



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTO DEL TRATAMIENTO PERINATAL CON BISFENOL A (BPA) SOBRE LA  
RESPUESTA INMUNE Y LA SUSCEPTIBILIDAD A LA TOXOCARIOSIS POR  
*Toxocara canis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

VÍCTOR HUGO DEL RÍO ARAIZA

TUTOR PRINCIPAL

DR. JORGE MORALES MONTOR

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTORAL

DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO SEPTIEMBRE DE 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## DEDICATORIA

A mis padres, hermanas y familiares que a lo largo de este proceso me han brindado su cariño y apoyo incondicional.

Al Dr. Jorge Morales Montor, por todos los consejos y el apoyo que me ha brindado, no solo como tutor, sino también como amigo durante estos casi 7 años que llevo en su laboratorio.

A mi novia Nashla Yazmín Pérez Sánchez, que me ha brindado su amor y apoyo incondicional desde que realicé mi proyecto de maestría y hasta la fecha. Te amo.

A mis compañeros de laboratorio (los que aún están y los que ya terminaron su proceso) por su entrañable amistad.

A todos y cada uno de mis amigos y colegas, con los cuales he pasado extraordinarios momentos a su lado.

Finalmente, a todos aquellos que fueron y que son parte importante en mi vida, los llevo en mi corazón, a todos mil gracias.



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor principal, Dr. Jorge Morales Montor, por incorporarme a su laboratorio desde mi Maestría, guiarme en la realización de este proyecto, por enseñarme a hacer ciencia, a pensar y actuar como científico, y a definir mi camino en la vida académica. También le agradezco por proporcionar material y equipo necesario para su elaboración y el apoyo con la revisión del mismo.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la guía y formación para realizar este proyecto doctoral.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo con una beca con un número de registro 447277, que me fue otorgada para llevar acabo mis estudios de Doctorado.

A mi comité Tutor, Dr. Pedro Ulises Ostoia Saloma y al Dr. Abraham Landa Piedra, por su apoyo con sus comentarios, sugerencias y enseñanzas a lo largo de la trayectoria del proyecto.

Al Dr. Iván Girón Pérez por el apoyo para realizar las mediciones de BPA.

Al Dr. Armando Pérez Torres y a la Química e Histotecnóloga Verónica Rodríguez Mata por brindarme su ayuda y asesoría para realizar y analizar las técnicas histológicas que se realizaron durante este proyecto.

Al Proyecto IN209719 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM, otorgado al Dr. Jorge Morales Montor.

Al Proyecto 2125 de Fronteras en la Ciencia, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), otorgado al Dr. J. Morales-Montor



## RESUMEN

**DEL RÍO ARAIZA VÍCTOR HUGO.** “Efecto del tratamiento perinatal con Bisfenol A (BPA) sobre la respuesta inmune y la susceptibilidad a la Toxocariasis por *Toxocara canis*”

El Bisfenol A (BPA) es un compuesto disruptor endócrino que tiene afinidad por los receptores de estrógenos. En distintos estudios se ha observado que una disrupción endócrina durante periodos críticos del desarrollo puede desencadenar alteraciones durante la vida adulta, ya que compuestos como el BPA pueden atravesar la barrera placentaria y salir por medio de la leche materna. Como se ha observado, las células del sistema inmunitario poseen receptores para distintas hormonas y dichos compuestos pueden estar ejerciendo sus efectos sobre las mismas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la disrupción endócrina con BPA durante la etapa perinatal sobre la respuesta inmunológica durante la vida adulta, usando como reto antigénico la infección aguda por el parásito *Toxocara canis* (*T. canis*). Ratas Wistar gestantes fueron expuestas al BPA a una dosis de 250µg/kg/día durante el periodo perinatal (día 5 de gestación hasta el día 21 posnatal). Posteriormente, a los 60 días de edad, las crías macho expuestas indirectamente al BPA durante el periodo perinatal se infectaron con huevos larvados del parásito *T. canis*, y se sacrificaron a los 7 días post-infección. Se analizaron las cargas parasitarias en pulmón e hígado por medio de digestión artificial, y se observó que los animales expuestos al BPA perinatalmente, tienen un incremento en el número de larvas en estos órganos ( $P < 0.001$ ). Para evaluar la respuesta inmunitaria contra el parásito, se analizaron las subpoblaciones celulares presentes en bazo, ganglios linfáticos periféricos y mesentéricos por citometría de flujo. Se observó que no existen diferencias biológicamente relevantes en cuanto al porcentaje de estas células. Sin embargo, se determinó por PCR tiempo real la expresión de citocinas Th1/Th2 a nivel esplénico, encontrándose que la disrupción perinatal con BPA, genera una disminución en la expresión de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en los animales infectados ( $P < 0.001$ ) y un aumento en la expresión de

IFN- $\gamma$  ( $P < 0.001$ ), considerada una citocina Th1 por excelencia. Finalmente, se analizaron los títulos de anticuerpos específicos contra el parásito por ELISA, y se observó que existe una disminución en la producción de anticuerpos anti-*T. canis* en los animales expuestos al BPA perinatalmente ( $P < 0.001$ ). En conclusión, la administración perinatal de BPA, afecta el desarrollo de la respuesta inmunológica durante la vida adulta, modificando la producción de citocinas y anticuerpos por parte de las células de la respuesta inmunitaria, lo cual ocasiona un aumento en la susceptibilidad a la infección por *T. canis*.

**Palabras clave:** Bisfenol A, Perinatal, *Toxocara canis*, respuesta inmunitaria.

## ABSTRACT

**DEL RÍO ARAIZA VÍCTOR HUGO.** “Effect of perinatal treatment with Bisphenol A (BPA) on the immune response and susceptibility to Toxocariasis by *Toxocara canis*”

The Bisphenol A (BPA) is an endocrine disrupting compound, that has affinity for estrogen receptors. In different studies, it has been observed that an endocrine disruption during critical periods of development, can trigger alterations during adult life, since compounds such as BPA can pass through the placental barrier and also has been detected in the breast milk. As has been previously observed, the cells of the immune system have receptors for different steroidal hormones, thus, EDCs may act as immunomodulators. In the present work, the effect of endocrine disruption with BPA administered during the perinatal stage, on the immune response during adult life against *Toxocara canis* (*T. canis*) was evaluated. Pregnant female rats were exposed to BPA at a dose of 250µg/kg day during the perinatal period (day 5 of pregnancy until day 21 postnatal). Then, at 60 days of age, male offspring exposed indirectly to BPA during the perinatal period were infected with larvated eggs of the parasite *T. canis*, and they were sacrificed at 7 days post infection. Those animals born from exposed mothers, were taken and at the 60 days of age, the animals were infected with larvated eggs of the parasite *T. canis*, and they were sacrificed at 7 days post infection (acute infection). The parasite loads in lung and liver were analyzed by means of artificial digestion. It was observed that, the male rats born (exposed to BPA perinatally), have an increase in the number of larvae in these organs ( $P < 0.001$ ). To evaluate the immune response against the parasite, cell subpopulations present in spleen, peripheral lymph nodes and mesenteric lymph nodes were analyzed by flow cytometry. There were not relevant biological differences in the percentage of these cells. In addition, the expression of Th1/Th2 cytokines at the splenic level was determined by real time PCR, and, it was observed, that perinatal disruption with BPA generates a decrease in the expression of Th2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) in the infected animals ( $P < 0.001$ ) and an increase in the expression of IFN- $\gamma$  ( $P < 0.001$ ), considered a Th1 cytokine per



excellence. Finally, the titers of specific antibodies against the parasite were analyzed by ELISA, and it was observed that there is a decrease in the production of anti-*T. canis* antibodies in the animals perinatally exposed to BPA (P <0.001). In conclusion, perinatal administration of BPA affects the development of the immune response during adult life, modifying the production of cytokines and antibodies by the cells of the immune response, which leads to an increase in susceptibility to *T. canis* infection.

