



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

EFFECTO DE LA FRACCIÓN GST DE *Taenia solium* SOBRE LOS MACRÓFAGOS  
DE RATÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

**PRESENTA:**

VERA TERESA VEGA ANGELES

**TUTOR PRINCIPAL**

Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
FACULTAD DE MEDICINA (UNAM)

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dr. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO  
FACULTAD DE MEDICINA (UNAM)

Dr. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA (UNAM)

MÉXICO, D. F. enero, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN219711 “Estudio de la transcripción de genes de linfocitos y macrófagos de cepas de ratones susceptibles y resistentes, vacunados o no durante la infección causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*” , y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-176925) “Estudio de la transcripción de los genes de ratones susceptibles y resistentes, así como del parásito durante la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*”

La autora recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Maestría en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, con el número de becario 378618

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	4
<b>Resumen</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	6
<i>Taenia solium</i> .....	7
Parásitos e inmunomodulación.....	9
Respuesta inmune en ratones Balb/c infectados con <i>Taenia crassiceps</i> .....	9
Activación de macrófagos.....	10
Activación de macrófagos en el modelo murino de cisticercosis por <i>T. crassiceps</i> .....	12
Enzimas desintoxicantes y defensa del parásito.....	13
Las Glutación S- transferasas (GST).....	14
<b>Antecedentes</b> .....	15
<b>Hipótesis</b> .....	17
<b>Objetivos</b> .....	18
<b>Metodología y Materiales</b> .....	19
Estrategia experimental.....	19
Material Biológico.....	19
Modelo de ratón- <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.....	19
Purificación de de la Fracción GST de <i>Taenia solium</i> .....	19
Obtención de macrófagos peritoneales.....	20
Extracción de RNA y RT-PCR.....	21
Determinación de IL por ELISA sándwich.....	22
Citometría de flujo.....	22
Inmunofluorescencia.....	23
<b>Resultados</b> .....	24
<b>Discusión</b> .....	30
<b>Conclusiones</b> .....	34
<b>Referencias</b> .....	35

## ABREVIATURAS

AAMs	Macrófagos alternativamente activados.
ADNc	ADN complementario.
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ASK-1	Cinasa señal reguladora de apoptosis
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FGST	Fracción de Glutación Transferasa de <i>Taenia solium</i> .
FIZZ-1	Molécula parecida a resistina –alfa 1.
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
GSTTs1	Glutación Transferasa de <i>T. solium</i> de 25.5 kDa
GSTTs2	Glutación Transferasa de <i>T. solium</i> de 26.5 kDa
INF $\gamma$	Interferón gamma
LPS	Lipopolisacárido
M1	Macrófago clásicamente activado
M2	Macrófago alternativamente activado
MIF	Factor inhibitorio de migración de macrófagos
MR	Receptor de manosa
PD-L1	Ligando de Muerte celular programada 1
PD-L2	Ligando de Muerte celular programada 2
RT-PCR	Transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TLR	Toll like receptor
Ym1	Lectin quitinasa Ym1

## RESUMEN

Los macrófagos son células importantes en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa que responden rápidamente a antígenos o combinaciones de estímulos que pueden ejercer un efecto en el tipo de activación de los macrófagos, generando así poblaciones celulares con fenotipos diferentes. En el modelo murino de cisticercosis se sabe que la respuesta inmune de tipo Th1, con presencia de macrófagos clásicamente activados (M1), es protectora y que conforme el parásito se establece, la respuesta cambia hacia el tipo Th2. En esta respuesta favorable para el cestodo, se encuentran macrófagos con un fenotipo alternativamente activado (M2). Así mismo se ha comprobado que los macrófagos son esenciales en el combate del hospedero frente a esta infección; dado que si los macrófagos M2 son eliminados se promueve la respuesta del tipo Th1 y la carga parasitaria disminuye.

*Taenia solium* posee moléculas capaces de generar una respuesta inmune protectora. Tal es el caso de la fracción soluble de Glutación transferasa (FGSTTs) que en experimentos de vacunación, disminuye el 95% la carga parasitaria en la cisticercosis murina. Esta fracción, compuesta por dos GST's solubles (26.5 y 25.5 kDa), desintoxica al parásito contra sustancias nocivas producidas por el hospedero. Dicha fracción fue purificada por medio de una cromatografía de afinidad que permitió obtener ambas proteínas de en su forma activa.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que la FGSTTs tiene sobre macrófagos peritoneales de ratón. Dichas células estimuladas *in vitro* con esta fracción mostraron secreción de IL-12 y TNF $\alpha$ , expresaron iNOS y PDL1, mientras que moléculas de activación alternativa como Ym-1 no fueron encontradas. Además, se observó por microscopía que la FGSTTs fue inicialmente internalizada para después distribuirse en la superficie de los macrófagos. Los datos anteriores sugieren que la FGSTTs es capaz de activar a los macrófagos hacia un fenotipo clásicamente activado. Dicha activación puede ser importante en esta infección debido a que la exposición de estos macrófagos a la FGSTTs podría inclinar la respuesta hacia Th1 y así disminuir la carga parasitaria.

## INTRODUCCIÓN

La taeniosis y la cisticercosis son infecciones causadas por el parásito *Taenia solium* que afectan al ser humano. La taeniosis es causada por el adulto de dicho helminto en el intestino del hospedero definitivo, se produce cuando el cisticerco es ingerido y después activado por los ácidos gástricos y las sales biliares para finalmente establecerse en el intestino delgado donde se desarrolla y produce los huevos, que son expulsados con la heces y que al ser ingeridos por el hospedero intermediario (cerdo) o accidental (humano) le causaran la cisticercosis (Fig 1). Existen dos especies de *Taenia* que causan taeniosis en el humano: *Taenia solium* y *Taenia saginata*, con la diferencia de que ésta última utiliza como hospedero intermediario a los bovinos (Flisser A., 2006).

La forma más grave de esta infección es la neurocisticercosis, en la cual el cisticerco o metacestodo (forma larvaria de este parásito) se aloja en el sistema nervioso del hospedero. Este padecimiento es de importancia en salud pública debido a la discapacidad producida por sus síntomas neurológicos y por su letalidad; sin embargo, en la mayoría de los casos el curso que sigue esta parasitosis es benigno. La infección se desarrolla cuando el hospedero definitivo, que es el humano, ingiere huevos de *Taenia* propiciado por las malas prácticas de higiene. La condición más comúnmente asociada con neurocisticercosis es la epilepsia. Un gran número de estudios muestra una fuerte asociación (por arriba del 50%) entre la epilepsia tardía y la neurocisticercosis en áreas endémicas para *T. solium*. (García et al. 1991).

La prevalencia y tendencia a dispersarse de estas enfermedades se ha acelerado notablemente debido a la pobreza, mala infraestructura de salud pública, la explosión demográfica, la crianza rural e intensiva de cerdos, el desarrollo de las vías de comunicación entre diversas partes del mundo y por el masivo movimiento de migrantes trabajadores y turistas. (Larralde C. y De Aluja A, 2008)

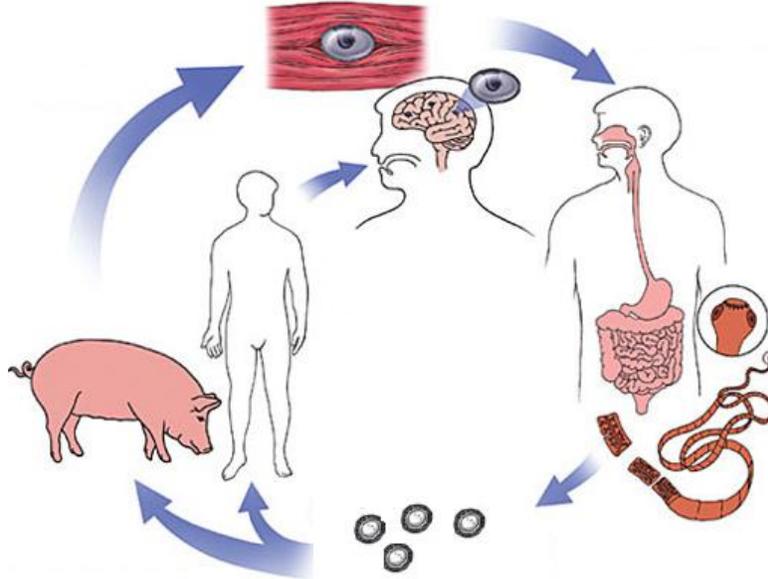


Figura 1 Ciclo de vida de *Taenia solium*, el hospedero intermediario es el cerdo que, al ingerir huevos provenientes del parásito adulto, se desarrollan a la forma larvaria en zonas de alto gasto energético como es el músculo. Cuando el hospedero definitivo (humano) consume la carne de este cerdo se cierra el círculo desarrollando la tenia. La cisticercosis humana aparece cuando el humano ingiere los huevos debido a malas prácticas de higiene. Modificado de [www.aafp.org/afp/2007/0701/afp20070701p91-f1.jpg](http://www.aafp.org/afp/2007/0701/afp20070701p91-f1.jpg).

Existen diferentes formas en que los helmintos son capaces de evadir la respuesta inmune del hospedero de manera que la infección pueda establecerse. En el caso de *Taenia solium* solo se ha identificado que los carbohidratos juegan un papel importante en la modulación de la respuesta hacia el tipo Th2 (Dissanayake et al. 2002, Gómez-García et al. 2006) pero no se ha demostrado hasta ahora que moléculas aisladas sean capaces de generar un efecto sobre las células del sistema inmune.

