



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

***Trichinella spiralis* como modelo de  
inmunomodulación**

Autor: Sofía Ruiz Corredor

Tutor: Juan José García Rodríguez

Convocatoria: Julio

## ÍNDICE

RESUMEN: .....	2
ABSTRACT: .....	3
INTRODUCCIÓN:.....	4
ANTECEDENTES: .....	5
OBJETIVOS:.....	7
MATERIAL Y MÉTODOS: .....	7
RESULTADO Y DISCUSIÓN: .....	7
CICLO BIOLÓGICO: .....	7
INMUNOMODULACIÓN:.....	8
TERAPIA HELMÍNTICA:.....	14
Esclerosis múltiple: .....	14
Diabetes autoinmune tipo I: .....	15
Enfermedad inflamatoria intestinal: .....	16
Alergia:.....	17
CONCLUSIONES:.....	19
BIBLIOGRAFÍA: .....	19

### **TABLA DE ACRÓNIMOS:**

Productos ES: Productos de excreción- secreción	MAA: Macrófagos activado alternativamente
Linfocitos Tregs: Linfocitos T reguladores	Células NK: Células Natural Killer
CDs: Células dendríticas	EM: Esclerosis múltiple
LRN: Larva recién nacida	EAE: Encefalitis autoinmune experimental
GalNAc: N-acetilgalactosamina	Ratas DA: Ratas Dark Agouti
GlcNAc: N-acetilglucosamina	Ratones NOD: Ratones diabéticos no obesos
CPA: Células presentadoras de antígenos	EII: Enfermedad inflamatoria intestinal
MAPK: Proteínas quinasas mitogenactivadas	DNBS: Dinitrobenenosulfónico
ERK: Quinasa regulada por señal extracelular	MPO: Mieloperoxidasas
KLF 4:Factor Kruppel 4	TNBS: Trinitrobenenosulfónico
Breg: Linfocitos B reguladores	OVA: ovoalbúmina
TSL-1: Glucoproteínas grupo 1 de las larvas de <i>T.spiralis</i>	EAAI: Inflamación alérgica experimental de las vías respiratorias
rTsP53: Glucoproteína recombinante kDa 53 <i>T.spiralis</i>	JNK: Quinasa N-terminal Jun

## **RESUMEN:**

La teoría de la higiene, y posteriormente la teoría de los viejos amigos, postularon una relación inversa entre, el auge de las enfermedades inflamatorias autoinmunes y alergias en los países más desarrollados, con la higiene que habían experimentado estos en las últimas décadas. A través de diversos estudios se ha llegado a la conclusión de los helmintos ofrecen protección frente a estos problemas de salud. En esta revisión nos centramos en la capacidad que tiene *Trichinella spiralis* para llevar a cabo esta inmunomodulación, cuáles son los mecanismos y las moléculas encargados de ello. Se ha demostrado que la IL-10 y el TGF- $\beta$  son las citoquinas más importantes en el proceso, producidas gracias a respuestas regulatorias. Además son los productos de excreción-secreción los encargados en mayor medida de estimular las células del sistema inmune para alcanzar la regulación. Se está estudiando de que manera pueden realizarse terapias con helmintos para distintas enfermedades como la esclerosis múltiple, la enfermedad inflamatoria intestinal, la diabetes mellitus tipo I o la alergia.

**Palabras clave:** inmunomodulación, *Trichinella spiralis*, teoría de la higiene, teoría de los viejos amigos, IL-10, TGF- $\beta$ , helmintos, respuesta reguladora.

## **ABSTRACT:**

The hygiene theory, and then the old friends theory, postulated an inverse relationship between, the rise of autoimmune inflammatory diseases and allergies in more developed countries, with the hygiene they had experienced in recent decades. Through various studies it has been concluded that helminths offer protection against these health problems. In this review we focus on the ability of *Trichinella spiralis* to carry out this immunomodulation, which are the mechanisms and the molecules responsible for it. It has been shown that IL-10 and TGF- $\beta$  are the most important cytokines in the process, produced thanks to regulatory responses. Moreover, excretion-secretion products are responsible to a greater extent, for stimulating the cells of the immune system to achieve regulation. It is being studied how helminth therapies can be performed for different diseases such as multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, diabetes mellitus type I or allergy.

**Keywords:** immunomodulation, *Trichinella spiralis*, hygiene theory, old friends theory, IL-10, TGF- $\beta$ , helminths, regulatory response.

## **INTRODUCCIÓN:**

En los últimos años han aumentado los casos de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como las alergias, el asma bronquial, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus tipo I, la enfermedad inflamatoria intestinal o neuropatías entre otras. Existe una estrecha relación entre los estilos de vida de países desarrollados y la prevalencia de estas enfermedades <sup>(1, 2, 3, 4,5)</sup>.

Se ha visto que este desarrollo está íntimamente ligado con una disminución de las enfermedades infecciosas en general debido al aumento de la higiene y la sanidad. Diversos estudios han demostrado que las infecciones por helmintos, en particular por nematodos, son capaces de aminorar distintas enfermedades inflamatorias en ratones y ratas <sup>(3, 4, 5, 6, 7, 8,9)</sup>. Esto es debido a que con el paso del tiempo los helmintos han ido evolucionando para sobrevivir crónicamente en el hospedador con el mínimo daño posible a este. Ha habido un proceso de tolerancia que ha propiciado que muchas enfermedades helmínticas sea asintomáticas <sup>(5,6)</sup> gracias a la presión selectiva sobre el “inmunoma” (el genoma inmunitario del hospedador). Pero en los últimos tiempos los avances médicos e higiénicos han podido disminuir la presión selectiva acentuándose las mutaciones genéticas humanas que inducen problemas autoinmunes <sup>(10)</sup>.

Se ha visto que en lugares donde hay mayor número de infecciones parasitarias las enfermedades alérgicas son menores, y tras utilizar una terapia antihelmíntica el número de alergias ha aumentado <sup>(6)</sup>.