**Key words:** Bisphenol A, Perinatal, *Toxocara canis*, immunologic response.



## ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Comunicación endócrino-inmunológica.....	1
2. La red neuroinmunoendócrina durante enfermedades parasitarias.....	4
2.1 Ejemplos de transregulación.....	5
3. Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs).....	8
4. Bisfenol A (BPA).....	10
5. Efectos del BPA sobre el sistema inmunitario.....	11
5.1 Efectos del BPA sobre las células de la inmunidad innata.....	12
5.1.1 Macrófagos.....	12
5.1.2 Células Dendríticas.....	14
5.1.3 Granulocitos.....	15
5.2 Efecto del BPA sobre las células de la inmunidad adaptativa.....	15
5.2.1 Linfocitos T.....	15
5.2.2 Linfocitos B y células plasmáticas.....	18
6. Efectos del BPA durante procesos infecciosos.....	20
7. <i>Toxocara canis</i> ( <i>T. canis</i> ).....	25
7.1 Ciclo biológico.....	25
7.2 Respuesta inmunitaria a larvas de <i>T. canis</i> .....	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
RELEVANCIA E IMPACTO.....	29

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	30
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVOS.....	30
1. Objetivo general.....	31
2. Objetivos específicos.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
1. Animales de experimentación y alimentación.....	32
2. Sincronización y determinación de la gestación en las ratas.....	33
3. Administración del vehículo o BPA.....	33
4. Obtención y procesamiento de los huevos de <i>T. canis</i> .....	33
5. Infección de las ratas.....	34
6. Toma y procesamiento de las muestras.....	34
7. Digestión artificial y conteo de parásitos.....	34
8. Procesamiento de órganos para histología.....	35
8.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E).....	35
9. Medición de los niveles de BPA, Progesterona y Prolactina en suero.....	35
10. Ensayos de citometría de flujo.....	36
11. PCR tiempo real para determinación de citocinas en bazo.....	39
12. Determinación de anticuerpos anti- <i>T. canis</i> .....	41
12.1 Producción de antígenos de excreción-secreción de <i>T. canis</i> (Ag-ESTc).....	41
12.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	41

12.3 Electroforesis de Ag-ESTc obtenidos a partir de medios de cultivo de L2 de <i>T. canis</i> .....	42
12.4 ELISA para la determinación de IgG anti- <i>T. canis</i> .....	42
13. Análisis estadístico.....	43
14. Resumen del diseño experimental.....	43
RESULTADOS.....	44
1. Número de larvas en pulmones e hígado.....	44
2. Lesiones macro y microscópicas en pulmones e hígado.....	44
3. Niveles de BPA, P <sub>4</sub> y PRL en suero.....	46
4. Subpoblaciones celulares del sistema inmune.....	47
4.1 Células de la inmunidad innata.....	47
4.2 Células de la inmunidad adaptativa.....	49
5. Expresión relativa de citocinas Th1/Th2 en bazo.....	51
6. Producción de anticuerpos anti- <i>T. canis</i> .....	54
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXO I ARTÍCULOS ORIGINALES DERIVADOS DE LA TESIS	
ANEXO II PARTICIPACION EN OTRAS PUBLICACIONES	
ANEXO III CAPÍTULOS EN LIBRO	

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura química de varios Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs).....	9
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la interacción del E <sub>2</sub> y el BPA con los receptores nucleares para estrógenos.....	11
<b>Figura 3.</b> Efectos del BPA sobre las células del sistema inmunitario.....	20
<b>Figura 4.</b> Efecto del BPA sobre la susceptibilidad a distintas infecciones.....	24
<b>Figura 5.</b> Ciclo biológico de <i>T. canis</i> .....	26
<b>Figura 6.</b> <i>Dot plots</i> representativos de la selección de las subpoblaciones celulares de interés para el análisis de citometría de flujo.....	38
<b>Figura 7.</b> Metodología experimental para la obtención de los distintos órganos y tejidos utilizados para la realización del experimento.....	43
<b>Figura 8.</b> Número de larvas en pulmón e hígado de ratas macho expuestas al BPA de manera perinatal e infectadas con <i>T. canis</i> .....	44
<b>Figura 9.</b> Lesiones macro y microscópicas en pulmón e hígado de ratas macho expuestas al BPA de manera perinatal e infectadas con <i>T. canis</i> .....	45
<b>Figura 10.</b> Niveles de Bisfenol A (BPA), Progesterona (P <sub>4</sub> ) y Prolactina (PRL) en ratas macho expuestas al BPA de manera perinatal	



e infectadas con <i>T. canis</i> .....	46
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de las subpoblaciones celulares de la respuesta inmunitaria innata en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con <i>T. canis</i> .....	48
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de LT en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con <i>T. canis</i> .....	50
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de LB en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con <i>T. canis</i> .....	51
<b>Figura 14.</b> Expresión relativa de citocinas Th1 en bazo provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con <i>T. canis</i> .....	52
<b>Figura 15.</b> Expresión relativa de citocinas Th2 en bazo provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con <i>T. canis</i> .....	53

**Figura 16** Niveles séricos de anticuerpos anti-*T. canis* provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con *T. canis*.....54

**LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1** Secuencia de oligonucleótidos utilizados en el experimento.....41

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. BPA.....Bisfenol A
2. *T. canis*.....*Toxocara canis*
3. IL.....Interleucina
4. MIF.....Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos
5. VIP.....Péptido Intestinal Vasoactivo
6. H-H-A.....Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal
7. IFN- $\gamma$ .....Interferón gamma
8. PRL.....Prolactina
9. LT.....Linfocitos T
10. LB.....Linfocitos B
11. NK.....Células Natural Killer
12. iNOS.....Sintasa de Óxido Nítrico Inducible
13. H-H-G.....Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal
14. ERs.....Receptores de estrógenos
15. PR.....Receptor de progesterona
16. AR.....Receptor de andrógenos
17. DHEA.....Dehidroepiandrosterona
18. EGF.....Factor de crecimiento epidermal
19. E<sub>2</sub>.....17 $\beta$ -estradiol
20. T<sub>4</sub>.....Testosterona
21. DHT.....Dihidrotestosterona

22. *T. crassiceps*.....*Taenia crassiceps*
23. CDEs.....Compuestos disruptores endócrinos
24. DDT.....Dicloro-Difenil-Tricloroetano
25. BPS.....Bisfenol S
26. DES.....Dietilestilbestrol
27. AhR.....Receptor arilhidrocarburo
28. ThR.....Receptor de hormona tiroidea
29. FDA.....Food and Drug Administration
30. EFSA.....European Food Safety Agency
31. M $\phi$ .....Macrófagos
32. ON.....Óxido nítrico
33. LPS.....Lipopolisacárido
34. TNF- $\alpha$ .....Factor de necrosis tumoral-alfa
35. ROS.....Especies reactivas de oxígeno
36. PBMCs.....Células mononucleares de sangre periférica
37. M1.....Macrófagos clásicamente activados
38. M2.....Macrófagos alternativamente activados
39. DCs.....Células dendríticas
40. OVA.....Ovoalbúmina
41. ThL.....Linfocitos T cooperadores
42. TcL.....Linfocitos T citotóxicos
43. Con-A.....Concanavalina A



44. HEL.....Lisozima de huevo de gallina
45. *T. spiralis*.....*Trichinella spiralis*
46. *L. major*.....*Leishmania major*
47. Tregs.....Linfocitos T reguladores
48. PCs.....Células plasmáticas
49. Ig.....Inmunoglobulina
50. *E. coli*.....*Escherichia coli*
51. *N brasiliensis*.....*Nippostrongylus brasiliensis*
52. *C. elegans*.....*Caenorhabditis elegans*
53. HL.....Huevos larvados
54. L2.....Larva de Segundo estadio
55. RIA.....Radioinmunoanálisis
56. PCR.....Reacción en cadena de la polimerasa
57. IIB.....Instituto de Investigaciones Biomédicas
58. UNAM.....Universidad Nacional Autónoma de México
59. S/Trat.....Sin tratamiento
60. Ctrl.....Control
61. Vhc.....Vehículo
62. PBS.....Buffer de fosfatos salino
62. SSF.....Solución salina fisiológica
63. dpi.....Días post-infección
64. rpm.....Revoluciones por minuto

65. GLM.....Ganglios linfáticos mesentéricos
66. ARN.....Ácido ribonucleico
67. ARNm.....ARN mensajero
68. EtOH.....Etanol
69. ADN.....Ácido desoxiribonucleico
70. ADNc.....ADN complementario
71. Ag-ESTc.....Antígenos de excreción y secreción de *Toxocara canis*
72. DE.....Desviación estándar

# INTRODUCCIÓN

## 1. Comunicación endócrino-inmunológica

Dentro del organismo existen distintas redes biológicas moleculares que se encargan del mantenimiento de la homeostasis durante la salud y la enfermedad. Una de las interacciones más importantes que se dan en este sentido, es la comunicación entre el sistema endócrino y el sistema inmunitario. Estos dos sistemas, forman una compleja red de comunicación directa y bidireccional, a través de sus principales factores solubles: por parte del sistema endócrino, las hormonas, y por parte del sistema inmunitario, las citocinas (Besedovsky and Del Rey, 1996).