### ***Taenia solium***

*Taenia solium* pertenece al *phylum Platyhelminthes*, clase *Cestoda*, orden *Cyclophyllidae*, familia *Taenidae*, género *Taenia*, especie *solium* (Linneaus, 1758). Este parásito muestra tres estadios diferentes a lo largo de su vida: el huevo, el metacestodo o cisticerco y el gusano adulto (Fig.2). Los huevos son esféricos y morfológicamente muy parecidos a los de otras tenias, en su parte más externa presenta un vitelo al cual le sigue el embrióforo que es la estructura que le confiere

protección; la estructura interna es el embrión hexacanto que está cubierto por la membrana oncosferal. Cuando el huevo es ingerido por el hospedero eclosiona en el intestino liberando a la oncósfera que es capaz de atravesar la mucosa intestinal y llegar a la sangre, distribuyéndose en diversos tejidos. El cisticerco es una vesícula ovalada que muestra una pared vesicular dentro de la cual se encuentra el escólex invaginado. La pared vesicular está conformada por un tegumento con microtricas por las cuales absorbe nutrientes y excreta sustancias de desecho. La superficie tegumentaria está compuesta por un glicocáliz de carbohidratos, glicoproteínas, glicolípidos y triglicéridos, colesterol y fosfatidil serina. El gusano adulto es aplanado, segmentado y blanquecino y se encuentra anclado a la pared intestinal por medio de un órgano llamado escólex el cual posee un róstelo armado con dos coronas de ganchos y cuatro ventosas. Debajo de este órgano se encuentra el cuello que es un área no segmentada que da origen a los proglótidos o segmentos del cuerpo del parásito. Los proglótidos inmaduros son la parte proximal al cuello y no presentan órganos sexuales diferenciados. Le siguen los proglótidos maduros que son considerados como unidades reproductoras independientes dado que presentan los órganos genitales tanto masculinos como femeninos. En la parte distal del parásito se encuentran los proglótidos grávidos que suelen desprenderse en segmentos cortos y que tienen las ramas uterinas llenas de huevos. (Larralde y De Aluja, 2008; Meza-Lucas y Aguilar, 2002, Flisser et al, 2006)

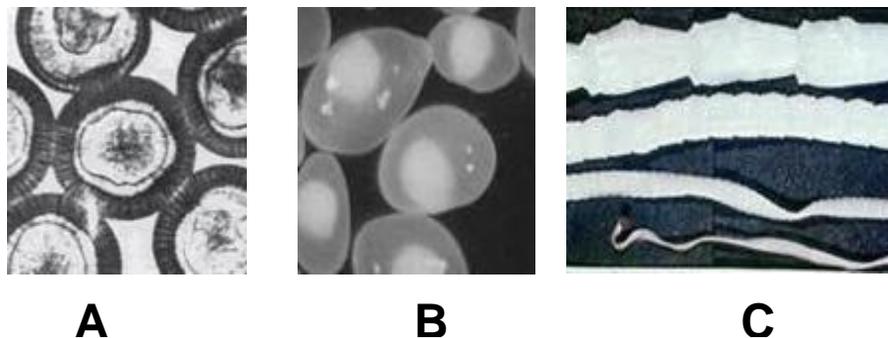


Figura 2. Fotografías de microscopía de luz de A) huevos, B) cisticerco y C) adulto de *Taenia solium*. (Tomada de Larralde C. y De Aluja A., 2008)

## **Parásitos e inmunomodulación.**

Los modelos murinos de infección parasitaria así como el análisis de la expresión génica de helmintos de importancia médica y veterinaria han mostrado una gran variedad de moléculas que potencialmente pudieran estar involucradas en la inmunomodulación. Algunos parásitos son capaces de producir homólogos de citocinas como TGF- $\beta$  y MIF (Gomez-Escobar et. al. 1998; Falcone F. et. al. 2001), otros producen moléculas inhibidoras de proteasas que principalmente actúan sobre asparagin, cistein y serin- proteasas pero que también pueden llevar a cabo funciones de señalización dentro de algunas células como en las células presentadoras de antígenos (APC) (Manoury B. et al. 2001; Zang X. et al. 2001). Se sabe que los carbohidratos son importantes en la interacción hospedero-parásito. El análisis de estos glicanos ha mostrado estructuras comunes presentes en la mayoría de los helmintos conformadas principalmente por N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, manosa y fucosa que en algunos casos están conjugados con fosforilcolina (como en *Acanthocheilonema viteae*) o con esfingolípidos (como en *Ascaris suum*) y en el caso de *T. solium* glicoproteínas como la GP1 (Dell A. et al. 1999; Maizels R. et al. 2004, Landa et al. 2010).

### **Respuesta inmune en ratones Balb/c infectados con *Taenia crassiceps*.**

La respuesta inmune en ratones Balb/c desarrollada en la infección con cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) ha sido ampliamente caracterizada. La inoculación de cisticercos en la cavidad peritoneal de estos ratones provoca la presencia de una respuesta inmune predominantemente celular, y aunque el hospedero es capaz de desarrollar anticuerpos específicos en contra de los antígenos del metacestodo, ésta es insuficiente para la protección y defensa (Cherning 1997, Sciutto et al. 1991). Se ha observado que las células T están involucradas en la respuesta inmune restrictiva para esta infección, siendo la respuesta Th1 la predominante en la resistencia mientras que la Th2 está asociada con altas cargas parasitarias (Terrazas et al. 1999, 1998) La activación diferencial de la respuesta tipo Th1-Th2 juega un papel crucial en la resistencia o susceptibilidad del hospedero a esta infección y las APC profesionales, como los

macrófagos, pueden desempeñar un papel importante en la polarización de la respuesta a través de la secreción local de citocinas, proporcionando los ligandos para el receptor T y señales co-estimuladoras, por lo que el estado de activación de dichas APC es un factor decisivo en la inducción de dicha polarización del sistema inmune (Rodríguez-Sosa et al. 2002).

Los macrófagos son responsables de la presentación de antígeno y la destrucción de microbios y células neoplásicas. En algunos casos sirven como células scavenger, en otros están sometidas a modulación a través de citocinas para mejorar su competencia en la destrucción de parásitos intracelulares facultativos y obligados. Además, los macrófagos son productores de una amplia variedad de proteínas de secreción y de membrana fundamentales para el desarrollo de tolerancia, reconocimiento célula-célula y citotoxicidad mediada por células. También pueden ser regulados por múltiples señales ya sean supresoras o inductoras, así como por su sitio de residencia y los cambios bioquímicos del medio local (Gregory et al. 1998; Rusell, 1995; Gordon, 1998).

### **Activación de macrófagos.**

Los macrófagos son de las primeras células que interaccionan con estímulos tanto externos como propios. Dependiendo del reconocimiento que realicen con sus receptores y su estado de diferenciación, son capaces de secretar diversos productos, que tanto movilizan células como influyen en otras residentes de los tejidos, especialmente en endotelio (Gordon, 1998). Los macrófagos residentes pueden responder rápidamente a estímulos externos con marcadas alteraciones en la expresión de sus genes (Lang et al. 2002) que conducen a funciones aparentemente opuestas en la naturaleza como son proinflamación y anti-inflamación, actividad inmunogénica y actividad tolerogénica, entre otras (Stout, 1997). Los macrófagos responden a una variedad de estímulos como son los ligandos de TLRs, señales de daño endógenas y citocinas. Existe una creciente evidencia que apoya la idea que la naturaleza del estímulo o la combinación de estímulos pueden ejercer un profundo efecto en el tipo de activación de los macrófagos, generando así diferentes poblaciones de macrófagos activados

surgiendo en respuesta a diferentes estímulos (Edwards et al. 2006). Adams y colaboradores demostraron que la actividad inflamatoria y citotóxica de los macrófagos se potencializa cualitativa y cuantitativamente en presencia de  $INF\gamma$  (Adams,1992), mientras que Stein reportó que el tratamiento de macrófagos con IL-4 induce un fenotipo caracterizado por elevada expresión del receptor de manosa y un patrón de funciones marcadamente contrarias a las inducidas por  $INF\gamma$  (Stein, 1992). Subsecuentemente fueron reportados varios fenotipos de macrófagos inducidos por diversos estímulos como las citocinas IL-10 y  $TGF\beta$  y aunque estos fenotipos parecen tener diferentes funciones, se ha considerado que los macrófagos se polarizan principalmente en dos grupos con patrones unos de actividad inflamatoria y otros anti-inflamatoria en relación con las respuestas tipo Th1 y Th2 (Williams et al. 2002, Loke et al. 2002, Goerdts et al. 1999, Mills et al.2000, y que tanto macrófagos como células dendríticas (DC) pueden influir en el tipo Th1/Th2 de la inmunidad adaptativa (McKnight y Gordon, 1998) como en el caso de la infección por *Leishmania* donde los macrófagos infectados incrementan su capacidad de estimular una respuesta tipo Th2 por encima de una Th1 (Chakkalath H. y Titus R., 1994) .

Se ha propuesto que la relación en la proporción de IL-12 frente a la IL-10 puede ser usada como una forma simple para clasificar macrófagos activados en dos categorías: M1 y M2.

Los macrófagos expuestos a  $INF\gamma$  y LPS son polarizados hacia el tipo M1 o clásicamente activados, con citotoxicidad potenciada y propiedades antitumorales, mientras que los macrófagos M2 o alternativamente activados, son en general productores de mediadores inmunoreguladores y pro tumorales. En particular los macrófagos M2a (inducidos por la exposición a IL-4 e IL-13) y M2b (inducidos por complejos inmunes y agonistas de TLR o de IL-1R) ejercen funciones inmunoregulatorias y dirigen una respuesta tipo Th2, mientras que los macrófagos M2c (inducidos por IL-10) están más relacionados con la supresión de la respuesta inmune y la remodelación de tejido (Mantovani et al. 2004) (Fig.3)

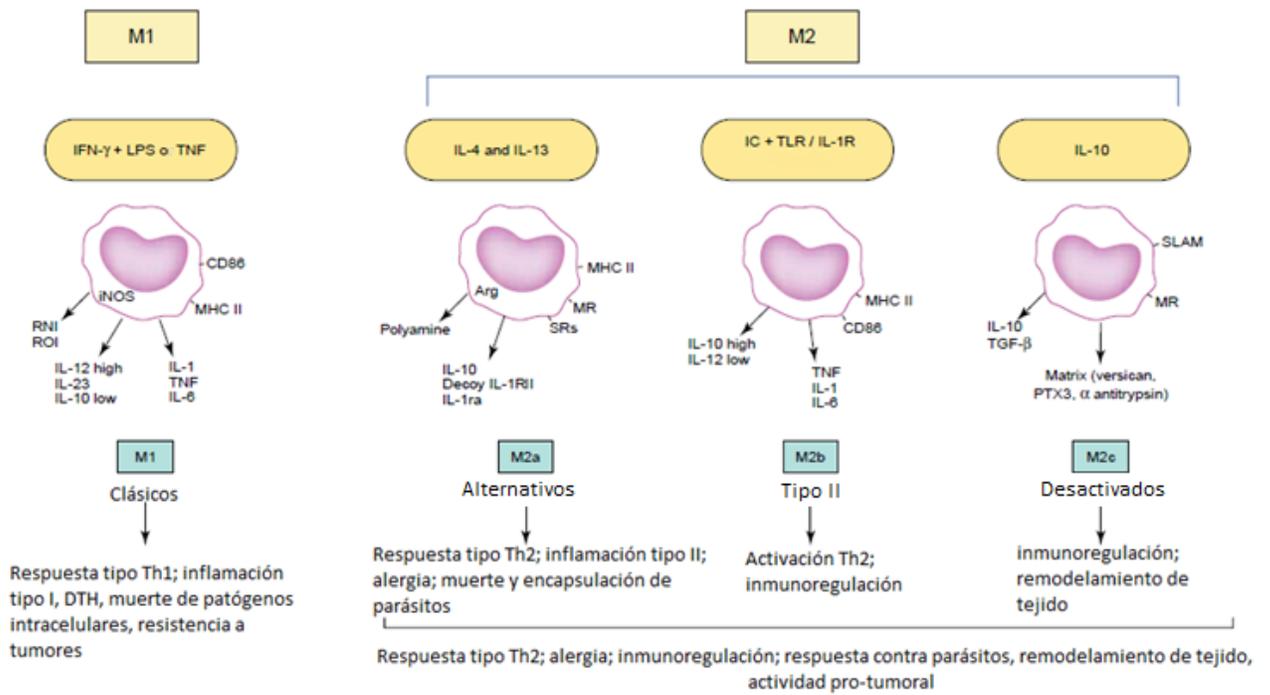


Figura 3. Clasificación de los macrófagos basado en su tipo de activación con las moléculas que caracterizan estos fenotipos. RNI: intermediarios reactivos de nitrógeno, ROI: intermediarios reactivos de nitrógeno, IL-1RII: receptor de interleucina 1 tipo II, MR: receptor de manosa, SRs: receptores scavenger, PTX3: pentraxina 3, SLAM: molécula de señalización de activación leucocitaria. (Modificado de Mantovani et al. 2004).

