. J. (1977). Pathophysiology of swine trichuriasis. *Am J Vet Res*, 38(7), 1075-1079.
- Bautista Garfias, C. R. (2009). Helmintos parásitos de importancia veterinaria: regulación de la respuesta inmunitaria del portador y su uso potencial para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. (Spanish). *Veterinaria México*, 40(3), 283-288.
- Beer, R. J. (1973). Studies on the biology of the life-cycle of Trichuris suis Schrank, 1788. *Parasitology*, 67(3), 253-262.
- Beer, R. J. S. (1973a). Morphological descriptions of the egg and larval stages of Trichuris suis Schrank, 1788. *Parasitology*, 67(03), 263-278.
- Beer, R. J. S. (1973b). Studies on the biology of the life-cycle of Trichuris suis Schrank, 1788. *Parasitology*, 67(03), 253-262.
- Bosques Padilla, F. J. (2000). Tratamiento médico de la enfermedad inflamatoria intestinal. (Spanish). *Medicina Universitaria*, 2(6), 93-101.
- Bosques Padilla, F. J., & Calderón Lozano, I. E. (2002). Enfermedad inflamatoria intestinal. Nuevas modalidades terapéuticas. (Spanish). *Medicina Universitaria*, 4(14), 28-35.
- Braegger, C. P., & MacDonald, T. T. (1994). Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease. *Ann Allergy*, 72(2), 135-141.
- Cooke, A., Tonks, P., Jones, F. M., O'Shea, H., Hutchings, P., Fulford, A. J., & Dunne, D. W. (1999). Infection with Schistosoma mansoni prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol*, 21(4), 169-176.
- De Dios Duarte, M. J., De Roda, A. B. L., Astray, A. A., & Diaferia, L. B. (2012). ESTRÉS Y ENFERMEDAD DE CROHN: DIFERENCIAS ENTRE ENFERMOS DE CROHN CON BROTE, SIN BROTE Y PERSONAS SANAS. (Spanish). *Stress and Crohn's disease: differences among outbreak and quiescence patients and healthy persons. (English)*, 18(2/3), 167-176.

- Dufour, B., & Le Bailly, M. (2013). Testing new parasite egg extraction methods in paleoparasitology and an attempt at quantification. *International Journal of Paleopathology*, 3(3), 199-203.
- Duricova, D., Pedersen, N., Elkjaer, M., Jensen, J. K. S., & Munkholm, P. (2010). 5-Aminosalicylic acid dependency in Crohn's disease: A Danish Crohn Colitis Database study. *Journal of Crohn's and Colitis*, 4(5), 575-581.
- Elliott, D. E., Li, J., Blum, A., Metwali, A., Qadir, K., Urban, J. F., & Weinstock, J. V. (2003). Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284(3), G385-391.
- Elliott, D. E., Setiawan, T., Metwali, A., Blum, A., Urban, J. F., & Weinstock, J. V. (2004). *Heligmosomoides polygyrus* inhibits established colitis in IL-10-deficient mice. *Eur J Immunol*, 34(10), 2690-2698.
- Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S., & Riddell, R. H. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 109(4), 1344-1367.
- Erb, K. J. (2007). Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand? *Eur J Immunol*, 37(5), 1170-1173.
- Faubion, W. A., Loftus, E. V., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., & Sandborn, W. J. (2001). The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*, 121(2), 255-260.
- Fleming, J. O. (2013). Helminth therapy and multiple sclerosis. *Int J Parasitol*, 43(3-4), 259-274.
- Garcia, L. S. (1999). Classification of Human Parasites, Vectors, and Similar Organisms. *Clinical Infectious Diseases*, 29(4), 734.
- Hill, D. E., Romanowski, R. D., & Urban Jr, J. F. (1997). A *Trichuris* specific diagnostic antigen from culture fluids of *Trichuris suis* adult worms. *Veterinary Parasitology*, 68(1-2), 91-102.
- Hunter, M. M., Wang, A., Hirota, C. L., & McKay, D. M. (2005). Neutralizing anti-IL-10 antibody blocks the protective effect of tapeworm infection in a murine model of chemically induced colitis. *J Immunol*, 174(11), 7368-7375.
- Hübner, M. P., Stocker, J. T., & Mitre, E. (2009). Inhibition of type 1 diabetes in filaria-infected non-obese diabetic mice is associated with a T helper type 2 shift and induction of FoxP3(+) regulatory T cells. *Immunology*, 127(4), 512-522.