Anteriormente, se consideraba que el sistema inmunitario era autorregulable, y no se consideraban otros aspectos trascendentales en esta comunicación multidireccional que mantiene con el sistema neuroendócrino. Una de las primeras observaciones sobre esta comunicación entre los dos sistemas, se evidenció al observar que la castración de conejos generaba una hipertrofia tímica, la cual, al momento de existir una restitución con andrógenos exógenos en los conejos castrados, revertía esta hipertrofia tímica (Chiodi, 1940). Además, se ha observado que la producción de anticuerpos es mayor en las hembras que en los machos, esto es debido a la capacidad que tienen los estrógenos para estimular la diferenciación de los linfocitos B (LB) hacia células plasmáticas, que son las productoras de anticuerpos.

Estos hechos, determinan el dimorfismo sexual que existe en todas las enfermedades, particularmente las autoinmunes, como la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, diabetes tipo I y tiroiditis de Hashimoto, donde en algunas de estas enfermedades nueve de cada diez casos se presentan en mujeres (De Leon-Nava and Morales-Montor, 2006; Klein and Flanagan, 2016).

Aunado a lo anterior, también se sabe que citocinas como las interleucinas IL-6, la IL-1 $\beta$  y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, por sus siglas en inglés), tienen efectos sobre neuronas hipocampales e hipofisarias (Tonelli and

Postolache, 2005). Estas neuronas a su vez producen neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés), la somatostatina y la sustancia P, todas ellas con importantes repercusiones en la regulación de la inflamación sistémica y a nivel de mucosas (Agro and Stanisiz, 1995). Por otra parte, hormonas del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (H-H-A) como son los glucocorticoides, pueden reprimir la respuesta inflamatoria por medio de una disminución en los niveles de interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) y de IL-12 (Elenkov, 2004).

Otra hormona de origen hipofisario, la prolactina (PRL), también es una importante hormona inmunomoduladora. La relación entre la PRL y la respuesta inmunológica se puso de manifiesto cuando Smith en 1930, demostró que existía atrofia tímica en ratas que habían sido hipofisectomizadas (Smith, 1930). En estudios posteriores, Nagy y Berczi, reportaron que existe una inmunodeficiencia en ratas hipofisectomizadas, donde la administración de PRL, de hormona de crecimiento y de lactógeno placentario restablecieron la actividad inmunológica (Nagy E, Berczi I, 1983; Nagy and Berkzi, 1978). Experimentos similares, utilizando bromocriptina (agonista dopaminérgico) para inhibir selectivamente la secreción de PRL, mostraron resultados similares al trabajo anterior: es decir, la disminución en la respuesta inmunitaria tanto celular como humoral, que se restablece al suspender la bromocriptina (Nagy et al., 1983). Además, se ha encontrado que el sistema inmune es capaz de regular la secreción de PRL (Matera, 1997). Citocinas como la IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) pueden actuar como reguladores endócrinos en la liberación de la PRL hipofisaria (Spangelo and Macleod, 1990).

Reguladores conocidos de la síntesis de la PRL hipofisaria, como los estrógenos, el péptido intestinal vasoactivo, la hormona liberadora de tirotropina y un agonista de receptores D2 de la dopamina (bromocriptina) no modifican la expresión del gen de la PRL en los linfocitos. Por el contrario, la dexametasona y la ciclosporina inhiben la expresión de la PRL linfocitaria, y el ácido retinoico la estimula (Gellersen et al., 1984).

En otras investigaciones, se ha reportado que al utilizar anticuerpos anti-PRL se inhibe la proliferación de células linfocitarias en presencia de mitógenos específicos tanto para linfocitos T (LT) y LB, así como la producción de citocinas como la IL-2 e IL-4, que también actúan como factores de crecimiento en estas células (Hartmann et al., 1989). También se reportó que *in vitro* la adición de PRL combinada con IL-2, fitohemaglutinina o concanavalina A (Con-A) favorece la mitosis de células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), de LT y LB (Clevenger et al., 1990). En los granulocitos, la PRL regula la síntesis de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, por sus siglas en inglés), enzima que produce óxido nítrico que media la respuesta inmunológica y la inflamación (Dogusan et al., 2001). Igualmente, también estimula la síntesis de IL-2 y su receptor en timocitos y esplenocitos provenientes de ratas ovariectomizadas (Viselli et al., 1991).

En la actualidad, la PRL es considerada no solo como una hormona, si no también como una citocina que polariza una respuesta inmunitaria celular, estimulando la secreción de citocinas tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ ), además de participar en la regulación de la densidad de la población celular controlando tanto la proliferación como la muerte.

En el caso de las hormonas del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (H-H-G), los esteroides sexuales, además de participar y coordinar diversas funciones como son el crecimiento y la reproducción, también toman parte en la regulación de la respuesta inmunológica (Akmaev, 1996). En las especies que son sexualmente dimórficas, se ha observado que el sistema inmunitario también actúa de manera dimórfica. Lo anterior fue demostrado cuando se reportó que las hembras producen una mayor cantidad de anticuerpos y que además tienen respuestas humorales contra patógenos o vacunas más intensas que los machos. (Grossman, 1989).

Por otra parte, los esteroides sexuales modulan aspectos relacionados con la respuesta inmunológica como son: maduración y selección de timocitos, la proliferación y el tránsito celular, la expresión de receptores y la producción de citocinas (Da Silva, 1999; Grossman and Roselle, 1983). Estos efectos, están

mediados por la presencia de receptores específicos para estas hormonas en las células del sistema inmunitario, siendo los receptores de estrógenos clásicos  $\alpha$  y  $\beta$  (ER $\alpha$  y ER $\beta$ , por sus siglas en inglés), el receptor de progesterona (PR, por sus siglas en inglés) y el receptor a andrógenos (AR, por sus siglas en inglés) los más importantes (Muñoz-Cruz et al., 2011).

Lo anterior demuestra que el sistema inmunitario se regula y es regulado por el macrosistema neuroendócrino, a través del pleitropismo de los distintos mensajeros químicos que lo conforman, así como de la gama de receptores y moléculas efectoras compartidas entre los tres sistemas. Sin embargo, el grado de complejidad no termina ahí: dado que esta comunicación se lleva a cabo todo el tiempo en condiciones normales, la invasión de algo externo, inducirá cambios importantes que alterarán esta homeostasis. Por lo que, por ejemplo, un parásito, conformado por sus propias células, tejidos y órganos, representa un nivel más en el escalonamiento de complejidad de la red neuroinmunoendócrina, y ahora se convierte en la red neuroinmunoendócrina hospedero-parásito.

## **2. La red neuroinmunoendócrina durante enfermedades parasitarias**

Los parásitos, son organismos que han desarrollado una serie de mecanismos de sobrevivencia en el hospedero para facilitar la infección. Estos mecanismos se dividen en tres tipos: 1) la evasión de la respuesta inmunológica a través de distintas estrategias, como la exclusión anatómica, el enmascaramiento, la variación antigénica y el mimetismo molecular, 2) la polarización de la respuesta inmunitaria del hospedero, de una respuesta protectora hacia una respuesta permisiva de la infección y 3) la explotación de algún componente del hospedero por parte del parásito (Damian, 1997).

En las últimas décadas, se ha sugerido la existencia de un nuevo mecanismo de explotación del hospedero por parte del parásito, en donde éste último aprovecha directa o indirectamente distintas hormonas y factores de crecimiento del hospedero que le permiten un rápido establecimiento y una mayor efectividad en su tasa

reproductiva, ambos, procesos claves en el mantenimiento del ciclo vital del parásito (Morales-Montor et al., 2001; Escobedo et al., 2005). De forma general, las hormonas producidas por el hospedero pueden estar regulando funciones vitales del parásito. Este fenómeno, acuñado en 2005 por Escobedo y cols (Escobedo et al., 2005) llamado transregulación, aunado a la respuesta inmunitaria, podrían determinar el rumbo de una infección parasitaria.