## **Activación de macrófagos en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps*.**

*Taenia crassiceps* es un parásito de zorros, lobos y perros (hospederos definitivos) y de roedores (hospederos intermediarios) como el ratón. El ciclo de vida de dicho céstodo es parecido al de *T. solium*. Sin embargo, el cisticerco de *T. crassiceps* se puede reproducir asexualmente por gemación en el tejido del hospedero intermediario, esto ha permitido convertirlo en un modelo de laboratorio, dónde la infección se desarrolla en la cavidad peritoneal de ratón por inoculación intraperitoneal de cisticercos provenientes de otro ratón (Willms K. y Zurabian R., 2009).

Se ha observado que los macrófagos peritoneales obtenidos durante infecciones crónicas por *T. crassiceps* muestran una pobre capacidad de inducir una respuesta proliferativa en células T CD4+, además éstas células expresan altos niveles de CD23 y CCR5 el cual está asociado con baja producción de IL-12 y de óxido nítrico pero que producen altos niveles de IL-6 y prostaglandina E2; también presentan altos niveles de expresión de genes específicos como Ym1 y la arginasa-1, así como las moléculas inhibitorias PD-L1 y PD-L2, indicando un fenotipo de activación alternativa (Raes G. et al, 2005; Terrazas I. et al. 2005).

Lo anterior contrasta con los macrófagos reclutados durante la infección temprana, que presentan características de activación clásica, los cuales inducen mayor proliferación de células T CD4 y producen altos niveles de INF- $\gamma$ . El estado de activación del macrófago inducido por la infección crónica por helmintos modula el tipo de respuesta final de las células T CD4 (Fig. 4) (Rodríguez-Sosa M. et al, 2002).

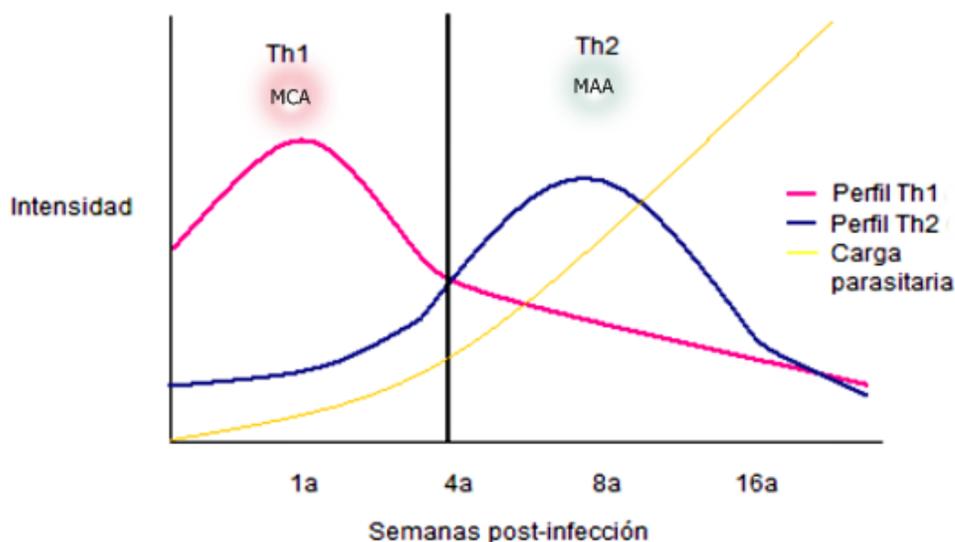


Figura 4. Respuesta inmune en el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*. Al inicio de la infección el perfil tipo Th1 es predominante sobre el tipo Th2 con presencia de macrófagos clásicamente activados, alta producción de  $\text{INF}\gamma$  y una baja carga parasitaria. Conforme el parásito se establece en la cavidad peritoneal del ratón, la respuesta inmune predominante es del tipo Th2 con macrófagos alternativamente activados, mayor producción de IL-4 e IL-6 y un consecuente aumento de la carga parasitaria dado que esta respuesta es permisiva para el cisticerco (Modificado de Terrazas et al., 1998).

### Enzimas desintoxicantes y defensa del parásito.

Entre los diferentes mecanismos que posee la respuesta inmune para combatir al parásito se encuentra la liberación de moléculas tóxicas y la producción de radicales de oxígeno. Las proteínas de los gránulos pueden atacar directamente las membranas alterando la integridad de las mismas y su función, mientras que los radicales de oxígeno causan daño directo o inactivación de proteínas intracelulares del helminto y degradación de sus ácidos nucleicos (Liew y Cox, 1991). Los parásitos se defienden de este estrés con moléculas no enzimáticas (como el glutatión, vitamina E, ácido ascórbico) y/o enzimas como la superóxido dismutasa, la peroxiredoxina o la glutatión transferasa que protegen al helminto de estos ataques del hospedero, así como también lo protegen del daño causado por fármacos antihelmínticos (Tracy y Vande, 1995; Brophy y Pitchard, 1992). La función de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) es la dismutación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$

en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; la de la 2-Cys peroxiredoxina (2-Cys Prx) la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxinitritos e hidroperóxidos, y de las glutatión transferasas es conjugar el glutatión a compuestos electrofílicos (Fridovich I. 1995; Fujii J., Ikeda Y., 2002; Vaca-Paniagua et al. 2008).

### **Las Glutatión transferasas (GST)**

Las Glutatión transferasas fueron identificadas en 1961 y son una superfamilia de enzimas multifuncionales diméricas que conjugan el azufre de la cisteína del glutatión reducido (GSH:  $\gamma$ -glutamil.cisteinil-glicina) a centros electrofílicos de compuestos orgánicos o hidrofóbicos (Wilce M.C.J y Parker M.W., 1994). Las GST's pueden catalizar reacciones como la sustitución aromática, apertura de grupos epóxido, adición reversible de Michael, isomerización o peroxidación. Estas proteínas están agrupadas en tres familias de acuerdo a su localización en la célula: mitocondriales, microsomales o MAPEG (proteínas asociadas a membrana involucradas en el metabolismo de icosanoides y glutatión) y citosólicas. Éstas últimas tienen en promedio 250 aminoácidos en su estructura primaria, son dímeros con subunidades homólogas o heterólogas (Armstrong, R.N. 1997; Frova, C. 2006; Hayes et al., 2005). Además de su actividad desintoxicante se ha mostrado que dichas enzimas están implicadas en otras funciones celulares como en la regulación de vías de señalización y metabolismo (Huang et al. 2002; Kang et al. 2005; Sjostorm et al. 2001). Las GST's citosólicas llegan a representar entre el 3 y 4% de proteína soluble total, lo que indica su alto nivel de expresión y su importancia para la célula. Recientemente, se ha mostrado que están involucradas en regular cascadas de señalización, donde ASK1 está presente y pueden participar en la modulación de la respuesta inmune del hospedero contribuyendo a la producción de leucotrieno C4. (Cho et al. 2011, Sjostorm et al. 2001). Esta enzima es capaz de interactuar con algunos agentes antihelmínticos contribuyendo a la resistencia a fármacos y representando un mecanismo de defensa dado que el cisticerco de *T. solium* está en continuo contacto con xenobióticos, principalmente con especies reactivas de oxígeno debido a la

presencia de macrófagos y eosinófilos degranulados observados en la reacción inflamatoria (McTigue et al 1995, Willms et al. 1982)

La fracción GST de larva de *T. solium* (FGST) está compuesta por dos proteínas con un peso molecular de 25,500 y 26,500, ambas son diméricas y cada monómero tiene un sitio activo que incluye un sitio de unión GSH conservado localizado en el dominio N-terminal llamado sitio G y un sitio de unión a electrófilos localizado en el dominio C-terminal denominado sitio H (Fig. 4) (Torres-Rivera y Landa 2008). Estudios de Inmunolectrotransferencia (IEF) indican que GST25.5 no está antigénicamente relacionada con la de 26.5 kDa, ni con las GSTs de mamíferos. La localización de esta proteína por medio de estudios de inmunohistoquímica muestra que su localización en metacestodos es en el tegumento, parénquima y en el citoplasma de células protonefridiales y subtegumentales con un gradiente de concentración hacia la superficie en el tegumento (Vibanco-Pérez et al. 1999, 2002).

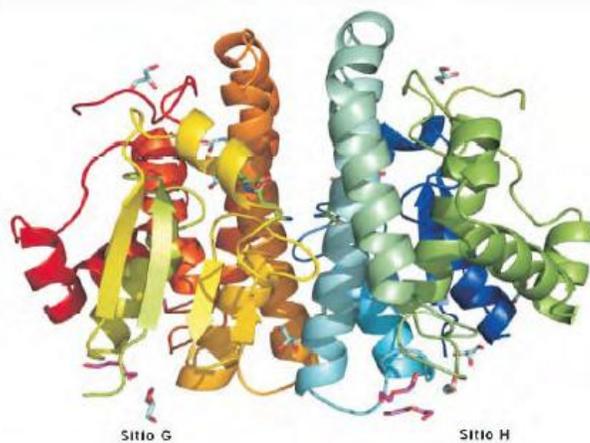


Figura 4. Estructura de la GST26.5 de *Taenia solium* donde se muestran los sitios G y H (tomada de Torres-Rivera 2011)

## Antecedentes

Se ha demostrado que otras moléculas antioxidantes como la tioredoxina peroxidasa de *Fasciola hepática* son capaces de inducir la activación alternativa de macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro* estimulando la expresión de marcadores característicos como Ym1 o Arg-1 en modelos murinos (Donnelly et al 2005, 2008), así como también las GST secretadas de este parásito trematodo pueden reducir la respuesta proliferativa de esplenocitos y la disminución de la secreción de NO en macrófagos peritoneales, indicando que esta molécula puede estar involucrada en la evasión de la respuesta inmune (Cervi et al. 1999).