El contacto continuado con el sistema inmune del hospedador da lugar a respuestas regulatorias, donde se liberan citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF- $\beta$ ) y linfocitos Treg, que anulan la capacidad del hospedador para expulsar los parásitos y a su vez disminuyen la proliferación de clones autorreactivos ayudando a mermar las patologías inflamatorias que han aumentado en los últimos tiempos mencionadas anteriormente <sup>(4,5)</sup>. También podría ser una ayuda para disminuir el rechazo en los trasplantes <sup>(6)</sup>.

En las enfermedades alérgicas o autoinmunes, el sistema inmune produce una respuesta exagerada ante antígenos inocuos o antígenos de nuestro propio organismo, ya que probablemente se encuentre en un entorno libre de parásitos. Esto hace que el efecto modulador que ejerce el parásito se pierda y por tanto el sistema inmune sea más propenso a reaccionar ante tales estímulos, a esto se le ha llamado “epidemia de ausencia” <sup>(5)</sup>.

Esta modulación ejercida por el parásito no solo presenta ventajas, ya que puede reducir las respuestas de una vacuna y aumentar la susceptibilidad hacia una coinfección, debido a que disminuyen las defensas del hospedador, provocando grandes complicaciones en coinfecciones con *Mycobacterium tuberculosis*<sup>(6)</sup> u otros virus. Se produce por la regulación a la baja de las respuestas de las células T a este tipo de infecciones, causando la exacerbación de la coinfección <sup>(11)</sup>.

Otra desventaja que presenta la inmunomodulación de los helmintos en una infección crónica es que la inmunosupresión puede desencadenar distintos cánceres <sup>(6)</sup> aunque no está del todo claro, se explicará más adelante <sup>(11)</sup>. La disminución de la vigilancia inmune hace que las células mutadas del hospedador, que en situaciones normales serían eliminadas por el sistema inmune, escapen de este dando lugar a tumores <sup>(6)</sup>.

### **ANTECEDENTES:**

En 1989 David Strachan publicó en el British Medical Journal, un estudio en el que asoció la disminución de la exposición a agentes biológicos con el aumento de las alergias, en particular la disminución de las alergias en familias numerosas, ya que la proximidad con hermanos mayores conlleva una mayor probabilidad de contacto con agentes infecciosos <sup>(12)</sup>. De esta manera surgiría la **hipótesis de la higiene** aunque estudios anteriores en 1968 ya apuntaban a una posible relación inversa entre la proporción de enfermedades autoinmunes e infecciones parasitarias en Nigeria <sup>(4)</sup>. Posteriormente, otros autores encontrarían esta asociación en otras enfermedades inflamatorias crónicas como las mencionadas anteriormente <sup>(1, 2, 12)</sup>.

La hipótesis plantea la reducción importante y temprana de la exposición a agentes biológicos vivos debido a las adecuadas medidas higiénicas: descontaminación del agua, esterilización, pasteurización, y la instauración de las vacunas y el uso de antibióticos, lo que ha ayudado a la disminución de muchas enfermedades infecciosas y parasitarias. Esto impacta en el sistema inmune generando un desbalance en la respuesta inmune de tipo Th1 y Th2, favorable a esta última vía. En un principio se pensaba que únicamente existían las respuestas Th1 y Th2. La respuesta Th1 se produce a través de las células T helper tipo 1 y liberan distintas citoquinas: IL-2, INF-  $\gamma$ , TNF e IL-12, en contacto con patógenos intracelulares (lo que se denomina respuesta celular). Por otro lado la respuesta Th2 libera IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-21 e IL-33, además la producción de

anticuerpos (IgE) y la producción de eosinofilia dando lugar a una respuesta humoral <sup>(3,13)</sup>. Ocurre frente a parásitos. Las citoquinas de cada respuesta inhiben a las de la respuesta contraria. Las enfermedades alérgicas cursan con IgE y cursan una respuesta Th2, lo que lleva a pensar que hay una falta de activación Th1. La falta de estimulación temprana da lugar a una predisposición de la respuesta Th2 que desencadena en alergias <sup>(2)</sup>.

Existen estudios que postulan a los helmintos como factor protector más importante. En el caso de las enfermedades inflamatorias autoinmunes estaría claro ya que se debe a una descompensación de la respuesta Th1/Th2 pero en las alergias se activa la vía Th2 también. El mecanismo de respuesta Th2 frente a helmintos y en una reacción alérgica es similar, el objetivo en la primera es expulsar al agente infeccioso en la segunda a un agente inocuo. Por tanto, a raíz de esto se postula la **teoría de viejos amigos** <sup>(2,14)</sup>.

Esta teoría establece la existencia de unas células T reguladoras que aparecen tras el reconocimiento por parte de las células dendríticas de los helmintos <sup>(14)</sup>. Hace más de un millón de años, los helmintos ya parasitaban a los homínidos, en ese periodo de tiempo tan largo, los helmintos han ejercido cambios en la frecuencia de genes. Lo que quiere decir que a lo largo del tiempo la respuesta frente a estos parásitos mutó para que no diera lugar a una respuesta tan dañina al organismo <sup>(3,14)</sup>. Las células Tregs liberan citoquinas reguladoras antiinflamatorias (IL-10 y TGF-β) que ejercen una regulación supresora en las otras respuestas <sup>(2,14)</sup>. Estas células son capaces de suprimir respuestas Th1, Th2 y además otras subpoblaciones linfocitarias de tipo proinflamatorio como Th17 <sup>(4)</sup>.

*T.spiralis* desde la célula nodriza (lugar inmunoprivilegiado) mantiene una relación con el hospedador a través de los productos ES. Estos productos con los que modulan la respuesta inmune manteniendo la homeostasis. Esta red inmunomoduladora, basada en respuestas Th2 y reguladoras, permiten poner en orden las irregularidades hiperinmunes (alergia y enfermedades inflamatorias autoinmunes) <sup>(9)</sup>.