- Imai, S., Tezuka, H., & Fujita, K. (2001). A Factor of Inducing IgE from a Filarial Parasite Prevents Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Nonobese Diabetic Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 1051-1058.
- Khan, A. R., & Fallon, P. G. (2013). Helminth therapies: translating the unknown unknowns to known knowns. *Int J Parasitol*, 43(3-4), 293-299. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.12.002
- Khan, W. I., Blennerhasset, P. A., Varghese, A. K., Chowdhury, S. K., Omsted, P., Deng, Y., & Collins, S. M. (2002). Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infect Immun*, 70(11), 5931-5937.
- Klaver, E. J., Kuijk, L. M., Laan, L. C., Kringel, H., van Vliet, S. J., Bouma, G., . . . van Die, I. (2013). Trichuris suis-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated. *International Journal for Parasitology*, 43(3-4), 191-200.
- Kringel, H., Iburg, T., Dawson, H., Aasted, B., & Roepstorff, A. (2006). A time course study of immunological responses in Trichuris suis infected pigs demonstrates induction of a local type 2 response associated with worm burden. *Int J Parasitol*, 36(8), 915-924.
- Lima, C., Perini, A., Garcia, M. L. B., Martins, M. A., Teixeira, M. M., & Macedo, M. S. (2002). Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 32(11), 1659-1666.
- Loftus, C. G., Loftus, E. V., & Sandborn, W. J. (2003). Cyclosporin for refractory ulcerative colitis. *Gut*, 52(2), 172-173.
- Low, D., Nguyen, D. D., & Mizoguchi, E. (2013). Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Des Devel Ther*, 7, 1341-1357.
- McKay, D. M. (2009). The therapeutic helminth? *Trends in Parasitology*, 25(3), 109-114.
- McSorley, H. J., Hewitson, J. P., & Maizels, R. M. (2013). Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *International Journal for Parasitology*, 43(3-4), 301-310.
- Mo, H.-m., Liu, W.-q., Lei, J.-h., Cheng, Y.-l., Wang, C.-z., & Li, Y.-l. (2007). Schistosoma japonicum eggs modulate the activity of CD4+ CD25+ Tregs and prevent development of colitis in mice. *Experimental Parasitology*, 116(4), 385-389.
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., . . . Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), 46-54.e42; quiz e30.

- Moreels, T. G., Nieuwendijk, R. J., De Man, J. G., De Winter, B. Y., Herman, A. G., Van Marck, E. A., & Pelckmans, P. A. (2004). Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gut*, *53*(1), 99-107.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., & Wallace, J. L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, *96*(3), 795-803.
- Park, K. T., & Bass, D. (2011). Inflammatory bowel disease-attributable costs and cost-effective strategies in the United States: a review. *Inflamm Bowel Dis*, *17*(7), 1603-1609.
- Parthasarathy, G., & Mansfield, L. S. (2005). *Trichuris suis* excretory secretory products (ESP) elicit interleukin-6 (IL-6) and IL-10 secretion from intestinal epithelial cells (IPEC-1). *Veterinary Parasitology*, *131*(3-4), 317-324.
- Pearson, D. C., May, G. R., Fick, G. H., & Sutherland, L. R. (1995). Azathioprine and 6-Mercaptopurine in Crohn Disease A Meta-Analysis. *Annals of Internal Medicine*, *123*(2), 132-142.
- Pithadia, A. B., & Jain, S. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacological Reports*, *63*(3), 629-642.
- Reddy, A., & Fried, B. (2007). The use of *Trichuris suis* and other helminth therapies to treat Crohn's disease. *Parasitology Research*, *100*(5), 921-927.
- Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F., Thompson, R., & Weinstock, J. V. (2005). *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*, *54*(1), 87-90.
- Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban Jr, J. F., Thompson, R. A., & Weinstock, J. V. (2005). *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology*, *128*(4), 825-832.
- Tahan, G., Gramignoli, R., Marongiu, F., Aktolga, S., Cetinkaya, A., Tahan, V., & Dorko, K. (2011). Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci*, *56*(3), 715-720. doi: 10.1007/s10620-010-1364-5
- Vakil, N., & Sparberg, M. (1989). Steroid-related osteonecrosis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *96*(1), 62-67.
- Weinstock, J. V., & Elliott, D. E. (2009). Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm Bowel Dis*, *15*(1), 128-133.

Wolff, M. J., Broadhurst, M. J., & Loke, P. n. (2012). Helminthic therapy: improving mucosal barrier function. *Trends in Parasitology*, 28(5), 187-194.