Estudios previos han demostrado que una proteína con estas características es capaz de funcionar como antígeno y en algunos casos confiere protección. En experimentos de vacunación con GST del trematodo *Schistosoma*, se observó que la carga parasitaria en ratones infectados con este parásito disminuyó (Xu et al. 1997), y que en el caso de bovinos vacunados subcutáneamente con la GST 28kDa recombinante de *S. bovis*, los sueros obtenidos de estos animales mostraron altos títulos de IgG e IgA específicas contra esta GST capaces de inhibir la actividad de esta enzima (Gryzch et al. 1998). En ovejas esta proteína recombinante de *Schistosoma* tuvo un mejor efecto administrada en su forma nativa con un porcentaje de protección hasta del 82%. (Brophy y Pritchard, 1994). En ensayos de protección contra nematodos y trematodos se han presentado diversos efectos sobre la carga parasitaria en los modelos de infección utilizados. En la infección por el nematodo *Haemonchus contortus* se uso GST nativa inmunizada por vía subcutánea en cobayos sin obtenerse ninguna protección. En *Fasciola* la GST recombinante administrada por vía intramuscular en ovejas, presentó un alto porcentaje de protección, mientras que la proteína nativa administrada subcutáneamente en ratas no tuvo efecto sobre la carga parasitaria. En el caso tanto de la FGSTTs, así como de la GST26.5 han demostrado que en el modelo de cisticercosis murina en experimentos de vacunación por *T. crassiceps*, son efectivas en reducir la carga parasitaria en un

74.2%, en contraste no se obtuvo protección usando la GST25.5 de *T. solium* como inmunógeno (Vibanco-Pérez N. et al. 2002).

## **HIPÓTESIS**

Las glutatión transferasas al reducir la carga parasitaria en el modelo murino de infección por *Taenia crassiceps*, serán capaces de activar a los macrófagos hacia un fenotipo clásicamente activado relacionado a una respuesta protectora.

### **OBJETIVO GENERAL**

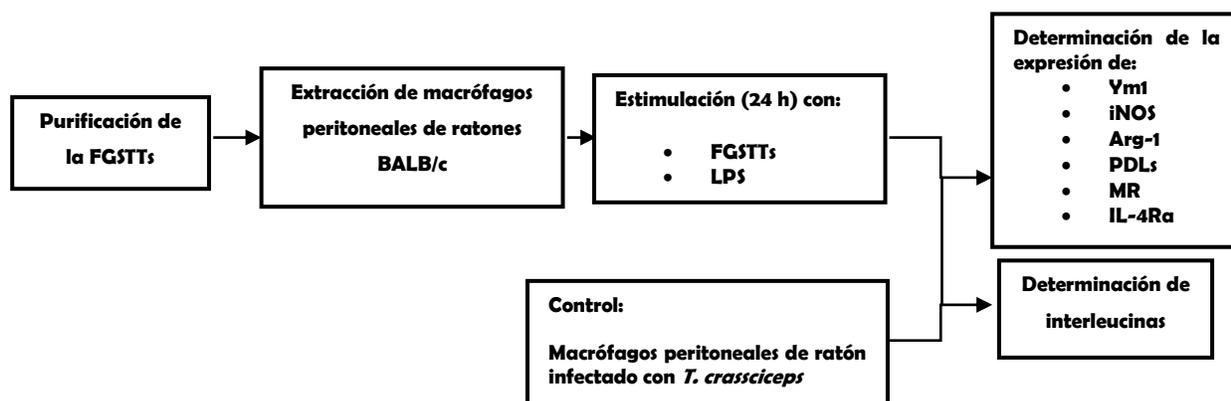
Determinar el efecto que las Glutación transferasas de *Taenia solium* (FGSTTs) tienen sobre macrófagos peritoneales de ratón.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ▶ Obtención de las Glutación transferasas de *T. solium* (FGSTTs) mediante cromatografía de afinidad con glutación.
- ▶ Aislamiento de macrófagos de ratones (BALB/c) sanos y su estimulación con la FGSTTs.
- ▶ Determinación del fenotipo de los macrófagos peritoneales en cultivo expuestos a la FGSTTs.

## METODOLOGÍA Y MATERIALES

### Estrategia experimental.



### Material Biológico.

Cisticercos. Los metacéstodos de *Taenia solium* fueron obtenidos de músculo esquelético de cerdos infectados.

Los ratones (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c de 7-10 semanas de edad se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

### Modelo de ratón-*Taenia crassiceps* cepa ORF.

Ratones hembra BALB/c de 7 semanas de edad, se inyectaron con 20 cisticercos en la cavidad peritoneal. Cinco meses después, de los ratones se extrajeron cisticercos con vesícula clara, no calcificados, sin gemas y con un tamaño de aproximadamente 2 mm de diámetro. Inmediatamente se lavaron con PBS estéril para inyectarlos en la cavidad peritoneal de nuevos ratones con agujas del 18G (10 cisticercos por ratón) y se dejó transcurrir la infección durante 8 semanas.

### Purificación de de la Fracción GST de *Taenia solium*.

Se pesaron 10 g de cisticercos extraídos de carne de cerdo infectado, a éstos se les adicionaron 50 mL de solución de PBS y 1% de tritón mas inhibidores de proteasas [Tosil-L-lisina cloro metil cetona (TLCK) 10 mM, EDTA 0.5 M, Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 200mM]. Se homogenizó por sonicación en pulsos de 1

min descansando 2 min, esto se repite 3 veces en hielo. La suspensión se centrifugó (15 min a 10,000 xg a 4 °C) y se colectó el sobrenadante para filtrarlo con una membrana Millipore de 22 µm. Posteriormente, se diluyó con el amortiguador de columna (PBS pH, 7.4 y 1% Tritón) 1:2 v/v. Este extracto se hizo pasar 2 veces por una columna de sefarosa 4B-glutación (GE Healthcare) y se eluyó la fracción de GST con una solución de 5mM de glutación en 50 mM de Tris HCl, pH 8.0. El eluido de la columna se dializó, se concentró, se le determinó el contenido de proteína, y se realizó un gel de poliacrilamida con SDS y la FGSTTs restante se conservó a -20° C.

### **Obtención de macrófagos peritoneales.**

Previamente los ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal con 2.5 ml de medio tioglicolato (Sigma-Aldrich) añejo estéril al 3%. Tres días después dichos ratones se sacrificaron por dislocación cervical (previa sedación). Inmediatamente se les inyectó intraperitonealmente 10 mL de solución salina estéril y se les dio un ligero masaje en el abdomen. La solución salina se extrajo por succión con una jeringa y se colectaron las células contenidas en el líquido peritoneal (PECs). Se extrajo el sobrenadante que contiene a las PECs en hielo para luego centrifugar a 1000 g durante 10 minutos (Labofuge 400, Heraeus), se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular con 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640. Las células se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron 1.5 millones de células por pozo en placas de cultivo de 24 pozos con fondo plano (Costar, Corning Inc.). Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas las 2 horas se lavaron las células con solución salina estéril, con la finalidad de remover las células no adherentes. Los macrófagos adheridos a la placa se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma) y posteriormente se les agregó a cada pozo: RPMI, RPMI-FGST (10 µg /mL) y RPMI-LPS (1µg/mL), se incubaron durante 24 horas a 37°C en 5 % CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se colectó el sobrenadante y las células se lisaron con TRIzol.

## **Extracción de RNA y RT-PCR**

Se agregaron 500  $\mu$ L de TRIzol (Invitrogen) por pozo y mediante la sonicación se rompieron las células, se agregaron 100  $\mu$ L de cloroformo, se agitó y se dejó actuar durante 5 minutos para posteriormente centrifugar a 12000 g (Eppendorf Centrifuge 5415C) por 10 min. En un tubo estéril, se agregó el sobrenadante del centrifugado anterior y se adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol frío, se agitó y se dejó reposar durante 15 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó de nuevo a 12000 g por 10 min (Eppendorf Centrifuge 5415C). El precipitado se lavó con etanol frío al 75%, se descartó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en etanol frío al 75%. Las muestras se centrifugaron a 7500 g (Eppendorf Centrifuge 5415C) por 5 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar para luego resuspenderla en agua tratada con DEPC al 0.1%. Se cuantificó el RNA, se verificó su integridad en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se preservó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

La técnica de la transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y 2 oligonucleótidos específicos para cada gene de interés, se utilizaron para amplificar una región de cada marcador de activación de macrófagos: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Renshaw et al., 2002), arginasa-1 (Arg-1), quitinasa lectina (Ym1) (Nair et al. 2003) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Yoshida et al. 2000). Para el RT-PCR como primera parte se sintetizó el ADN complementario a partir de 1  $\mu$ g de RNA total, para cada reacción se adicionaron los oligonucleótidos específicos (25 pM) para cada gene y se siguieron las instrucciones sugeridas en el estuche de SuperScript One-Step (Invitrogen). La mezcla se incubó a  $45^{\circ}\text{C}$  por 30 min e inmediatamente se empezó la PCR utilizando para todos los genes (excepto para iNOS la  $T_m$  usada fue  $62^{\circ}\text{C}$ ) el siguiente programa: 1 ciclo ( $94^{\circ}\text{C}$  por 2 min), 30 ciclos de ( $94^{\circ}\text{C}$  por 30 seg,  $56^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 seg de polimerización) y un ciclo de  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 min,  $15^{\circ}\text{C}$  por 15 min.. Los fragmentos amplificados se observaron en geles de agarosa y se analizaron en un fotodocumentador Sistem 120 de KODAK.

### **Determinación de IL por ELISA sándwich.**

Las interleucinas se determinaron en los sobrenadante de cultivos de macrófagos después de la estimulación, acoplado a las placas para ELISA (nunc MaxiSorp, Apogent) el anticuerpo anti-interleucina 10, 12 y anti-TNF $\alpha$  a una concentración de 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{pozo}$  e incubando a 4°C. Al día siguiente se lavó la placa, se bloqueó con BSA al 1% durante 1 hora a 37° C, para después añadir 100  $\mu\text{L}$  por pozo de los sobrenadantes obtenidos del cultivo celular. Se incubó durante 2 horas a 37° C y después a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó la placa y se agregó el segundo anticuerpo según fuera el caso de la interleucina que se determinó, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante de los estuches utilizados (ELISA Development Kit, Peprotech). Se incubó 2 horas a 37° C y luego se reveló por medio de la reacción del anticuerpo biotinilado con avidina, agregándose posteriormente ABTS/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La placa se determinó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas Multiscan Ascent (Termolab system).