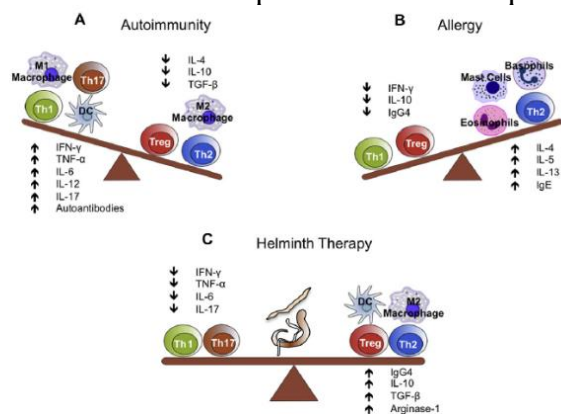


Figura 1: Diferencias inmunológicas según se trate de: Autoinmunidad (A), alergia (B) y terapia con helmintos que genera un equilibrio(C). (15)

## **OBJETIVOS:**

El principal objetivo del trabajo es conocer, a través de una revisión bibliográfica, de qué manera *Trichinella spiralis* es capaz de modular la respuesta inmune de forma que produzca beneficio para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y alérgicas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Para llevar a cabo la revisión bibliográfica se realizó una indagación en el buscador especializado científico-académico Google Académico y en la biblioteca online de la UCM. Además se utilizó la base de datos PubMed y editoriales como Elsevier. De esta manera se recopilaron distintos artículos científicos y revisiones sobre el tema expuesto.

Algunas palabras utilizadas en la búsqueda fueron: inmunomodulación, *T.spiralis*, IL-10, TGF- $\beta$ , enfermedades autoinmunes, alergias, helmintos, nematodos, respuesta regulatorias, teoría de la higiene, teoría de los viejos amigos.

## **RESULTADO Y DISCUSIÓN:**

### **CICLO BIOLÓGICO:**

*T.spirallis* es un helminto de la familia de los nematodos. Antes de abordar el tema de la inmunomodulación tenemos que conocer su ciclo biológico. Se trata de una zoonosis. La infección se produce a través de la ingestión de carne cruda o poco cocinada de animales (en el caso de los humanos normalmente el cerdo) infectada con larvas del parásito. El ciclo se lleva a cabo en distintas fases dentro del mismo hospedador <sup>(11,15)</sup>.

En primer lugar hay una **fase intestinal**, tras la ingesta de las larvas enquistadas, gracias a las enzimas del estómago, éstas se desenquistan y las larvas se establecen en las 2 primeras porciones del intestino delgado. Trascorridas 30 horas aproximadamente, la larva ha sufrido 4 mudas (desde L1 a L5) hasta alcanzar el estado adulto. En las siguientes 40 horas se produce la cópula donde son los machos los que se desplazan hacia la hembra. Tras la cópula los machos mueren y son eliminados por las heces y las hembras crecen y penetran en la mucosa intestinal. A los 11 días aproximadamente tras la cópula la hembra libera a las larvas <sup>(15)</sup>. La fase intestinal está caracterizada por el predominio de la respuesta Th1 al principio y después Th2 (respuesta protectora que expulsa las formas adultas del intestino durante la diseminación de larvas recién nacidas) <sup>(3)</sup>.

Las larvas recién nacidas a través de los vasos sanguíneos y linfáticos llegan a la cavidad derecha del corazón y pulmón y desde ahí pasan a la circulación arterial y se dirigen principalmente a músculos con gran actividad donde comienza la **fase muscular** (15).

Cuando llegan las LRN a las fibras musculares crecen y se diferencian en L1 dentro del miocito o cápsula del parásito. A los 20 días se transforma en una célula nodriza, lugar inmunoprivilegiado compuesto por una pared o capsula de colágeno y componentes celulares. Posteriormente es rodeado por vénulas que actuaran como medio de transporte de nutrientes. En este punto puede permanecer en humanos durante varios meses incluso años, es cuando se establece la infección crónica. Cuando un nuevo huésped ingiere estas formas se inicia de nuevo el ciclo (15,3).

### **INMUNOMODULACIÓN:**

La etapa implicada en la inmunomodulación es la muscular a través de los productos de excreción-secreción producidos por L1. Éstos actúan como antígenos y/o inmunomoduladores, polarizando la respuesta. La infección por helmintos es caracterizada por modular la respuesta de las CD4 hacia Th2 y respuestas regulatorias. La respuesta por *T.spiralis* es mixta Th1/Th2, pero nos centramos en Th2 ya que es la predominante en la fase muscular junto a la reguladora. Como bien hemos comentado antes, una respuesta Th2 suprime la respuesta Th1, la cual está ligada a enfermedades autoinmunes inflamatorias (3,16). Parte de la respuesta Th2 permanece intacta, en particular la producción de IL-4, además aumentan los niveles de IgG4 (promovidos por IL-10) (5).

Los **productos ES** provienen del órgano secretor de *T.spiralis*: el esticosoma. Participan en la interacción con diversas células del hospedador (enterocitos, células musculares e inmunitarias) logrando así la modulación del parasitismo y de la respuesta inmune. Crean un entorno adecuado para su supervivencia bien sea modulando la respuesta o influyendo en la expresión génica de las células del huésped (11).

Se ha determinado que los productos ES están formados por 13 proteínas diferentes en distintas isoformas por modificaciones postraduccionales, normalmente glicosilación, ya que la mayoría están altamente glicosiladas (11). Algunas proteínas funcionales que contiene son: proteína quinasa, 5-nucleótidasa, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), prosaposina, proteinasas, inhibidores de proteinasas, proteínas de choque térmico, glucosidasas, fosfatasas, enolasas y proteínas de unión al



ADN <sup>(11,17)</sup>. Estos productos actúan como constantes comunicadores con las células inmunitarias del hospedador lo que provoca la modulación y un nuevo nivel de homeostasis <sup>(3,16)</sup>. Al localizarse en la superficie del parásito y en los núcleos de las células del hospedador infectadas, es posible que sean las encargadas de la invasión de los enterocitos y el establecimiento de la célula nodriza además de los que inducen la respuesta inmune del huésped <sup>(11)</sup>.

Para el establecimiento de la célula nodriza se demostró que los productos ES L1 promueve la proliferación de mioblastos y a su vez inhibe su desdiferenciación (aunque no se sabe muy bien como). Los factores reguladores miogénicos, MyoD y miogenina que son importantes en la miogénesis y la regeneración de los músculos, se sobreexpresan en los tejidos musculares infectados por *T.spiralis*. Además se han encontrado homólogos a estas proteínas que se cree que también están implicados en los procesos anteriores como MyoD-like o proteínas Rcd1-like. La formación de la célula nodriza está acompañada de la creación de la cápsula de colágeno y la angiogénesis mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular pero no se conoce aún que moléculas de la larva son las responsables de esto <sup>(11)</sup>.