## 2.1 Ejemplos de transregulación

Estudios realizados con *Leishmania sp.* utilizando modelos murinos, indican que los machos desarrollan una fuerte respuesta inmunitaria tipo Th1, mientras que en las hembras hay una respuesta más equilibrada o con una leve inclinación hacia un perfil Th2 (Roberts et al., 2001). Además, se ha reportado que durante la gestación se incrementa la susceptibilidad de ratones C57BL/6 a *Leishmania major*, y esto a su vez se asocia a un aumento en los niveles de estrógenos y progesterona (P<sub>4</sub>), con una fuerte polarización hacia una respuesta inmunitaria Th2, la cual es permisible para el establecimiento del parásito (Krishnan et al., 1996). En otro estudio, a donde se evaluó el papel de la PRL durante la infección por *Leishmania infantum*, se reporta que hembras de hamster sirio lactantes infectadas con este parásito no llegan a desarrollar la enfermedad, en comparación con hembras infectadas que no están en periodo de lactancia, lo cual sugeriría una función protectora por parte de la PRL (Gomez-Ochoa et al., 2003). Sin embargo, no hay estudios que sean más profundos para dilucidar los posibles mecanismos de la PRL para inducir protección durante esta infección.

Otra enfermedad ocasionada por un protozoario, la malaria (enfermedad ocasionada por *Plasmodium falciparum*), es considerada un grave problema de salud entre las mujeres embarazadas en zonas endémicas, en comparación con las mujeres no embarazadas. En un estudio realizado por Bayoumi *et al.* en el 2009, se reportaron niveles de PRL bajos en mujeres embarazadas infectadas, en comparación con mujeres embarazadas no infectadas. También encontraron una correlación negativa entre la PRL y la IL-4 e IL-10, pero no encontró una correlación

significativa entre la PRL y el cortisol, sugiriendo que los bajos niveles hormonales de PRL pueden incrementar la susceptibilidad a la infección por este parásito (Bayoumi et al., 2009).

Por otro lado, experimentos realizados en un modelo murino de toxoplasmosis, sugieren que tanto el TNF- $\alpha$  como la PRL pueden estimular a las células microgliales para montar una respuesta anti-toxoplasma. Lo anterior, induciendo la destrucción intracelular de los parásitos, y la liberación de citocinas como la IL-1 $\beta$ , IL-3 e IL-6 (Benedetto et al., 2001). En otro estudio más reciente, se evaluó la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en mujeres con niveles normales de PRL, con hiperprolactinemia e hipoprolactinemia. Las mujeres con hiperprolactinemia mostraron una seroprevalencia más baja que aquellas con niveles de PRL normales (Dzitko et al., 2008). Esto sugiere que altos niveles de PRL, pueden ser uno de los factores importantes para la prevención de la infección con *T. gondii* en mujeres.

Por otra parte, ensayos *in vitro*, usando como estrategia experimental al parásito *Schistosoma mansoni*, demuestran que el tratamiento con dehidroepiandrosterona (DHEA), en cercarias, esquistosomulas y gusanos adultos inhibe hasta en un 100% la viabilidad y ovoposición, mientras que el tratamiento con cortisol afecta sólo la ovoposición en el gusano adulto (Morales-Montor et al., 2001). Por otro lado, amastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados *in vitro* con factor de crecimiento epidermal (EGF) murino, incrementan considerablemente la síntesis de ADN, su crecimiento y actividad metabólica (Ghansah et al., 2002).

En el caso del metacéstodo de *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*), se ha demostrado que el 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) está implicado en el crecimiento y reproducción del parásito, lo cual, repercute en una mayor carga parasitaria en las hembras. La infección de ratones macho con este parásito, disminuye las concentraciones de testosterona (T<sub>4</sub>), concomitantemente con un aumento en las concentraciones de estradiol; inhibiendo conductas sexuales como la monta, la intromisión y la respuesta eyaculatoria durante infecciones crónicas (Morales et al.,



1996). Además, se ha observado que la P<sub>4</sub>, el E<sub>2</sub>, la T<sub>4</sub> y la dihidrotestosterona (DHT) pueden afectar la expresión de proteínas de citoesqueleto (actina, miosina y tubulina) de las células flama, las cuales son encargadas de la detoxificación del parásito. Mientras el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> incrementan la actividad de éstas, y el bienestar del parásito, la T<sub>4</sub> y la DHT las inhiben (Ambrosio et al., 2015, 2014). Lo anterior es un indicativo de que el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> actúan directamente sobre los cisticercos de *T. crassiceps*, alterando la expresión de estas moléculas y, por lo tanto, afectando el ensamblaje y la función de las células de flama (Ambrosio et al., 2015, 2014).

En otros estudios, pero usando el helminto humano de importancia médica *Taenia solium* (*T. solium*), se ha observado que la P<sub>4</sub> tiene un efecto dual en el desarrollo de los parásitos. Escobedo y cols, demostraron que *in vivo*, usando como estrategia experimental al hamster dorado, reportaron que el tratamiento con P<sub>4</sub> no solo reduce hasta en un 80% el número de parásitos recuperados, si no que también genera una disminución en la longitud del parásito en un 75% (Escobedo et al., 2011). Por otra parte, en un reporte *in vitro*, se demostró que la P<sub>4</sub> tiene un efecto positivo sobre el parásito, ya que aumentó la evaginación del éscolex, así como el tamaño del mismo, y al momento de utilizar un antagonista (RU486), dichos efectos se veían inhibidos (Escobedo et al., 2010).

Aguilar-Díaz y cols., realizaron estudios donde cultivaron el metacéstodo de *T. solium* con P<sub>4</sub>, confirmando lo reportado por Escobedo y cols en el 2010, que la P<sub>4</sub> favorece la evaginación y aumenta el tamaño del éscolex del parásito. Lo que es novedad, que los autores demostraron, es que el mecanismo molecular es a través de la unión de la P<sub>4</sub> a un componente membranal del receptor para P<sub>4</sub> que está presente en el parásito (Aguilar-Díaz et al., 2018).

Por otra parte, Amézquita y cols. (2017) reportan que el cultivo de larvas de *Haemonchus contortus* con P<sub>4</sub> inhibe el proceso de muda de las larvas, probablemente por el uso de un mecanismo similar al estudio anterior, que es la unión a un receptor hormonal presente en las larvas del parásito (Gutiérrez-Amézquita et al., 2017).

En el caso del parásito *Toxocara canis* (*T. canis*), se ha reportado la presencia del receptor para PRL (PRL-R, por sus siglas en inglés) en las larvas de segundo estadio. Además, la estimulación *in vitro* con PRL aumenta el porcentaje de células positivas al PRL-R así como su expresión en estas células, lo cual repercute en un incremento en el crecimiento y la motilidad de las larvas (Chávez-Güitrón et al., 2016).

Como podemos observar, las hormonas son moléculas importantes que pueden estar interactuando con el sistema inmunitario modulando su respuesta o directamente sobre los parásitos favoreciendo o inhibiendo muchas de sus acciones biológicas. Sin embargo, existen compuestos exógenos que pueden ser agonistas o antagonistas de las hormonas endógenas, los cuales son capaces de imitar, intensificar o inhibir su funcionamiento, y por lo tanto, son capaces de modular aspectos de la respuesta inmunitaria o de unirse a receptores hormonales presentes en ciertos patógenos como en el caso de los parásitos. Dichos compuestos son conocidos como Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs).

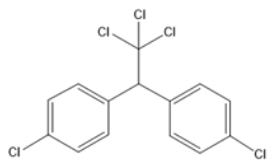
### **3. Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs)**

Los CDEs son sustancias que existen en el ambiente como consecuencia de la actividad humana, ya sea agrícola o industrial (Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), BPA, Bisfenol S (BPS), hidrocarburos policíclicos aromáticos, y ftalatos, por mencionar unos pocos), aunque también se pueden encontrar en productos de uso farmacéutico [etinilestradiol, Dietilestilbestrol (DES)] o de manera natural en distintas plantas (fitoestrógenos: genisteína, daidzeína, coumestrol) (Figura 1) (Guzmán-Arriaga and Zambrano, 2007). Estos CDEs pueden presentar actividad estrogénica, anti-estrogénica o anti-androgénica. Además, son altamente lipofílicos y se pueden almacenar por periodos prolongados de tiempo en el tejido adiposo. Durante el embarazo, el feto puede ser expuesto a estos compuestos por vía transplacentaria y al momento del nacimiento por la vía lactogénica (Guzmán-Arriaga and Zambrano, 2007).