### **Citometría de flujo**

Se extrajeron las PECs de la forma ya indicada, tanto de ratón estimulado con tioglicolato como de ratones infectados durante 8 semanas con *T. crassiceps*. Se cultivaron 1 millón de células por pozo en placas de cultivo de 24 (costar, Corning Inc.). Las células provenientes de ratón sano se estimularon con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la FGSTTs o 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS mientras que las PECs extraídas de ratón infectado se cultivaron sin ningún estímulo, durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se colectaron las células y se pusieron en tubos para citometría (Sarsted, Numberecht). Se agregó amortiguador de FACS (BD Biosciences) y se centrifugó esta suspensión a 1000 g (Hermle, LaborTechnik) durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células. Para bloquear las uniones no específicas se agregó anticuerpo anti-CD16/32 (BioLegend) a una concentración de 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo se incubaron las muestras con los diferentes anticuerpos monoclonales (1 $\mu\text{g}$  por cada 1x10<sup>6</sup> células) conjugados a fluorocromos

contra los marcadores buscados: F4/80-FITC o APC, PD-L1-APC, PD-L2-PE, MMR-FITC e IL4R $\alpha$ -PE, utilizándose el isotipo correspondiente en cada caso (BioLegend) Se incubó por 20 min a 4°C, se centrifugó a 10000 g (Hermle, LaborTechnik) durante 10 min y se resuspendió en una solución con paraformaldehído al 4%, guardándose las muestras en oscuridad a 4°C, hasta su lectura. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCalibur (BD Biosciences) y los resultados se procesaron con el software Cyflogic.

### **Inmunofluorescencia**

Para realizar estos ensayos se extrajeron PECs de ratones estimulados con medio tioglicolato, siguiendo el protocolo previamente descrito. Las células adherentes fueron despegadas y contadas para adherir  $1 \times 10^6$  células enriquecidas en macrófagos a cubreobjetos estériles tratados con poli-L-lisina (neuvitro) y se incubaron toda la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A estas células se les agregó FGSTTs (10  $\mu$ g/mL) mientras que otras permanecieron sin estímulo, todas éstas se incubaron durante 15, 30 o 60 min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en Tris-HCl 25 mM. Posteriormente se agregó el anticuerpo primario anti-FGSTTs (1:200) hecho en conejo y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Después se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con FITC (1:100) y se dejó actuar 1 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo las muestras se lavaron y se montaron en laminillas guardándose en oscuridad a 4°C, hasta que se observaron al microscopio Eclipse 80i (Nikon).

### **Análisis estadístico**

En el programa GraphPad Prism 5.0 se calcularon los promedios y errores estándar así como se realizó la prueba t no pareada para los datos obtenidos. Se consideró  $p < 0.05$  como significativamente diferente, con intervalo de confianza del 99%.

## RESULTADOS

Como primera parte del estudio se llevó a cabo la purificación de la fracción que contiene a las glutatión transferasas de 25.5 y 26.5 kDa de *Taenia solium* (FGSTTs) por medio de una cromatografía de afinidad con glutatión-Sefarosa4B. Se obtuvieron 324  $\mu$ g de dicha fracción a partir de 15.6 mg de proteína soluble total extraída de los cisticercos obtenidos de carne de cerdo, por lo que el porcentaje de FGSTTs que se obtuvo fue de 2.07%. La actividad enzimática de dicha fracción se evaluó utilizando como sustrato el CDNB, siendo la actividad específica determinada para dicha fracción purificada de 3.4 U/mg mientras que el extracto crudo mostró una actividad de 0.208 U/mg (Tabla 1) por lo que el enriquecimiento de esta fracción fue de 16.4 veces con respecto al extracto crudo total. La pureza de la FGSTTs se determinó en un gel de acrilamida con SDS al 12% (Fig.5), donde se observaron múltiples proteínas en el extracto crudo (Fig.5, 1) mientras que en la fracción purificada sólo se nota la presencia de dos bandas una de 25.5 y otra de 26.5 kDa, siendo más abundante la isoforma de 26.5 kDa (Fig.5, 3).

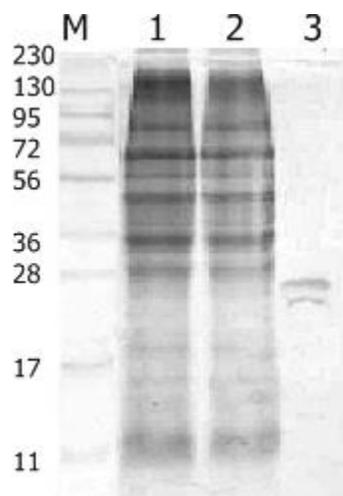


Figura 5. Gel de Poliacrilamida al 12% con SDS mostrando la purificación de las glutatión transferasas del cisticerco de *Taenia solium*, teñido con azul brillante de Coomassie. 1) Extracto crudo de larva (ECL) de *T. solium*, 2) Fracción del ECL no retenida en la columna de glutatión-sefarosa-4B y 3) Fracción de glutatión transferasa de *T. solium* (FGSTTs). M) marcadores de tamaño molecular 11 a 230 kDa de la casa Fermentas.

Tabla 1. Resumen de la purificación de la FGSTTs.

Fracción	Volumen (mL)	Proteína(mg)	Actividad específica(U/mg)	Actividad total(U)	Rendimiento aparente %
Extracto crudo	10	15.6	0.208	3.2448	100
FGSTTs	3	0.324	3.428	1.11	34.23

Una vez obtenida la FGSTTs, se realizaron los experimentos *in vitro* con los macrófagos peritoneales, agregándola a las células y manteniéndolas en cultivo durante 24 horas. Estos macrófagos fueron utilizados para realizar diversos análisis. Uno de ellos fue determinar la expresión de algunos genes característicos de los diferentes fenotipos expresados por los macrófagos por medio de la RT-PCR. Para dicho ensayo se extrajo el ARN total de macrófagos no estimulados y estimulados con la FGSTTs. En la figura 6 se observa que sólo el gen de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) se está expresando en los macrófagos incubados con la FGSTTs (B). Como control se utilizaron: (A) macrófagos no estimulados, donde solo está expresado el gen constitutivo gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH); macrófagos extraídos de ratón con 8 semanas de infección (C) en el que se puede observar la expresión de los genes marcadores de la activación alternativa, como son la quitinasa lectina (Ym-1) y la arginasa-1 (Arg1), sin la expresión de gene para la iNOS, y macrófagos estimulados con LPS (D) donde los marcadores antes mencionados se encuentran poco expresados en contraste con la iNOS que se encuentra expresada. GAPDH se utilizó como control de amplificación en todos los casos dado que esta enzima de expresión constitutiva, está involucrada en la generación del primer intermediario de alta energía en la vía de la glucólisis.

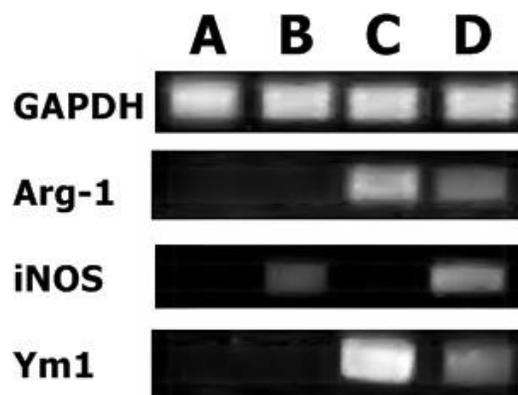


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa teñida con Bromuro de Etidio de los fragmentos amplificados por RT-PCR de los genes de macrófagos peritoneales incubados *in vitro* durante 24 horas con: A) sólo el medio cultivo (Control); B) con 10 µg de la FGSTTs y D) con 1 µg de LPS de *Eschericia coli* (Control positivo). En C) macrófagos de ratones infectados con *T. crassiceps* por 8 semanas. Los genes blanco fueron GAPDH (201 pb), Arg-1 (250 pb), iNOS (449 pb), Ym1 (436 pb).

Por otro lado, se determinó en los sobrenadantes de los cultivos de estos macrófagos las interleucinas que secretaron por medio del ELISA (Fig. 7). En el caso de las interleucinas de tipo pro inflamatorio, los macrófagos estimulados con FGSTTs mostraron un aumento significativo en la secreción de IL-12 con respecto al control de macrófagos sin estimular y de los macrófagos estimulados con 1 µg de LPS, en contraste los sobrenadantes provenientes de ratón con 8 semanas de infección presentaron cantidades menores de esta interleucina. Para el caso del TNF $\alpha$ , éste aumentó significativamente con respecto al control y a los macrófagos de ratón infectado, pero no se observó diferencia con lo secretado por las células estimuladas con el LPS. IL-10 es una citocina que también fue secretada por los macrófagos estimulados con la FGSTTs mostrando diferencia significativa tanto con el grupo control como con los grupos estimulado con LPS y los macrófagos provenientes de infección.

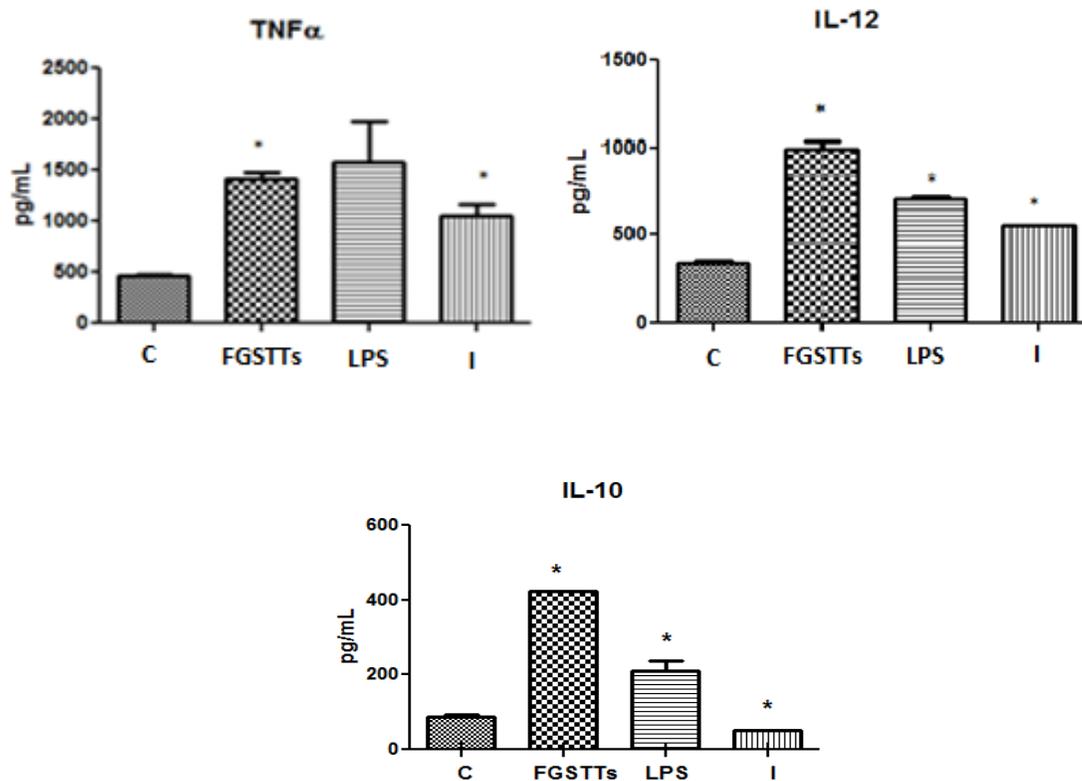


Figura 7. Ensayos de ELISA del perfil de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10) secretadas por macrófagos cultivados durante 24 horas con fracción de *Taenia solium* (FGSTTs) (\* =  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). Macrófagos cultivados: C) medio de cultivo; FGSTTs) fracción GST de *T. solium*; LPS) Lipopolisacárido 1  $\mu\text{g/mL}$ , I) macrófagos extraídos de ratones en 8<sup>a</sup> semana de infección por *T. crassiceps*.