La respuesta inmune que los productos ES originan en el organismo hospedador se lleva a cabo a través de un grupo particular de glucoproteínas llamadas grupo 1 larvas de *T.spiralis* (TSL-1). Las respuestas protegen al huésped de la reinfección y permiten la supervivencia del parásito. Como se ha mencionado anteriormente están altamente glicosiladas y presentan epítomos de carbohidratos de tilosa. Se liberan del esticosoma y consisten en al menos 6 glucoproteínas que llevan estructuras tri y teraantenarias ligadas a N con restos subterminales de GalNAc unidas a GlcNAc. Las antenas glicanas están fucosiladas en los GlcNAc y coronadas con un epítomo inmunodominante: 3,6-didesoxi-D arabinohexosa tilosa o D-tilosa. Estas glucoproteínas 40-70 kDa inducen la producción de anticuerpos específicos <sup>(11)</sup>.

La glucoproteína 43 kDa está relacionada con la formación de la cápsula, probablemente se libera de la célula muscular para transformar esta célula en célula nodriza. Actualmente también se la atribuye una función de desoxirribonucleasa II $\alpha$  <sup>(11)</sup>.

Se piensa que la glucoproteína 45 kDa tiene efectos inhibidores sobre los neutrófilos in vitro, lo que sugiere una disminución de células inflamatorias alrededor del parásito enquistado <sup>(11)</sup>.

En cuanto a la glucoproteína 53 kDa no se conoce muy bien su función pero se presupone que tiene que ver con la modulación de la respuesta inmune como veremos posteriormente al hablar de la enfermedad inflamatoria intestinal. La antigenicidad de ésta glucoproteína se debe a sus epítomos proteicos, no como en otros antígenos TSL-1 que se dirigen al resto de azúcar <sup>(11)</sup>.

La forma de comunicarse es la siguiente: se liberan las proteínas de la matriz extracelular, que es rica en sulfato de heparano, lo que provoca la estimulación de TLR4 expresado en las **CDs** <sup>(11,18)</sup>. Además hay una consecuente producción de citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  <sup>(18)</sup>. Las CDs adquieren un fenotipo semimaduro <sup>(3)</sup>, ya que los productos ES suprimen la expresión de marcadores de maduración en las DCs en concreto disminuyen la expresión de este TLR 4. Tras la unión de diferentes moléculas de helmintos a los receptores de reconocimiento de patrones de las células presentadoras de antígenos (CPA), CDs y macrófagos, se ponen en marcha los eventos de señalización y activan tres principales proteínas quinasas mitogenactivadas (MAPK): la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), p38 y la quinasa N-terminal Jun (JNK). Tras la realización de algunos ensayos, se determinó que los productos ES L1 poseen la capacidad de interferir con la fosforilación de algunas vías de señalización y hacer cambiar la maduración de las DCs tras la activación. La expresión semimadura se caracteriza por la expresión limitada de o nula de MHC II y moléculas coestimuladoras lo que lleva a una liberación reducida o suprimida en citoquinas proinflamatorias, polarizando la respuesta inmune hacia Th2 y el tipo regulador. Hay una disminución en la producción de IL-12 como consecuencia de la fosforilación de ERK y la estabilización del factor de transcripción c-Fos en las CDs, esto hace que se polaricen los linfocitos hacia una respuesta Th2 <sup>(11)</sup>.

Este estado semimaduro es suficiente para migrar a los ganglios linfáticos y presentar el antígeno a los linfocitos T, lo que provocaba un aumento de IL-10 y una producción menor de IL-12p17 (proinflamatoria). Esto se ha visto en ratas Dark Agouti <sup>(3,11)</sup>. Los glucanos de los productos ES son importantes para la inducción de la respuesta inmune, ya que en estudios con ES con estructuras de hidratos de carbono alteradas daban como resultado una disminución de la producción tanto de IL-12p70 (proinflamatoria) como de IL-10 (antiinflamatoria) <sup>(11)</sup>.

No se conoce muy bien la forma en la que las CDs polarizan su respuesta hacia Th2, pero hay factores clave como KLF4 que se sabe que son esenciales para adoptar

dicho fenotipo, además probablemente incluya interacciones superficiales como la coestimulación del ligando OX40/OX40<sup>(6)</sup>. Las CDs aparte de producir IL-10 y TGF- $\beta$  suprimen la producción de mediadores proinflamatorios (IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-10) y expanden y diferencian Treg. La respuesta inmune comienza en los tejidos periféricos, y tras ello las CDs migran a los ganglios donde activan los T vírgenes. Se ha demostrado que la aplicación de CDs estimuladas con *T. spiralis* induce una respuesta inmune que dura alrededor de 30 días<sup>(9)</sup>.

Los productos ES son capaces de convertir linfocitos T CD4+ Foxp3- a células **Treg** que si expresan Foxp3 y encargarse de su expansión dependiente de TGF- $\beta$ <sup>(4,19)</sup>. La movilización de Tregs favorece el control de situaciones dominadas por Th2 como la alergia y la atopia<sup>(3,16)</sup>. El fenotipo clásico de los linfocitos Treg es CD4+ CD25+ FOXP3+. Los helmintos son capaces de producir la expansión policlonal de Treg periféricos lo que permite la modificación de respuestas a otros antígenos. Este es uno de los motivos por el cual tienen interés en la inmunoregulación<sup>(4)</sup>. La respuesta reguladora es caracterizada por la producción de citoquinas antiinflamatorias **IL-10** y **TGF- $\beta$** , ambas citoquinas han demostrado tener un efecto sumatorio a la hora de proporcionar supervivencia al parásito y proteger el tejido del hospedador<sup>(18)</sup>.

La IL-10 se encarga de disminuir la inflamación durante el desarrollo del parásito en el músculo, además disminuye los niveles de INF- $\gamma$  (proinflamatorio) y la producción de local de iNOS (limita el daño oxidativo/nitrosativo), provoca la supresión de las respuestas Th1 que le lleva al parásito a la supervivencia dentro de la célula nodriza<sup>(10)</sup> e inhibe la respuesta Th17 responsable de la liberación de IL-17 que participa en muchos procesos de autoinmunidad<sup>(9)</sup>.