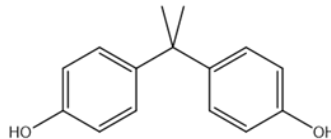
En distintos estudios se ha observado que los CDEs pueden generar alteraciones irreversibles en el eje reproductivo, y en el sistema nervioso central de la descendencia, como consecuencia de la exposición transplacentaria y neonatal a este tipo de compuestos en diferentes especies. La susceptibilidad a estos compuestos se presenta en cualquier edad, sin embargo, se ha observado que las etapa perinatal (prenatal y neonatal) son cruciales para el desarrollo de diferentes padecimientos durante la vida adulta (Sweeney, 2002).

## **Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs)**

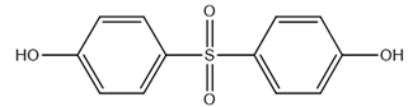
### ***a) Origen sintético***



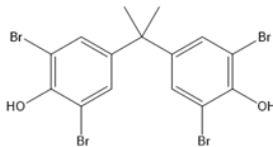
**DDT**



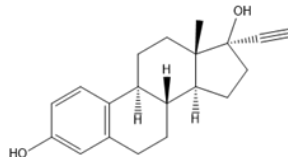
**BPA**



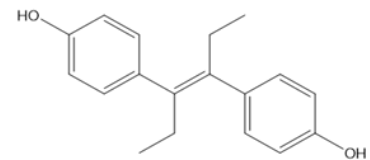
**BPS**



**TetrabromoBPA**

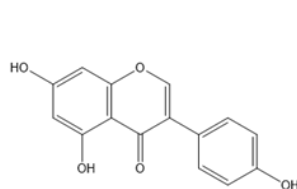


**Etinilestradiol**

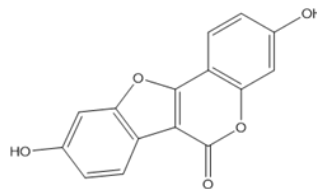


**DES**

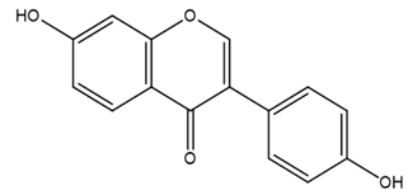
### ***b) Origen natural***



**Genisteína**



**Coumestrol**

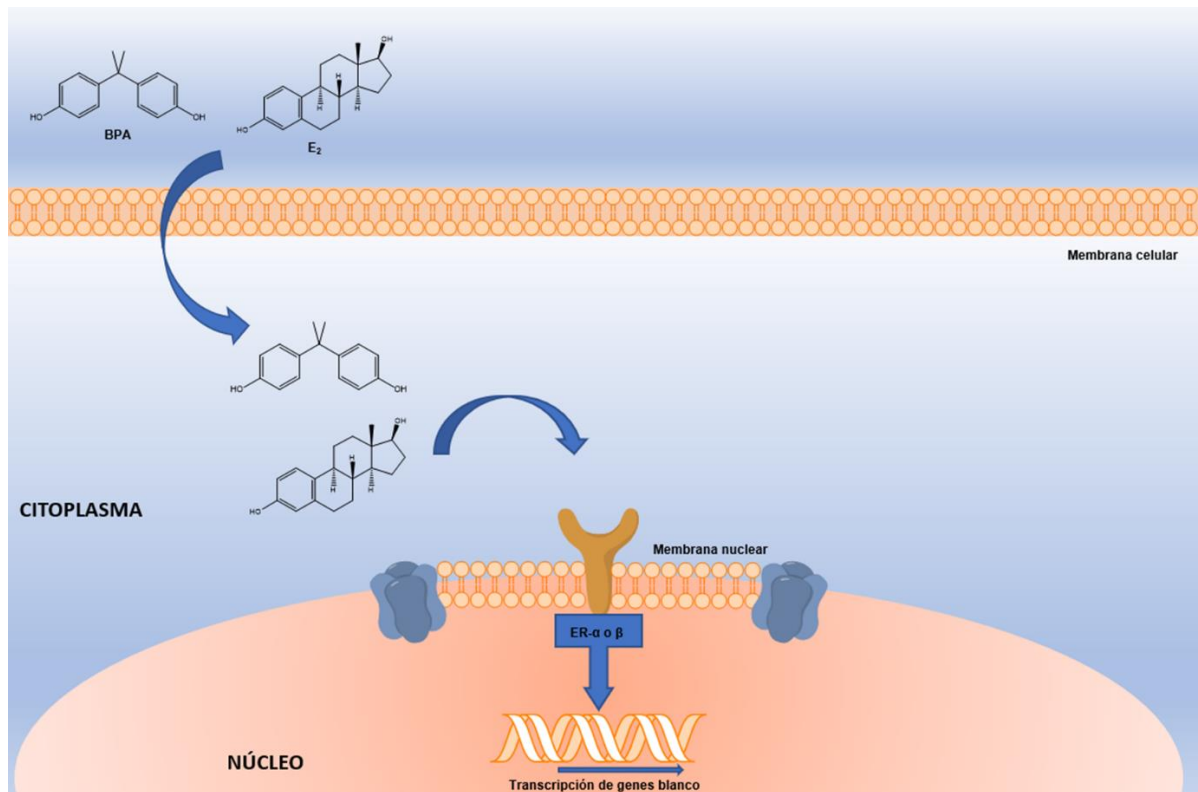


**Daidzeína**

**Figura 1. Estructura química de varios Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs).** a) Origen sintético; Diclono-Difenil-Tricloroetano (DDT), Bisfenol A (BPA), Bisfenol S (BPS), Tetrabromo Bisfenol A (TetrabromoBPA), Etinilestradiol, Dietilestilbestrol (DES). b) Origen natural; Genisteína, Coumestrol, Daidzeína.

#### 4. Bisfenol A (BPA)

El BPA es un monómero ampliamente utilizado en la elaboración de plásticos de policarbonatos, resinas epóxicas y selladores dentales; todos ellos materiales de uso cotidiano (Amaral Mendes, 2002). Este compuesto puede liberarse de estos materiales debido a una polimerización incompleta o por hidrólisis de los enlaces éster de los polímeros que lo contienen, lo cual puede ocurrir al someterlos a altas temperaturas, o cambios bruscos de pH (a condiciones ácidas) o por mecanismos enzimáticos. La principal fuente de exposición en animales y humanos, es a través de alimentos y bebidas que han estado en contacto con materiales fabricados con BPA (envases de almacenamiento de comida, botellas de agua, entre otros), el cual se desprende de su matriz, y es ingerido vía oral (Welshons et al., 2006). El BPA es catalogado como un CDE de carácter estrogénico debido a que se puede unir a los receptores nucleares de estrógenos (ER) pero con una afinidad mucho menor ( $<1,000$ ) que su ligando natural, el  $E_2$  (Figura 2). Además, también puede unirse al receptor arilhidrocarburo (AhR) (Bonfeld-Jørgensen et al., 2007) y al receptor de hormona tiroidea (ThR) (Zoeller et al., 2005). La Food and Drug Administration (FDA) y la European Food Safety Agency (EFSA) calculan la Ingesta Diaria Tolerable de BPA en  $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Agency and Environmental Protection Agency, 2011). Además, la FDA estima que la exposición a BPA por envase de alimentos es  $0.185\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  en adultos y hasta  $2.42\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  en niños de 1 a 2 meses de edad (Agency and Environmental Protection Agency, 2011).



**Figura 2. Representación esquemática de la interacción del E<sub>2</sub> y el BPA con los receptores nucleares para estrógenos.** El BPA interactúa con los receptores nucleares para esteroides. BPA; Bisfenol A, E<sub>2</sub>; 17βEstradiol; ER-α o β; Receptor de Estrógenos alfa o beta.