Existen marcadores de membrana característicos de los macrófagos alternativamente activados como son el receptor de manosa (MMR) y la cadena alfa del receptor de IL-4 (Gordon y Martínez, 2010) así como PDL-1 que ha sido propuesto como marcador de activación clásica, mientras que PDL-2 se considera marcador de activación alternativa (Locke y Allison, 2003; Huber et al., 2010). Estos marcadores fueron buscados en los macrófagos incubados con la FGSTTs observándose que PD-L1 estuvo más expresado en estos macrófagos con respecto al control y a los macrófagos incubados con LPS (Fig.8). Para PD-L2 también se observó un aumento en la expresión aunque la cantidad de células que lo expresa es menor respecto a lo observado con PD-L1, en el que mayor cantidad de células expresan más ligando de PD-1. El receptor de IL-4R $\alpha$  muestra una

tendencia parecida al de PD-L2, mientras que el receptor de manosa no presenta diferencias.

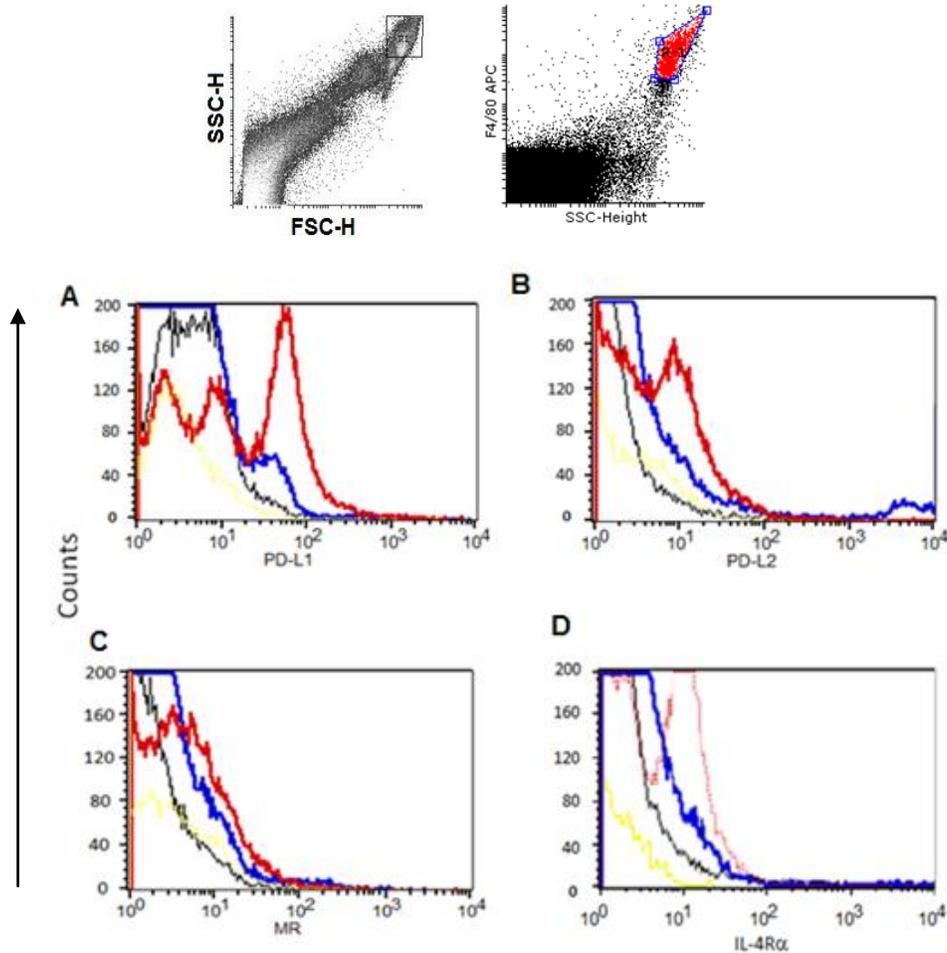


Figura 8. Histogramas de la determinación de marcadores de superficie en macrófagos peritoneales incubados con la FGSTTs (10 ug/mL) durante 24 h: A) PD-L1 (ligando 1 de PD-1), B) PD-L2 (ligando 2 de PD-1), C) Receptor de manosa (MMR) y D) receptor para la IL-4 (IL-4R $\alpha$ ). El isotipo se muestra en amarillo, los macrófagos incubados con LPS en azul, los macrófagos incubados con la FGSTTs en rojo y los macrófagos incubados sin ningún estímulo en negro. En las figura del centro (diagrama de puntos) se muestra la zona que fue analizada (FSC-H vs SSC-H y SSC-H vs F4/80).

Los experimentos de inmunofluorescencia indirecta que se realizaron con macrófagos incubados sin FGSTTs y con 10  $\mu$ g de dicha fracción durante 15, 30 y 60 min mostraron que las glutatión transferasas de *T. solium* a los 15 min (C, C')

se encuentran principalmente difusa en amplias zonas en el citoplasma de la célula, a los 30 minutos (D) se continúa observando en el citoplasma, pero en algunas células la fluorescencia está concentrada en puntos en el interior de los macrófagos (D'), mientras que a los 60 minutos (E, E') se observa que la fluorescencia se encuentra principalmente en la membrana de estas células.

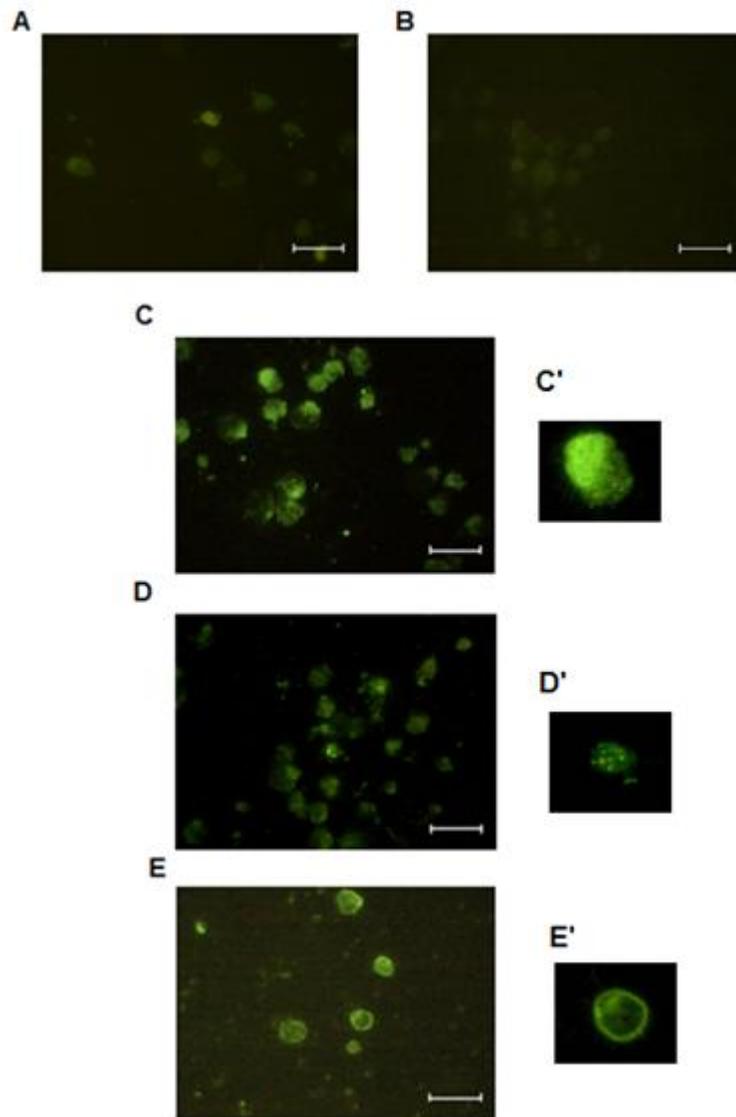


Figura 9. Microscopía de fluorescencia de macrófagos peritoneales tratados con la FGSTTs a los tiempos de C) 15 min; D) 30 min y E) 60 min e incubados con IgG anti-FGSTTs y anti-IgG-FITC. Como controles del ensayo se utilizaron macrófagos peritoneales: **A**: tratados con FGST e incubados con IgG normal y **B**: sin FGSTTs e incubados con IgG anti-FGSTTs, ambos revelados con anti-IgG-FITC. Las imágenes **C'**, **D'**, **E'** son acercamientos representativos de los macrófagos de los ensayos a 15, 30 y 60 min. La barra equivale a 60  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

Los macrófagos, células incluidas dentro de las APCs, son las principales células del sistema inmune que están en contacto directo con los patógenos y que representan un papel central en la activación y diferenciación de otras células como los linfocitos T, propiciando así ambientes que generan diferentes tipos de respuesta inmune.

Se sabe que los helmintos son capaces de modular la respuesta inmune del hospedero, sin embargo, en el caso de *T. solium*, no se sabe con exactitud qué moléculas pueden participar en fenómenos como la diferenciación hacia una respuesta del tipo Th1 o Th2. En este trabajo se ha identificado que la FGST de *T. solium* tiene un efecto modulador hacia la respuesta inmune considerada pro inflamatoria sobre los macrófagos peritoneales del hospedero. La fracción de GST de este parásito fue obtenida por medio de una cromatografía de afinidad con glutatión unido a sefarosa. Los análisis del rendimiento realizado, nos muestran que esta fracción se encuentra en un porcentaje del 2.07 % del total de proteína soluble. Este resultado está de acuerdo a lo encontrado por otros autores, en donde las GSTs constituyen entre el 2 y 4 % del contenido de proteínas citosólicas de varios organismos (Brophy y Pritchard, 1994), incluida el estadio de cisticerco de *Taenia solium* (Vibanco-Pérez et al., 1999). La purificación por cromatografía de afinidad en columna permitió obtener un buen rendimiento de esta fracción, además de que, a partir del extracto crudo que contiene gran cantidad de otras proteínas se obtuvo la fracción nativa pura y activa en un solo paso de purificación.