En un ensayo en el que se quiso confirmar la sinergia entre TGF- $\beta$  e IL-10, se neutralizó TGF- $\beta$  en ratones IL<sup>-/-</sup> infectados con *T. spiralis* lo que produjo una miositis (inflamación muscular por infección) más severa que en ratones que sólo tenían déficit de TGF- $\beta$  o de IL-10, y además conllevó a la muerte del parásito. Ambas citoquinas tienen respuestas distintas, TGF- $\beta$  atenúa la respuesta de la citoquina predominante e IL-10 se dirige específicamente a la respuesta Th1<sup>(18)</sup>.

La IL-10 es producida en la infección muscular más temprana por los **eosinófilos**, la cual protege a las larvas y mejora su supervivencia, expande a su vez CDs IL-10+ y linfocitos CD4+ IL-10+. La eosinofilia es característica en una respuesta Th2 a helmintos,

ya que son rápidamente reclutados en el lugar de la infección tras una respuesta innata a la lesión causada por la LRN. En un estudio realizado en ratones se inyectó la LRN en el musculo y transcurridas unas horas aumento la IL-6 en plasma derivada del músculo, ésta pudo aumentar los niveles de IL-10 ya que influye en las poblaciones de linfocitos T. Además también la IL-27 aumentó sus niveles y produjo un aumento de eosinófilos activados en el lugar de la infección, responsables también de la secreción de IL-10 <sup>(18)</sup>.

En un estudio en ratones en el que se habían eliminado el linaje de eosinófilos, las larvas que se encontraban en la fase muscular fueron destruidas por el óxido nítrico producido por los macrófagos a través la expresión de iNOS. En cambio si durante los 10 primeros días se les proporcionaba eosinófilos se prevenía la muerte de las larvas <sup>(20)</sup>.

Por tanto los eosinófilos se encargan de la producción de IL-10 entre otras cosas, pero en estudios en los que se han eliminado los eosinófilos y han transferido CDs 10+ o células CD4+ se ha protegido a las larvas, de manera que de esta forma también se puede inhibir la producción de NO <sup>(20)</sup>.

Existen estudios donde se ha encontrado linfocitos **Breg** en las infecciones causadas por helmintos, productores de IL-10 más comúnmente pero también de TGF- $\beta$  <sup>(4)</sup>. Además son capaces de reclutar Treg <sup>(9)</sup>. Hay distintos inmunofenotipos de Breg muy heterogéneos <sup>(4)</sup>. La alergia respiratoria puede ser suprimida por células Breg de ratones infectados por *Schistosoma mansoni* a través de la producción de IL-10 y elevando la actividad de las Tregs <sup>(6)</sup>. Realizan la regulación a través de receptores, CD40 y posiblemente TLR. Son capaces de producir IgG4 que es un isotopo antiinflamatorio que activa al complemento. Aunque aún no están estudiadas exactamente en *T.spiralis* podrían tener un papel importante <sup>(9)</sup>.

Existen dos tipos de vía para activar a los **macrófagos**, de la forma clásica o de la forma alternativa. Se ha visto que la infección por parásitos produce la activación a través de la segunda vía mediante citoquinas de la respuesta Th2, dando lugar a macrófagos activados alternativamente. Estos MAA son capaces de suprimir respuestas de los linfocitos T produciendo IL-10 y TGF- $\beta$ , e incluso transformarlos en Tregs. Los productos ES de *T.spiralis* pueden modular la función de los macrófagos in vitro hacia el fenotipo alternativo mediante la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12), de esta forma reduce la gravedad de las

enfermedades inflamatorias. In vivo no se sabe si los MAA se inducen directamente actuando sobre los macrófagos, o mediante las CDs <sup>(9)</sup>.

Se cree que pueden tener un papel importante también las **células NK**, que probablemente se estimulen durante la migración de la LRN y los primeros estadios de la larva en el músculo. Aunque se ha encontrado que las células epiteliales intestinales durante la infección responden a IL-13 secretada por las células NK, que se encargan de la reestructuración del tejido intestinal durante la infección. Se descubrió que las células NK mataban de forma eficaz linfocitos T CD4+ activados <sup>(9)</sup>.

Una vía de señalización que está en estudio es la de la **IL-33** procedente de las células epiteliales. Parece ser que al ser inhibida permite la cronicidad de la infección. En principio es eficaz con *Heligmosomoides polygyrus* pero hay que conocer si es común a otros helmintos. Los ratones que no poseen esta vía son más susceptibles a las infecciones por nematodos. Los productos ES de *H.polygyrus* suprimen la liberación de IL-33 y la expresión del receptor de IL-33 disminuyendo la respuesta Th2 y la inflamación en ratones con asma. Ocurre lo mismo con IL-25, que también es crucial para la expulsión del parásito <sup>(6)</sup>. Ambas interleucinas se denominan alarminas y estimulan ILC2 esencial para mantener la integridad de la mucosa <sup>(20)</sup>.

Además de los mecanismos utilizados anteriormente, existe una relación positiva entre la **microbiota** y los helmintos. La infección por *T.spiralis*, entre otros nematodos, provoca un aumento de la colonización de *Lactobacillus*, incluso una administración de estos microorganismos a ratones, les hace más susceptibles de la infección helmíntica (en concreto a *H. polygyrus*). Un transvase de productos intestinales de ratones infectados a no infectados les proporcionó unos efectos inmunomoduladores que le supusieron una resistencia a la alergia <sup>(6)</sup>.

Como se ha comentado antes, los mecanismos inmunomoduladores de los helmintos están considerados **protumorigénicos**. Esto es debido a las respuestas inflamatorias crónicas que crean un microambiente tumoral, porque hay una producción de factores procarcinogénicos directos o por la supresión de la inmunovigilancia. Por ejemplo se conocen algunos trematodos como *Schistosoma haematobium* que está relacionado con el cáncer de vejiga, o *Opisthorchis viverrini* con el colangiocarcinoma <sup>(6)</sup>. La forma en la que está relacionado el cáncer con los helmintos es la siguiente: las células supresoras se acumulan durante las infecciones y están implicadas en la expulsión

del parásito, además las Treg y los macrófagos activados están relacionados con la supresión de las respuestas antitumorales. Aun sabiendo esto, no se conoce la epidemiología en esta área <sup>(6)</sup>.