## 5. Efectos del BPA sobre el sistema inmunitario

En varios estudios se han reportado distintos efectos del BPA sobre el sistema inmunitario, sin embargo, estos estudios varían dependiendo si son realizados *in vivo* o *in vitro*, de la especie animal utilizada, de la dosis, de la vía de administración y de la etapa del desarrollo en el que se administra. Además, en los estudios *in vivo* muchas veces no se toma en cuenta que la función de la respuesta inmunitaria debe ser estudiada bajo algún reto antigénico, por lo que existe poca información acerca de los efectos que el BPA puede estar ejerciendo sobre el sistema inmunitario durante un proceso infeccioso.

## 5.1 Efectos del BPA sobre las células de la inmunidad innata

### 5.1.1 Macrófagos

Los M $\phi$  son una de las principales células fagocíticas que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis en el organismo. Además, se ha demostrado que expresan las dos isoformas del receptor a estrógenos (ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ ) (Campesi et al., 2017; Wang et al., 2005), con lo cual, el BPA podría ejercer sus efectos uniéndose a dichos receptores.

En cuanto a los trabajos en los cuales se reportan efectos estimulatorios del BPA sobre los M $\phi$  Hong y cols., usando la línea celular de M $\phi$  murinos RAW264, indican que el BPA a una concentración de 43nM, potenció la producción de óxido nítrico (ON) inducida por lipopolisacárido (LPS), mientras que la producción de IFN- $\gamma$  no se vio alterada (Hong et al., 2004). En otro estudio realizado por Yamashita y cols., se reporta que el BPA a una concentración de 0.1 $\mu$ M, estimula la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6 e IL-12, además de aumentar la expresión de la molécula co-estimuladora CD86, en M $\phi$  peritoneales murinos (Yamashita et al., 2005). En otro estudio donde se evaluó el efecto de un análogo del BPA [BPA-glicidil-metacrilato (BisGMA)], sobre la función de la línea celular de M $\phi$  RAW264.7, se reporta un aumento en la producción del TNF- $\alpha$ , además de la expresión de moléculas de superficie como CD11, CD14, CD40, CD45, CD54 y CD80 en esta misma línea celular (Y. H. Kuan et al., 2012). Por otra parte, en esta misma línea celular, también se ha reportado un aumento en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, ON y en la expresión de iNOS, de una forma dosis dependiente, además de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) intra y extracelular (Yu Hsiang Kuan et al., 2012). En otro reporte, utilizando la línea celular de M $\phi$  humanos THP1, Liu y cols., reportan que el BPA a una concentración de 0.1 $\mu$ M incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6, y una disminución de las citocinas reguladoras IL-10 y TGF- $\beta$ . Además observan que el uso del antagonista de los receptores nucleares a estrógenos, ICI 182,780,

revierte la producción de estas citocinas (disminuye TNF- $\alpha$  e IL-6 e incrementa IL-10 y TGF- $\beta$ ), lo cual es un indicativo de que el BPA puede actuar por medio de estos receptores (Liu et al., 2014). Teixeira y cols., utilizando M $\phi$  derivados de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) humanas, y estimuladas o no con LPS o IL-4, reportan efectos distintos del BPA en la producción de citocinas en M $\phi$  clásicamente activados (M1) o alternativamente activados (M2). Ellos reportan que el BPA, estimula la migración de M2, pero disminuye la producción de IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$  en estas células. En el caso de los M1, reportan un aumento en la producción de IL-10 y una disminución de IL-6 (Teixeira et al., 2016). Finalmente, Yang y cols., utilizando M $\phi$  de carpa (*Cyprinus carpio*), reportan que el BPA incrementó la producción de ON y de ROS de una forma dosis-dependiente (Yang et al., 2015).

Por otra parte, también se han reportado efectos inhibitorios de BPA sobre la función de los M $\phi$ . Segura y cols., evaluaron la capacidad de adherencia de M $\phi$  peritoneales de ratas expuestas a BPA, demostrando que el BPA a una concentración de 10nM, inhibe la adherencia de los M $\phi$ , pero no altera su viabilidad (Segura et al., 1999). En otro estudio Kim y Jeong, evaluaron el efecto del BPA sobre la producción de ON, TNF- $\alpha$  e iNOS en M $\phi$  peritoneales de ratón. Ellos reportan que el BPA a una concentración de 50 $\mu$ M no afecta la producción de ON o de TNF- $\alpha$ , por el contrario, el BPA inhibe su producción cuando se da un estímulo con LPS, además también disminuye la expresión de iNOS con un efecto dosis-dependiente (Kim and Jeong, 2003). Por otra parte, Byun y cols., indican que los M $\phi$  peritoneales de ratones tratados con BPA (500mg/kg/día), por 5 días consecutivos durante 4 semanas, y cultivados por 2 o 4 días en presencia de LPS, tienen una disminución en la secreción de TNF- $\alpha$  y en la producción de ON, además, la administración de BPA a una concentración de 10 y 100 $\mu$ M al cultivo, tiene el mismo efecto en la secreción de TNF- $\alpha$  y en la producción de ON (Byun et al., 2005). En otro reporte, utilizando la línea celular RAW 264, Ohnishi y cols. reportan que el BPA a una concentración de 100 $\mu$ M, inhibe la activación del promotor de IFN- $\beta$  cuando

es inducido por LPS (Ohnishi et al., 2008). Utilizando la misma línea celular Yoshitake y cols., reportan que el BPA suprime la producción de ON y la activación de NFκB cuando es inducida por LPS de una forma dosis-dependiente. Además, estos autores indican que estos efectos fueron bloqueados al usar el antagonista de los ERs, ICI182780 (Yoshitake et al., 2008). Del mismo modo, Kim y cols., reportan que el tratamiento con BPA a una dosis de 200μM reduce la producción de ON e induce la muerte celular por apoptosis en la línea celular RAW 264.7 (Kim et al., 2014).

### **5.1.2 Células dendríticas**

Las células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés) son las células presentadoras de antígeno por excelencia y juegan un papel fundamental en la regulación y polarización de las respuestas inmunológicas, además, se ha reportado que estas células también expresan el ER-α y el ER-β (Kovats, 2015).

Acerca de las acciones que puede tener el BPA sobre estas células, Guo y cols., reportan que DCs derivadas de PBMCs en presencia de TNF-α incrementan la expresión del ligando de la quimiocina 1 (CCL1), además de generar un aumento en la producción de IL-5, IL-10 e IL-13, así como en la expresión de GATA3 (Guo et al., 2010). En otro reporte Pisapia y cols., reportan un aumento en la diferenciación de las DCs, así como un aumento en la expresión de MHCII y CD86 en estas células (Pisapia et al., 2012). Por otra parte, Švajger y cols., indican que el BPA a una concentración de 50μM disminuye la capacidad endocítica de las DCs, así como la expresión de CD1a (Švajger et al., 2016). En otro reporte, Camarca y cols., indican que el BPA a una concentración de 1nM genera un aumento en la densidad de DCs que expresan CD1a, pero a su vez, hay una disminución en la expresión de los marcadores de activación HLA-DR y CD86 en DCs diferenciadas de PBMCs humanas (Camarca et al., 2016).



### **5.1.3 Granulocitos**

Los granulocitos son las células de la inmunidad innata más abundantes en el organismo. Se dividen en neutrófilos, que constituyen entre el 90 y el 95% de su totalidad, los eosinófilos del 3 a 5% y los basófilos menos del 1%. En la literatura existen muy pocos reportes acerca del efecto que puede tener el BPA sobre estas células. En un reporte realizado por He y cols., se demuestra que el BPA a una dosis de 1mg/kg aumenta el reclutamiento de eosinófilos inducidos por ovoalbúmina (OVA) en los alveolos y submucosa de las vías aéreas (He et al., 2016). También, se ha reportado que la exposición perinatal a BPA aumenta la inflamación eosinofílica en las vías aéreas (Midoro-Horiuti et al., 2010).

En el caso de los neutrófilos, Watanabe y cols., evaluaron el efecto del BPA sobre la diferenciación neutrofílica de las células HL-60 inducida por dimetilsulfóxido (DMSO) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Estos autores reportan que el BPA a dosis bajas ( $10^{-10}$  y  $10^{-8}$  M), genera un aumento en la diferenciación neutrofílica, además de una elevación de aproximadamente un 20% en la producción de superóxido y la expresión de CD18 en células HL-60 diferenciadas (Watanabe et al., 2003). Adicionalmente, reportan que al agregar tamoxifen (inhibidor competitivo de los ERs), no se suprime el efecto del BPA, lo cual sugiere que este efecto potenciador en la diferenciación de los neutrófilos se da a través de una vía independiente de los receptores nucleares de estrógenos (Watanabe et al., 2003). En otro estudio donde se evaluó el efecto del tetrabromo bisfenol A (TBBPA), se indica que el TBBPA aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno en los neutrófilos de forma dosis dependiente (Reistad et al., 2005).