Las GST citosólicas de *T. solium* han sido caracterizadas en base a sus propiedades bioquímicas e inmunológicas. En cuanto a la GST 25.5 se sabe que es una enzima de clase mu (M) capaz de inactivar hidroperóxidos lipídicos y se ha demostrado que en ensayos de vacunación por sí sola no ofrece ninguna protección en el modelo murino de cisticercosis (Vibanco-Pérez et al., 2001). Respecto a GST26.5 es una enzima con características compartidas entre las GST de clases mu y alfa, pero que a diferencia de la GST25.25 sí es un antígeno

protector contra la cisticercosis (Torres A. et al. 2008; Vibanco-Pérez et al., 2001). A pesar de ser isoformas de la misma enzima, se sabe que no están relacionadas antigénicamente entre ellas ni con otras GST como las de cerdo, rata y humano. Por todo lo anterior se consideró estudiar el efecto que estas enzimas tienen sobre las células del sistema inmune que están en contacto con el parásito.

Los macrófagos al igual que otras células como los eosinófilos y células dendríticas se encuentran en los sitios donde se establece el parásito. Dicho parásito secreta continuamente moléculas en el peritoneo que entran en contacto con los cisticercos. Puesto que las GST's se encuentran en gran cantidad en el tegumento del parásito se decidió analizar el efecto que podrían presentar éstas sobre los macrófagos extraídos de peritoneo de ratones sanos.

Los experimentos realizados con el ARN de macrófagos incubados con la FGSTTs muestran que el gen de la enzima iNOS es el único de los genes buscados que está expresándose. Este resultado fue inesperado dado que en otros helmintos se ha demostrado que en ensayos de estimulación *in vitro* e *in vivo* con enzimas con propiedades como las GST's, los macrófagos expresan los genes Ym-1 o Arg-1 pero no iNOS. En el caso de la GST de *F. hepática* esta proteína es capaz de disminuir la producción de NO de manera dosis-dependiente en macrófagos peritoneales cultivados *in vitro*. Sin embargo, en el modelo murino por *T. crassiceps* la expresión del gen de la enzima iNOS está aumentada en los macrófagos de tipo clásicamente activados reclutados en las primeras semanas post-infección. Este resultado sugiere que los macrófagos están respondiendo ante la FGSTTs como a un estímulo pro inflamatorio, puesto que la enzima iNOS es rápidamente sintetizada por macrófagos, células dendríticas y NK en respuesta a un ambiente pro-inflamatorio y cuando éstas son activadas con LPS, INF $\gamma$  o TNF (Donnelly et al., 2008; Cervi et al., 1999, Rodríguez-Sosa et al., 2002, Bogdan, 2001).

El perfil de interleucinas obtenido de estos macrófagos expuestos a la FGSTTs mostró una mayor expresión de citocinas pro inflamatorias con diferencia significativa de TNF $\alpha$  e IL-12 con respecto al control e incluso con los macrófagos

estimulados con LPS aunque también secretaron IL-10 significativamente, sin embargo la cantidad en pg/mL de esta interleucina es menor respecto a la IL-12, y ya que la proporción entre IL-10 e IL-12 se ha utilizado para clasificar a los macrófagos (Mantovani et al., 2004), los macrófagos de estos ensayos podrían clasificarse como predominantemente M1 dado su perfil de interleucinas. Con respecto a los macrófagos provenientes de la 8<sup>a</sup> semana de infección, éstos tuvieron menos cantidad de dichas interleucinas consideradas pro inflamatorias tal como se ha encontrado previamente (Rodríguez-Sosa et al., 2002) y también escasa secreción de IL-10 contrario a lo esperado según el fenotipo M2 que se ha comprobado que muestran los macrófagos peritoneales extraídos de ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps*.

La alta secreción de TNF $\alpha$  e IL-12 refuerzan el resultado obtenido mediante la RT-PCR, mostrando que la FGSTTs es capaz de modificar a los macrófagos hacia un fenotipo tipo M1 (clásicamente activado).

Por otro lado, los marcadores de membrana encontrados en los macrófagos incubados con la FGSTTs en este estudio también evidenciaron un efecto pro inflamatorio, observándose que PD-L1 en expresión predomina sobre PD-L2 e IL-4R $\alpha$ , aunque también se muestra un aumento con respecto al control, la expresión no es tan evidente. Se ha observado que los macrófagos reclutados en estadios avanzados de la infección por *T. crassiceps* presentan un incremento en la expresión tanto de PDL-1 como de PDL-2, con aumento en la población positiva a PD-L1 en la cuarta semana de infección y PD-L2 que aumenta progresivamente conforme avanza la infección, sin embargo en este caso, el aumento de estos ligandos va acompañado de la expresión de marcadores de activación alternativa (Reyes et al., 2009). Por otro lado, también se sabe que PD-L1 está aumentada en células estimuladas con INF- $\gamma$  e inclusive en este experimento la expresión es mayor que cuando los macrófagos fueron incubados con LPS. Esto sugiere que los macrófagos están modificando su fenotipo predominantemente hacia el clásicamente activado no solo a nivel de secreción de interleucinas o expresión de enzimas, sino también de receptores de membrana.

Al ser los macrófagos células presentadoras de antígeno resulta muy posible que la FGSTTs haya sido internalizada para posteriormente ser procesada por estas células para luego ser presentada en el MHCII a los linfocitos. La internalización de esta proteína podría ser el principio del mecanismo por el cual la FGSTS está actuando sobre los macrófagos. En experimentos con GST mu de ratón se ha demostrado que dicha proteína es capaz de unirse a ASK1 reprimiendo a esta proteína cinasa y suprimiendo la señal de apoptosis (Ssang-Goo et. al. 2001). Sin embargo, también existe la posibilidad de que la proteína se una a algún receptor específico en la membrana del macrófago y produzca el efecto observado. El ensayo de la inmunofluorescencia muestra que la FGST puede ser encontrada tanto en el citoplasma de los macrófagos como en la membrana dependiendo del tiempo de incubación. Según lo observado es posible que dicha proteína este siendo procesada dado que a los 30 min de incubación en algunas células la fluorescencia puede verse concentrada en puntos en el citoplasma mientras que a los 60 min la fluorescencia está en la membrana de los macrófagos. Existen reportes de proteínas como la cistatina de *Acanthocheilonema vitae* que es internalizada por los macrófagos en 20 minutos y que una vez dentro del macrófago es capaz de regular la producción de IL-10 e IL-12 a través de ERK1/2 y p38 (Klotz et al. 2011). Sin embargo es necesario realizar más experimentos para poder esclarecer con precisión, si la FGST se encuentra dentro del macrófago en alguna estructura como un fago lisosoma y si está en la membrana junto con el MHCII.

Las características que muestran estos macrófagos al ser estimulados con la FGSTTs podrían estar relacionados con la disminución de la carga parasitaria en experimentos de vacunación realizados en el modelo murino de cisticercosis, dado que la respuesta inmune protectora contra este parásito está basada en el mantenimiento de la respuesta pro inflamatoria que en este caso podría ser generada por la secreción de iNOS e IL-12.

## **CONCLUSION**

La fracción GST de *Taenia solium* (FGSTTs) modifica *in vitro* el fenotipo de los macrófagos peritoneales de ratón hacia el tipo clásicamente activado, lo que podría llevar a una respuesta tipo Th1 que resultara protectora para el hospedero.

## REFERENCIAS

- Adams, D. Hamilton, T. 1992. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. En *The macrophage*. C. E. Lewis y J. O. McGee, eds. Oxford University Press, Oxford, pp. 75–114.
- Armstrong R.N. 1997 Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10:2-18.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2:907–916
- Brophy P.M., Pritchard D.I.1992. Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance? *Parasitology Today*. 8: 419-422.
- Cervi L., Rossi G., Masih DT. 1999. Potential role for excretory-secretory forms of glutathione-S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 119:627-633.
- Chakkalath H. y Titus R. 1994. Leishmania major-parasitized macrophages augmented Th2-type T cell activation. *The Journal of immunology*.153:4378-4387.
- Chang N, Hung S, Hwa K, Kato I, Chen J, Liu C, Chang AC. 2001. A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. *J Biol Chem*, 276:17497-17506.
- Cao H,Wolff RG, Meltzer MS, Crawford RM. 1989. Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN- $\gamma$  and IL-4. *J. Immunol.* 143:3524–31.
- Cherning J.1997.Common host antigens in laboratory rats infected with the metacestodes of *Taenia crassiceps*. *J. Helminthol.* 51: 215-220.
- Cho S.G, Lee Y.H, Park H-S, Ryoo H, Kang K.W. Park J, Eom S.J, Kim M.Y, Chang T.S., Choi S.Y, Shim J, Kim Y, Dong M,S, Leei M.J, Kim S.G., Ichijo H, y Choi E.J.2001.Glutathione s-transferase Mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1.J. Biol. Chem. 276:12749–12755.
- Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I. S. Figari, A. Bradley, and T. A. Stewart. 1993. Multiple defects of immune-cell function in mice with disrupted interferon- $\gamma$  genes. *Science*. 259:1739–1742.
- Dell A, Haslam SM, Morris HR, Khoo K-H. 1999. Immunogenic glycoconjugates implicated in parasitic nematode diseases. *Biochim Biophys Acta*.1455:353-362.
- Dissanayake., Amith R., Shahin .2004. *Taenia crassiceps* carbohydrates stimulate IL-6 expression in naïve murine macrophages via Toll-like receptors (TLRs). *Molecular Immunology*. 41:391–398.

Dixon HBF, Limpscomb FM. 1961. Cysticercosis: an analysis and follow up 450 cases. Privy Council Med Res Spec Rep Ser Lond. 229: 1-58

Donnelly S., Stack C., O'Neill S. Sayed A., Williams L. Dalton J.P.2008. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. The FASEB Journal. 1-11.

Edwards J.P., Zhang X., Frauwirth K.A. y Mosser D.M. 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. Journal of Leukocyte Biology. 80: 1298-1307.

Falcone FH, Loke P, Zang X, MacDonald AS, Maizels RM, Allen JE.2001. A *Brugia malayi* homolog of macrophage migration inhibitory factor reveals an important link between macrophages and eosinophil recruitment during nematode infection. J. Immunol. 167:5348–5354.

Flisser A, Vargas-Parada L y Laclette J.2006.*Taenia solium*: un parásito cosmopolita. Investigación y ciencia, Mayo, 24-33.

Frova, C. 2006.Glutathione transferases in the genomic era: new insights and perspectives. Biomol. Eng. 23: 149-169.