Al margen de lo descrito anteriormente, nuevas líneas de investigación dicen que la infección por *T.spiralis* o un tratamiento con extractos crudos del parásito, pueden ralentizar o inhibir la progresión de tumores, incluso en células tumorales muy agresivas como el melanoma B16. Ralentiza la necrosis tumoral y aumenta ligeramente la apoptosis. Los estudios están encaminados en la investigación de la tropomiosina, un componente de las miofibrillas de *T.spiralis*. También se ha propuesto la proteína recombinante A200711 como tratamiento del carcinoma hepatocelular <sup>(11)</sup>.

### **TERAPIA HELMÍNTICA:**

#### **Esclerosis múltiple:**

La EM es una enfermedad inflamatoria crónica producida en el sistema nervioso central (SNC) en el que se produce una desmielinización y es característica de adultos jóvenes. No se conoce exactamente cuál es la etiología de dicho problema, pero ensayos clínicos realizados en el modelo animal más similar de la enfermedad: EAE han propuesto que se trata de una enfermedad autoinmune <sup>(8,21)</sup>.

En 2007 se analizó una población en la que había una cohorte con 12 pacientes con EM control y otros 12 con EM que presentaban infección helmíntica asintomática contraída naturalmente y que no tomaban terapia antihelmíntica. Los pacientes libres de parasitismo (control) tuvieron un aumento en cuanto a la sintomatología de la EM durante 4,6 años que se estudiaron, sin embargo en los que estaban infectados la EM prácticamente cesó, hasta que algunos de ellos empezaron a tener síntomas y tuvieron que ser tratados con terapia antihelmíntica, lo que supuso un empeoramiento de la EM. Se observó que durante la infección helmíntica aumentaron los niveles de células mononucleares en sangre periférica que liberaban IL-10 y TGF- $\beta$ , además de un aumento de Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> y Breg productoras de IL-10 y factores de crecimiento neurotróficos <sup>(8)</sup>.

En otro estudio se investigó la influencia de las CDs de ratas Dark Agouti expuestas a los antígenos ES de *T.spiralis* (con anterioridad) como posible tratamiento para la EAE. Esta estimulación generó un estado inmunológico característico de la infección. Bajo la influencia de productos ES las CDS adquieren un fenotipo de

semimadurez y pueden polarizar linfocitos T vírgenes, lo que apunta a una naturaleza tolerogénica que conlleva a una baja expresión de moléculas coestimuladoras (como se ha descrito anteriormente). Las CDs cultivadas con antígenos obtuvieron una moderada elevación de CD86, una significante de ICAM1 y el MHC II no fue elevado. En el sobrenadante no se encontraron niveles altos de IL-12p70 (respuesta Th-1) pero si de IL-10 característico de la respuesta reguladora <sup>(16)</sup>.

Las CDs estimuladas aumentaron la producción de IL-4, IL-10 y TGB- $\beta$  (citoquinas que alivian la EAE) y activaron Tregs, además de disminuir INF- $\gamma$  e IL-17. La inhibición de las citoquinas Th-1 y Th-17 (responsables de la autoinmunidad) viene dado por los elevados niveles de IL-10 y TGB- $\beta$ , lo que conduciría al efecto beneficioso <sup>(7,16)</sup>.

En el estudio se inyectaron 3 dosis distintas (de mayor a menor concentración) de las CDs estimuladas 7 días antes de la inducción de EAE, mientras el control solo recibía CDs sin estimular. El curso de la enfermedad no se vio alterado por la primera dosis, sin embargo la severidad de la enfermedad disminuía de forma dosis dependiente. En las ratas control la enfermedad seguía su curso normal. Las CDs pulsadas activan y mantienen mecanismo antiinflamatorios y reguladores en ratas DA <sup>(16)</sup>.

Lo que se teme es si una vez en el organismo receptor, las CDs tolerogénicas son influenciadas por el fenotipo inverso, pero observando que mantienen un efecto antiinflamatorio frente a la enfermedad se puede presuponer que son estables <sup>(16)</sup>.

Las células Treg una vez activadas por un antígeno específico pueden inhibir la función efectora de las células T sin importar su especificidad antigénica, lo que conlleva a que no es necesario el reconocimiento del antígeno diana para su supresión, es decir modula la respuesta a antígenos heterólogos <sup>(13,16)</sup>.

### **Diabetes autoinmune tipo I:**

En otro estudio se determinó si la infección con *T.spiralis* o con *Heligmosomoides polygyrus* incidía sobre la diabetes autoinmune tipo I. Se realizó en ratones NOD (diabéticos no obesos) y en BALB/c. En este caso, llevó a cabo una infección en vez de utilizar los antígenos y exponerlos frente a las células dendríticas in vitro. Se quería conocer si la inducción Th2 producida por la infección helmíntica podría revertir la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ -pancreáticas mediada por una respuesta Th1 <sup>(13)</sup>.

Para conocer el estado de la diabetes en el transcurso del estudio se tomaron los valores de la glucosa en sangre ( $\geq 12$ mmol/L). Tras analizar los ratones no infectados a medida que aumentaban las semanas de vida, aumentaban la incidencia de los diagnósticos de diabetes tipo I, hasta llegar a un 80% en la semana 22/23. En cambio en ratones infectados con los helmintos se mantuvieron libres de la diabetes durante todo el estudio (36/37 semanas) <sup>(13)</sup>.

Tras varios análisis se estimó que la infección, efectivamente, daba lugar a una respuesta Th2 como se pudo confirmar con la elevación de los niveles de IL-4 e IgE, pero está no reduce necesariamente la respuesta Th1, encargada de la liberación de TNF- $\gamma$ , si no que realmente es la respuesta regulatoria y la consiguiente producción de IL-10 lo que ofrece protección potencial frente a la diabetes tipo I. Además se observó que la infección por *T.spiralis* tenía un efecto más protector, aunque realmente en ratones NOD infectados por este parásito no se vio mayor producción de IL-10 <sup>(13)</sup>.