## **5.2 Efecto del BPA sobre las células de la inmunidad adaptativa**

### **5.2.1 Linfocitos T (LT)**

Los LT son células de la inmunidad adaptativa que se pueden dividir en linfocitos T citotóxicos (Tc, por sus siglas en inglés) o en linfocitos T cooperadores

(Th, por sus siglas en inglés), y estos a su vez en Th1, Th2, Th9, Th17, Th33, con base en el patrón de citocinas que secretan. Estas células han demostrado poseer receptores para esteroides sexuales (Klein and Flanagan, 2016). Los esteroides sexuales a su vez, pueden estar modulando la diferenciación de los LT y con esto regulando la respuesta inmunitaria (Ansar Ahmed et al., 1985; Labib Salem et al., 2000), y al poseer receptores para dichas hormonas, el BPA puede estar ejerciendo su efecto a través de dichos receptores como se ha reportado en distintos estudios, en los cuales hay diferentes resultados que difieren en cuanto a la polarización de la respuesta inmune por parte de los LT (Th1, Th2, Th17).

Entre los reportes que indican una polarización de la respuesta inmunitaria hacia Th1, Youn y cols., cultivaron esplenocitos activados con Con-A de ratones expuestos al BPA por 4 semanas en el agua de beber a dosis de 0.015, 1.5 y 30 mg/ml, reportando que dicha exposición a BPA aumenta la expresión de IFN- $\gamma$  y genera una reducción en la expresión de IL-4 (Youn et al., 2002). Del mismo modo, Yoshino y cols., evalúan el efecto del BPA en un modelo de inmunización con lisozima de huevo de gallina (HEL, por sus siglas en inglés), reportando que el tratamiento con BPA a dosis de 30 y 300 $\mu$ g/kg aumentó significativamente la secreción de IFN- $\gamma$ , mientras que la producción de IL-4 aumentó a dosis de 300 y 3000 $\mu$ g/kg, con lo cual indican que existe una predominancia de la respuesta tipo Th1 (Yoshino et al., 2003), además, usando un esquema de exposición prenatal al BPA, donde las crías macho expuestas al BPA, posteriormente fueron inmunizadas en la edad adulta con HEL, mostraron que el BPA generó un aumento tanto en los parámetros de respuesta Th1 (IFN-  $\gamma$ ) como de la respuesta Th2 (IL-4) pero, el aumento en la respuesta Th1 fue mayor que en la Th2 (Yoshino et al., 2004). Alizadeh y cols., utilizando un modelo de alergia inducido por OVA indican que hay un aumento en la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  en cultivo de esplenocitos provenientes de animales expuestos a BPA (Alizadeh et al., 2006). Menard y cols., evaluaron el efecto de la exposición a BPA sobre la respuesta inmunitaria específica contra el antígeno OVA, donde reportan que la exposición a BPA genera un

aumento en el porcentaje de ThL y en la secreción de IFN- $\gamma$  (Ménard et al., 2014b). En un estudio realizado en ratones, donde se analizó el efecto de la exposición perinatal (día 9.5 de gestación y hasta el destete) a BPA con una dosis de 1mg/kg/día intraperitoneal, Holladay y cols., reportan que en las crías macho al llegar a la etapa adulta, en los nivel séricos, existe un incremento de G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y Rantes en comparación con el grupo control (Holladay et al., 2010). Igualmente, en esplenocitos obtenidos de los mismos animales y estimulados con Con-A, hay un aumento de G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, IL-17, IL-4, IL-6 y TNF- $\alpha$ , además de que en los sobrenadantes de los esplenocitos estimulados con LPS hay aumento de GM-CSF, IFN- $\gamma$  e IL-17, con lo cual concuerdan que existe un aumento en las citocinas Th1 con sesgo hacia una respuesta de tipo Th17 (Holladay et al., 2010).

Respecto a lo anterior, Luo y cols., reportan que la exposición perinatal (día 0 de gestación y hasta el día 21 neonatal) a BPA en ratones, a una concentración de 10, 100 o 1000 nM administrado en el agua de bebida, genera un aumento en la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ t de manera dosis-dependiente, además de generar un aumento en la producción de IL-17, IL-21; IL-6 e IL-23, citocinas típicas de una respuesta Th17 tanto en machos como en hembras (Luo et al., 2016) , como anteriormente se había reportado (Holladay et al., 2010).

En cuanto a los estudios donde se reporta que el BPA genera polarización hacia una respuesta Th2, Lee y Lim, en un estudio *in vitro*, utilizando un cultivo primario de linfocitos de ratón estimulado con BPA a una concentración de 50 $\mu$ M, reportan que los linfocitos aumentan la expresión de GATA-3, IL-4 e IL-10 y disminuye la de Tbet, lo que es un indicativo de que se genera una polarización hacia una respuesta Th2 (Lee and Lim, 2010). Similarmente, Lee y cols., indican que a la misma concentración de BPA aumenta la producción de IL-4 en LT activados provenientes de ganglios linfáticos de ratón (Lee et al., 2003). Tian y cols., reportan que el BPA a una concentración de 3 $\mu$ M genera un aumento en la producción de IL-4 por parte de células Th2 provenientes de ganglios linfáticos

mesentéricos (GLM) obtenidos de ratones infectados con *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) y estimuladas con antígenos del parásito (Tian et al., 2003). Del mismo modo, reportan que el BPA a una concentración de 3 y 10µM, generó un aumento en la producción de IL-4 en cultivos de esplenocitos provenientes de ratones infectados con *Leishmania major* (*L. major*) y estimulados con antígenos del parásito (Tian et al., 2003). Adicionalmente, Miao y cols., utilizando un esquema de exposición gestacional, reportan que la exposición a BPA a dosis de 40 y 400 µg/Kg/día y donde posteriormente se evaluó la respuesta inmunitaria en esplenocitos, genera que la expresión del ERα se encuentre disminuida en machos e incrementada en hembras mientras que la expresión de citocinas Th1 (IL-2, IL-12, IFN-γ y TNF-α) se encuentra disminuida tanto en machos como en hembras (Miao et al., 2008). Sawai y cols., en experimentos *ex vivo* realizados con ratones C57BL/6 de ambos sexos, que fueron expuestos a una dosis de 2.5µg/kg/día, vía oral por 7 días, a los que posteriormente se les obtuvieron los esplenocitos y se estimularon con Con-A, reportan que los machos expuestos a BPA producían en promedio un 40% menos de IFN-γ y las hembras un 28% menos en comparación con los controles (Sawai et al., 2003). En cuanto a las células T reguladoras (Tregs) Oshima y cols., reportan que la administración perinatal de BPA a una dosis de 1 ppm administrada en la dieta durante la gestación, y 3 dosis de 20mg/ratón a los 14, 16 y 18 días posnatal, genera una disminución en el número de células Tregs en esplenocitos provenientes de ratones macho (Ohshima et al., 2007).