García H., Martínez M., Gilman R., Herrera G., Tsang V., Pilcher J., Daz F., Verástegui M., Gallo C., Porrás M., Alvarado M. y Miranda E. 1991. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. The lancet, 338: 549-551.

Goerdts S., Politz O., Schledzewski K., Birk R., Gratchev A., Guillot P., Hakiy N., Klemke C., Dippel E., Kodelja V., Orfanos C. 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67: 222–226.

Gómez-García L., Rivera-Montoya I., Rodríguez-Sosa M., Terrazas I. 2006. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display a Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. Parasitol. Res. 90: 440-448.

Gomez-Escobar N., Lewis E., Maizels R.1998.A novel member of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *B. pahangi*. Exp Parasitol. 88,200–209.

Gordon, S. 1998. The role of the macrophage in immune regulation. *Res. Immunol.* 149:685–688.

Gordon S. and Martinez F. 2010.Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. Immunity. 32, 593-604.

Grzych J.M., De Bont J., Liu J., Nyrinck J.L., Fontaine J., Vercruyse J., Capron. 1998. Relationship of impairment of Schistosoma 28-Kilodalton glutathione S-transferase (GST) activity to expression of immunity to *Schistosoma mattheei* in calves vaccinated with recombinant *Schistosoma bovis* 28-Kilodalton GST. Infection and immunity. 66:1142-1148.

Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. 2005. Glutathione transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45:51-88.

Huang W.C., Chio C.C., Chi K.H., Wu H.M., Lin W.W. 2002. Superoxide anion-dependent Raf/MEK/ERK activation by peroxisome proliferator activated receptor gamma agonist 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2, ciglitazone y GW1929. Exp. Cell Res. 277:192-200.

Hubert S., Hoffmann R., Muskens F., Voehringer D. 2010. Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. Journal of the american society of hematology. 17:3311-3320.

Kang S.W., Chang T.S., Lee T.H., Kim E.S., Yu D.Y., Rhee S.G. 2004. Cytosolic peroxiredoxin attenuates the activation of Jnk and p38 but potentiates that of Erk in Hela cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha. J. Biol.Chem. 279: 2535-2543.

Klotz C., Ziegler T., Figueiredo A., Rausch S., Hepworth M., Obsivac N., Sers C., lang R., Hammerstein P., Lucius R., Hartmann S. 2011. A helmint immunomodulator exploits host signaling events to regulate cytokine production in macrophages. PLoS Pathogens.7(1): e1001248. doi:10.1371/journal.ppat.1001248

Lamsam S., McManus D. P. 1990. Molecular characterization of the surface and cyst fluid components of *Taenia crassiceps*. Parasitology 101: 115-125.

Lang R., Patel D., Morris J., Rutschman R., Murray P. 2002. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. J. Immunol. 169, 2253-2263.

Landa A, Jimnez L, Kaethe W, Jimnez-Garca L, Lara-Martnez R, Robert L, Cirioni O, Baranska-Rybak W, Wojciech K. 2009. Antimicrobial peptides (Temporin A and Isegaran IB-367): Effect on the cysticerci of *Taenia crassiceps*. Molecular and Biochemical Parasitology, 164,126-130.

Landa A., Merchant M., Willms K., Laclette J.P. 1993. Purification and ultrastructural localization of surface glycoproteins of *Taenia solium* (cestoda) cysticerci. International Journalfor Parasitology, 24: 2, 265-269.

Landa A., Willms K., Laclette J.P. 2010. Release of Glycoprotein (GP1) from the tegumental surface of *Taenia solium* by phospholipase C from *Clostridium*

*perfringens* suggests a novel protein-anchor to membranes. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010: 910375.

Larralde C, De Aluja A. 2008. Cisticercosis: guía para profesionales de la salud. Ed. Biblioteca de la Salud. Fondo de cultura Económica; 19-41.

Liew F.Y., Cox F.E.G.1991. Nonspecific defense the role of nitric oxide. Parasitology today.7:3,17-21.

Ling H, Recklies A. 2004. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular response to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. Biochem J, 380:651-659.

Locke P., Allison J. P. 2003. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. PNAS. 100: 5336-5341.

Loke P., Nair M, Parkinson J., Guiliano D., Blaxter M., Allen J. 2002. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. BMC Immunol. 3: 7

Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar N., Nair M., Taylor M.D., Allen J.E. 2004. Helminth parasites-masters of regulation. Immunological Reviews. 201:89-116.

Manoury B, Gregory WF, Maizels RM, Watts C. 2001. *Bm*-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. Curr Biol.11:447-451.

Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locatti M. 2004 . The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. TRENDS in Immunology, 25: 677-686.

Martinez F.O., Helming L. and Gordon S.2009. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective Annu. Rev. Immunol. 27:451-83.

McCracken R.O. and R. D. Lumsden, 1975. Structure and function of parasite surface membranes: Concanavalin A adsorption by the cestode *Hymenolepis diminuta* and its effect on transport. Comparative Biochemistry and Physiology B, 52:331-337.

McTigue M.A., Williams D.R., Tainer J.A. 1995. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. J. of Molecular Biology, 246:21-27.

Meza-Lucas A., Aguilar F. 2002. Taeniosis humana por *Taenia solium*. Revista Mexicana de Parasitología Clínica. 49: 2, 92-99.

Mills, C. D., Kincaid M., Alt J., Heilman M., Hill A. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J. Immunol. 164: 6166–6173.

Mosmann TR, Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol., 7:145–73

Nair MG, Cochrane D, Allen J. 2003 .Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. Immunol Lett., 85:173-180.

O'Shea, J.J., and Paul, W.E. 2010. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science, 327, 1098–1102.

Raes G., L. Brys, B.K. Dahal, J. Brandt, J. Grooten, F. Brombacher, G. Vanham, W. Noel, P. Bogaert, T. Boonefaes, A. Kindt, R. Van den Bergh, P.J. Leenen, P. De Baetselier, G.H. Ghassabeh. 2005. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. J. Leukoc. Biol., 77:321–327.

Renshaw M., Rockwell J., Engleman C., Gewirtz A., Katz J., Sambahara S. 2002. Cutting edge: Impaired Toll-like receptor expression and function in aging. The Journal of Immunology. 169: 4697-4701.

Reyes L., Terrazas C., Vera-Arias L., Terrazas L. 2009. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. Infection, Genetics and Evolution. 9: 1115-1127.

Rodríguez-Sosa M , Satoskar A.R., Calderón R., Gomez-Garcia L., Saavedra R.,Rafael Bojalil, and Luis I. Terrazas. 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. Infection and immunity, 70, 7: 3656–3664.

Sandeman R. M. and Williams J. F.1984. Lectin binding to cystic stages of *Taenia taeniaeformis*. Journal of Parasitology, 70, 5: 661–667.

Ssang-Goo C., Yong L., Hee-Sae P., Kanghyun R., Keon W., Jihyun P., Soo-Jung E., Myung K., Tong-Shin C., Soo-Yeon C., Jaekyung S., Youngho K., Mi-Sook Dong., Min-Jae L., Sang K., Hidenori I., Eui-Ju C. 2001. Glutathione S-Transferase

mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal regulating kinase 1. *The Journal of Biological chemistry*. 276:12749-12755.

Sciutto E., Fragoso G., Daz M. L., Valds F., Lomet C., Govezensky T., Montoya R.M. and Larralde C. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cisticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Research*, 77: 243-244.

Sjostrom M, Jakobsson P, Heimburger, M, Palmblad J, Haeggstrom J. 2001. Human umbilical vein endothelial cells generate leukotriene C4 via microsomal glutathione S-transferase type 2 and express the CysLT1 receptor. *Eur J Biochem.*, 268: 2578-2586.

Standiford TJ, Strieter RM, Chensue SW, Westwick J, Kasahara K, Kunkel SL. 1990. IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. *J. Immunol.*, 145:1435–1439

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176:287–292

Stout, R. D., J. Suttles. 1997. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. *Front. Biosci.* 2: 197–206.

Terrazas I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. 1998. Shift from an early protective TH1- type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84:1, 74-81.

Terrazas L.I. , D. Montero, C.A. Terrazas, J.L. Reyes, M. Rodriguez- Sosa, *Int. J. Parasitol.* 2005. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cisticercosis. 35: 1349–1358.

Terrazas I., Cruz M., Rodríguez-Sosa M., Bojalil R., García-Tamayo F., Larralde C. 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res* ; 85, 135-141.

Torres-Rivera A., Landa A. 2008. Cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme. *Archives of Biochem. and biophys.* 447:372-378.

Tracy J.W., Van de E.A. 1995. Xenobiotic Metabolism: Biochemistry and molecular biology of parasites. Marr J., Muller M. Academic Press, San Diego; 161-175.

Vaca-Paniagua F., Torres-Rivera A., Parra-Unda R., Landa A. 2008. *Taenia solium*: Antioxidant metabolism enzymes as targets for cestocidal drugs and vaccines. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 8:393-399.

Vibanco-Pérez N., Jiménez L., Merchant M., Landa A. 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. J. Parasitol.85:448-453.

Vibanco-Pérez N., Jiménez L., Mendoza-Hernández G., Landa A.2002.Characterization of a recombinant mu-class glutathione S- transferase from *Taenia solium*. Parasitol. Res. 88: 398-404.

Williams L., Jarai G., Smith A., Finan P. 2002. IL-10 expression profiling in human monocytes. J. Leukoc. Biol. 72: 800–809.

Willms K., Zurabian R. 2009. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. Parasitology. 137:335-346.

Willms K., Merchant M.T., Díaz S., Arcos L.1982. Host-parasite interface in the metacestode of *Taenia solium*. In: Flisser A, Willms K, Lacleste J.P., Larralde C., Ridaura C., Beltrán F. (eds) Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York, pp397-411.

Wilce M.C.J, Parker M.W. (1994). Structure and function of glutathione S transferases. Bioch. Biophys. Acta. 1205: 1-18.

Wirth JJ, Kierszenbaum F, Zlotnik A. 1989. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Immunology* 66:296–301

Xu X., Lemaire C., Gryzch J.M.,Pierce R.J., Raccurt M., Mullier F., Zerimech F.,Decavel J.P., Peyrol S., Liu J., Fontaine J., Laffite S., Capron A., Cesbron J.Y. 1997. Expression of a Schistosomamansoni 28-kilodalton glutathione S-transferase in the livers of transgenic mice and its effect on parasite infection and immunity. 65:3867-3874.

Yoshida A., Maruyama H., Kumagal T., Amano T., Kobayashi F., Zhang M., Himeno K., Ohta N. 2000. Schistosoma mansoni infection cancels the susceptibility to Plasmodium chabaudi through induction of type 1 immune responses in A/J mice. International Immunology.12:1117-1125.

Zang X, Maizels RM. 2001. Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. Trends Biochem Sci. 26:191–197.