En otro estudio se inyectó peritonealmente proteínas solubles aisladas de huevos de *Schistosoma mansoni* (SEA), lo que produjo un aumento de TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 además de células T CD4+CD25+Foxp3+ y la inducción de macrófagos activados productores de TGF- $\beta$ , que consiguieron la protección frente a la diabetes autoinmune <sup>(7)</sup>. También se piensa que pueden estar involucradas las células NK <sup>(9)</sup>.

Por tanto la inmunidad de la diabetes es paradójica. Se han realizado diversos estudios con distintos parásitos y cada uno tiene una forma distinta de ofrecer protección, pero además hay estudios con bacterias y virus, los cuales también tienen mecanismos distintos <sup>(7,13)</sup>.

### **Enfermedad inflamatoria intestinal:**

La EII como las anteriores enfermedades autoinmunes vistas se asocia a una respuesta Th1. Se trata de una afección inflamatoria crónica y recurrente del tracto gastrointestinal manifestada como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. En un estudio se observó que la infección primaria (intestinal) con *T.spiralis* aliviaba el daño colónico en ratones a los cuales se les habían administrado DNBS después de la infección para generar una colitis experimental. Los ratones a los que se les administró DNBS y no fueron infectados por *T.spiralis* (control) tuvieron un aumento en los niveles de mieloperoxidasa (MPO) <sup>(22)</sup>, que producen grandes cantidades de superóxido y ácido hipocloroso, responsables de la citotoxicidad directa en el tejido intestinal <sup>(23)</sup>. En cambio



en los infectados hubo una significativa disminución de dichos niveles. Además los niveles de IL-12 eran muy altos en los ratones control y en los infectados previamente bajaron, al igual que ocurrió con el INF- $\gamma$ . La mejora de la enfermedad viene acompañado de respuesta Th2 que disminuyó la Th1. La respuesta Th2 está mediada en una parte importante por la IL-4 y IL-13 mediante la activación de la vía Stat6, que regulan la actividad motora del intestino, la hipercontractilidad de la musculatura y contribuyen a la inmunidad protectora del hospedador en la infección por el parásito. Un estudio reciente muestra que en ratones con deficiencia de Stat6 se produjo una acción más agresiva la colitis producida por DNBS <sup>(22)</sup>.

En cuanto a la infección crónica se investiga la glucoproteína 45 kDa que tiene un posible efecto antiinflamatorio <sup>(22)</sup>. Otros estudios proponen que la regulación en el estado muscular es la inducción de respuestas reguladoras por los elevados niveles de Treg. Algunos autores se centraron en el aporte de antígenos en vez del parásito, y se regularon negativamente las enzimas: iNOS, MPO y la IL-1 $\beta$  que son marcadores de la colitis. Además se mejoró la producción de citoquinas Th2 responsables de la supresión de respuestas Th1 <sup>(11)</sup>.

La glucoproteína 53 kDa también se propone como posible candidata gracias a sus propiedades inmunomoduladoras. Se inmunizó a ratones con colitis inducida por TNBS con esta glucoproteína recombinante. La administración de esta atenuó los síntomas de la colitis (diarrea y heces sangrientas), disminuyó el daño a la mucosa y el engrosamiento de la pared del colon, redujo la cantidad de células inflamatorias en la mucosa y submucosa. La citoquinas IL-6, INF- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  disminuyeron mientras que IL-10 y TGF- $\beta$  aumentaron junto a citoquinas de la respuesta Th2 (IL-4 e IL-13). Aumentaron también los MAA que liberan también IL-10 y TGF- $\beta$  que suprimen la respuesta inmune y restaura los tejidos lesionados. Se había visto en estudios anteriores que la inyección de MAA reducía la inflamación inducida por DNBS. La rTSp53 es capaz de estimular IgG1 fuertemente sin producción específica de IGg2A. Se llegó a la conclusión de que la glucoproteína es eficaz para prevenir la colitis experimental mediante la estimulación de respuestas Th2 y la supresión de Th1, por lo que podría prevenir la EII <sup>(24)</sup>.

### **Alergia:**

La asociación inversa entre la alergia y la infección por parásitos se ha visto en distintos estudios epidemiológicos <sup>(12)</sup>. Probablemente es debido a la red antiinflamatoria

formadas por las células Treg. Se ha demostrado en animales de experimentación que están protegidos frente a la EAAI producida por sensibilización a OVA cuando se infectan por *T.spiralis* <sup>(11,19)</sup>. En este estudio se vio que tanto la fase aguda como la crónica era capaz de producir la modulación, pero en mayor medida es la crónica, que es la que nos interesa en esta revisión. La fase crónica se estableció antes de la sensibilización con OVA y se observó cómo los niveles de IgE específicos de OVA en suero estaban reducidos, al igual que la inflamación de las vías respiratorias y las citoquinas Th2 <sup>(19)</sup>. Los macrófagos y los eosinófilos se redujeron también en un 23% y 52% respectivamente <sup>(25)</sup>. Todo ello se debió al aumento de linfocitos Treg CD4+CD25+Foxp3+ que aportaron su actividad supresora <sup>(19)</sup>. En otro ensayo se caracterizaron las citoquinas y se mostró una disminución significativa de IL-4 e IL-5 en los grupos infectados por *T.spiralis* pero no de IL-13 (citoquinas responsables de la respuesta Th2). Los niveles de INF- $\gamma$  (Th1) no disminuyeron significativamente. Por tanto el cambio más importante fue el aumento de IL-10 y TGF- $\beta$ . Se llegó a la conclusión de que fue el reclutamiento de las células Treg las que redujeron la inflamación en las vías respiratorias <sup>(25)</sup>. Se han realizado experimentos con otros helmintos obteniendo resultados muy parecidos en los que también se protegía a los ratones de EAAI <sup>(19,25)</sup>.

Se quiso ver también la efectividad de transferir células CD4+ expuestas previamente a *T.spiralis* a ratones tratados un día antes con OVA para producir la EAAI. Se obtuvo una disminución significativa de eosinófilos y de IL-5, pero otros parámetros como la IgE específica de OVA no fue variado y el análisis histológico mostró que la infiltración celular de los bronquios disminuyó pero no era significativa, lo que conlleva a pensar en una protección parcial <sup>(19)</sup>.

Otra hipótesis que se baraja para la modulación de la alergia es la siguiente: la respuesta Th2 frente a parásitos está caracterizada por niveles elevados de anticuerpos de IgE policlonales no específicos que se encargan de su protección contra la desgranulación de mastocitos y basófilos saturando los sitios de unión a la IgE en esas células. De esta forma se podría bloquear la liberación del mediador inflamatorio de los mastocitos y por tanto las respuestas alérgicas podrían mejorarse. Además se demostró que los altos niveles de IgE sérica total inducida por helmintos suprime la síntesis de IgE específica del antígeno en los pulmones <sup>(9)</sup>.

En otros ensayos se ha determinado que son los altos niveles de IgG4 específicos para el parásito los que pueden inhibir la desgranulación mediada por IgE <sup>(9)</sup>.

## **CONCLUSIONES:**

De todos estos estudios cabría esperar que la terapia helmíntica supusiera una gran revolución a la hora de abordar las enfermedades autoinmunes, inflamatorias y alérgicas, pero aún debe estudiarse más a fondo en humanos. Probablemente según para cual enfermedad, afectará de un modo u otro, ya que puede ser que el nicho que ocupa *T.spiralis* no afecte a la enfermedad. Otra cosa importante que debe tenerse en cuenta es la dosis de parásito que debe inocularse, tiene que ser efectiva para poder controlar la patología inflamatoria, pero a la vez no debe causar la sintomatología natural de la infección. Hay que conocer si la infección tiene que ser como profilaxis en los primeros años de vida o si por el contrario es mejor que se produzca durante el curso de la enfermedad. También se deberían conocer los tiempos de inoculación que resulten los más efectivos.

Por lo cual, seguramente sea más seguro conocer más a fondo los mecanismo utilizados y los productos ES que están involucrados en la inmunomodulación para desarrollar preparados farmacéuticos que se inoculen en las personas.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

1. Valdivia G. Transición epidemiológica: la otra cara de la moneda. Rev Med Chil. 2006; 134: 675-678.
2. Daschner A. Una visión evolucionista de la hipótesis de la higiene en alergia y las enfermedades inflamatorias crónicas. MedEvo. 2012; 1: 75-91.
3. Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic L. *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. Immunol Res. 2012; 52: 111-119.
4. Zakzuj J. Inmunoregulación inducida por helmintos: una actualización. Iatreia. 2016; 29 (2): 182-193.
5. Maizels R. Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016; 22: 481-486.
6. Maizels R, McSorley H. Regulation of the host immune system by helminth parasites. J Allergy Clin Immunol. 2016; 138: 666-75.
7. Elliott D, Weinstock J. Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. Ann N Y Acad Sci. 2012; 1247: 83-96.

8. Fleming J. Helminth therapy and multiple sclerosis. *Int J Parasitol.* 2013; 43: 259-274.
9. Ashour D. *Trichinella spiralis* immunomodulation: an interactive multifactorial process. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2013; 9(7): 669-675.
10. Khan A, Fallon P. Helminth therapies: Translating the unknown unknowns to known knowns. *Int J Parasitol.* 2013; 43: 293-299.
11. Sofronic-Milosavljevic L, Ilic N, Pinelli E, Gruden-Movsesijan A. Secretory Products of *Trichinella spiralis* Muscle Larvae and Immunomodulation: Implication for Autoimmune Diseases, Allergies, and Malignancies. *J Immunol Res.* 2015; 2015.
12. Strachan D. Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J.* 1989; 299: 1259-1260.
13. Saunders K, Raine T, Cooke A, Lawrence C. Inhibition of Autoimmune Type 1 Diabetes by Gastrointestinal Helminth Infection. *Infect Immun.* 2007; 75 (1): 397-407.
14. Graham A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: The broader implications of the hygiene hypothesis. *Abreviatura Immunol J cell molec sist.* 2008; 126: 3-11.
15. Luna B, Sánchez S. Triquinelosis humana. *Abreviatura Arch Medic Asoc Español MIR.* 2006; 2(004): 1-11.
16. Elliott D, Weinstock J. Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1247: 83-96.
17. Hewitson J, Grainger J, Maizels R. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol.* 2009; 167: 1-11.
18. Beiting D, Gagliardo L, Hesse M, Bliss S, Meskill D, Appleton J. Coordinated Control of Immunity to Muscle Stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T Cells, and TGF- $\beta$ . *J Immunol.* 2007; 178: 1039-1047.
19. Azaramendi C, de Bruin A, Kuiper R, Boog C, van Eden W, Rutten V, Pinelli E. Protection against allergic airway inflammation during the chronic and acute phases of *Trichinella spiralis* infection. *Clinical & Experimental Allergy.* 2013; 43: 103-115.
20. Huang L, Gebreselassie N, Gagliardo L, Ruyechan M, Lee N, Lee J, Appleton J. Eosinophil-derived IL-10 supports chronic nematode infection<sup>1</sup>. *J Immunol.* 2014; 193 (8): 4178-4187.

21. Martínez-Cáceres E, Montalban X. Cuestiones sobre la patogenia de la sclerosis multiple. *Inmunologia*. 2000; 19 (2,3): 81-89.
22. Khan W, Blennerhasset P, Varghese A, Chowdhury S, Omsted P, Deng Y, Collins S. Intestinal Nematode Infections Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Infect Immun*. 2002; 70(11): 5931-5937.
23. Ballester I, Camuesco D, Gálvez J, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal. *Ars Pharm*. 2006; 47 (1): 5-21.
24. Du L, Tang H, Ma Z, Xu J, Gao W, Chen J, Gan W, Zhang Z, Yu X, Zhou X, Hu X. The Protective Effect of the Recombinant 53-kDa Protein of *Trichinella spiralis* on Experimental Colitis in Mice. *Dig Dis Sci*. 2011; 56: 2810-2817.
25. Park H, Kyoung M, Hee S, Seong Y, Sun H. *Trichinella spiralis*: Infection reduces airway allergic inflammation in mice. *Exp Parasitol*. 2011; 127: 539-544.