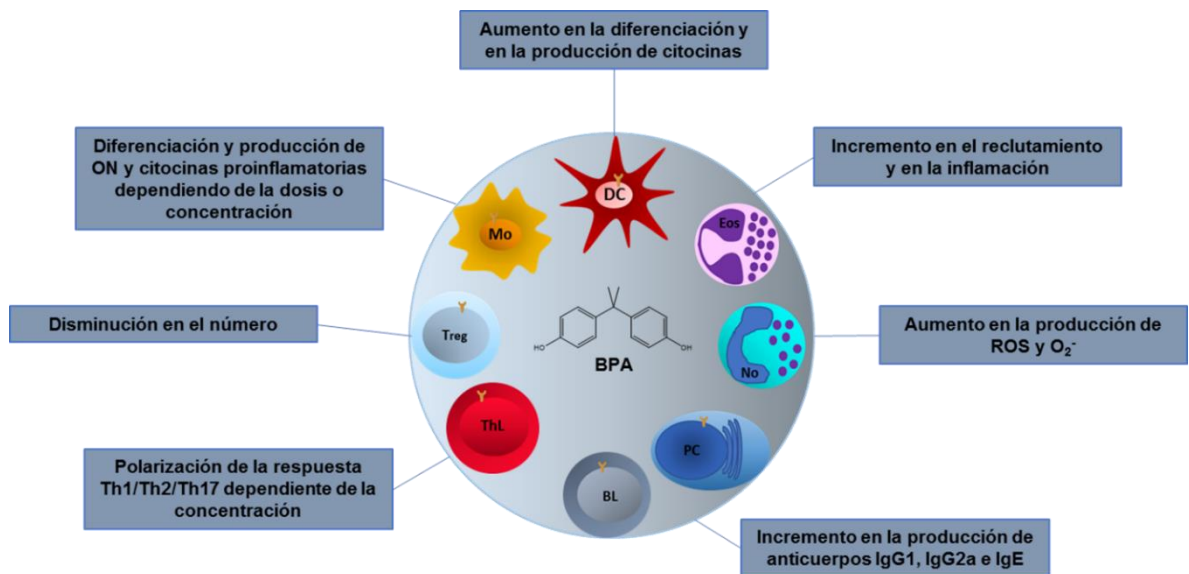
### **5.2.2 Linfocitos B y células plasmáticas**

Los LB son células cuya importancia radica en la inmunidad humoral, ya que son capaces de diferenciarse hacia células plasmáticas (PCs, por sus siglas en inglés), las cuales son las encargadas de la producción de anticuerpos como son la IgA, IgG, IgE, IgD e IgM. En distintos estudios se ha observado que el BPA puede estar modificando de manera distinta la producción de anticuerpos por parte de estas células.

Yoshino y cols., utilizando ratones adultos DBA/1J machos y hembras,

reportan que el BPA genera un aumento en la proliferación de esplenocitos, además de un aumento en la producción de anticuerpos de una forma dosis-dependiente: a 300µg/kg hay un aumento de IgG2 anti-HEL y a 3000µg/kg hay un aumento de IgG1 anti-HEL (Yoshino et al., 2003). Del mismo modo, en otro estudio reportan que la exposición gestacional (desde el día del apareamiento (día 0), hasta el día 17 de gestación) a dosis de BPA de 3000 µg/kg generó aumento en la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a, con predominio de anticuerpos IgG2a en las crías macho (Yoshino et al., 2004). Menard y cols. reportan que existe un aumento en los anticuerpos anti-OVA IgG durante la vida adulta, en las ratas hembra expuestas al BPA a una dosis de 5 y 50µg/kg/día perinatalmente (día 15 de gestación hasta el día 21 posnatal) (Ménard et al., 2014b). Alizadeh y cols., indican que la exposición a BPA a cuatro dosis de 0.1mg/g/ratón a partir del día 41 de edad cada segundo día, en ratones BALB/c hembras, genera menores títulos de anticuerpos IgE y mayores niveles de IgG2a (Alizadeh et al., 2006). De manera similar, Lee y cols., indican que existe un aumento de IgE en ratones BALB/c hembras expuestas al BPA durante la vida adulta a una dosis de 25mg/kg cada dos días por una semana (Lee et al., 2003). En otro estudio, utilizando ratonas jóvenes de la cepa NZB/NZW, que fueron expuestas al BPA a una dosis de 2.5µg/kg/día por 7 días, y que posteriormente en la vida adulta se les obtuvieron los esplenocitos y se estimularon con LPS, reportan que existe una disminución en la producción de IgG2a en los sobrenadantes del cultivo de esplenocitos (Sawai et al., 2003). Yurino y cols., utilizando ratonas BWF1 (modelo de lupus eritematoso sistémico), que fueron ovariectomizadas a las 4 semanas de edad, y que posteriormente se les colocaron implantes subcutáneos que contenían de 6 a 7mg de BPA por 4 meses, reportaron que la exposición a BPA genera un aumento en la producción de auto-anticuerpos IgM anti-RBC por parte de las células B1, así como en la expresión de ERα tanto *in vitro* como *in vivo* (Yurino et al., 2004). Goto y cols., administrando BPA en el agua de bebida a una concentración de 10mg/litro, por 2 semanas, en ratones machos y hembras con TCR transgénico reportan un aumento en la producción de IgG2a e IgA en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos provenientes de estos ratones

y estimulados con OVA (Goto et al., 2007). Midoro-Horiuti y cols., en ratones BALB/c, utilizando un modelo de asma, indican que la exposición perinatal (1 semana antes del apareamiento y hasta el día 21 posnatal) a BPA a una concentración de 10µg/ml en el agua de bebida, aumenta los niveles séricos de IgG anti-OVA (Midoro-Horiuti et al., 2010).



**Figura 3. Efectos del BPA sobre las células del sistema inmunitario.** Los efectos son muy variables dependiendo si son realizados *in vivo* o *in vitro*, de la especie animal utilizada, de la dosis, de la vía de administración y de la etapa del desarrollo en el que se administra. Mφ; Macrófagos, DC; Células Dendríticas, Eos; Eosinófilos, No; Neutrófilos, PC; Células Plasmáticas, BL; Linfocitos B, ThL; Linfocitos T cooperadores, Treg; Linfocitos T reguladores.

## 6. Efectos del BPA durante procesos infecciosos

Como se ha repasado, el BPA es capaz de modificar la respuesta inmunológica y esto a su vez, pudiera repercutir en el advenimiento de distintas enfermedades de origen infeccioso. Sin embargo, existe poca información acerca del efecto que pudiera tener este compuesto, ya sea ejerciendo su acción sobre las células de la respuesta inmunitaria encargadas de controlar y eliminar a un agente infeccioso, o interaccionando directamente sobre el patógeno, con lo cual se pudiera modificar la susceptibilidad a una infección.

Roy y cols., utilizando ratones C57BL/6, evaluaron el efecto de la exposición perinatal (día 6 de gestación hasta el día 21 posnatal) a BPA a una dosis de 50µg/kg/día, sobre la respuesta inmunitaria asociada a la infección por Influenza A durante la vida adulta. En su reporte se indica que la exposición perinatal al CDE no afecta la respuesta inmunitaria adaptativa específica contra el virus de la Influenza A a nivel pulmonar. Sin embargo, esta exposición reduce temporalmente el grado de inflamación pulmonar asociado a la infección, además de la expresión de genes antivirales (IFN-γ e iNOS) en el tejido pulmonar, con lo cual concluyen que la exposición perinatal a BPA modula la respuesta innata en la etapa adulta, pero no la respuesta adaptativa que es fundamental para la eliminación del virus de la influenza (Roy et al., 2012).

En una comunicación realizada por Sugita-Konishi y cols., en la que utilizaron ratonas BALB/c de 4 semanas de edad, y donde determinaron el efecto del BPA sobre la defensa no específica contra *Escherichia coli* (*E. coli*) no patogénica K12, se indica que la administración de BPA a una dosis de 5mg/kg administrado de manera subcutánea por 5 días, disminuyó la capacidad para eliminar a la bacteria a las 24hrs post-infección. Además, el BPA indujo la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal, pero redujo su capacidad fagocítica contra *E. coli* cepa K12. Este hecho, aunado a que también hubo una reducción en la población de Mφ y linfocitos (Sugita-Konishi et al., 2003). En el análisis de la cantidad de bacterias en la cavidad peritoneal se indica que existe una mayor cantidad de Unidades Formadoras de Colonias en los animales expuestos al BPA (Sugita-Konishi et al., 2003).

Yan y cols., evaluaron el efecto de la administración prenatal o en la etapa adulta de BPA sobre la respuesta inmunológica asociada a la infección con *L. major*. Para el esquema de administración en la etapa adulta, utilizaron machos de la cepa BALB/c que fueron inyectados subcutáneamente con dosis de BPA de 5.7, 11.4, 22.8 y 45.6 mg/kg una semana antes de la infección con *L. major*. En el esquema de administración perinatal se administró BPA en el agua de bebida a una concentración de 1, 10 y 100 nM, 2 semanas antes del apareamiento y después de

esto una semana más. Posteriormente, los machos de 10 semanas de edad se infectaron con *L. major* (Yan et al., 2008). Sus resultados indican que existe un aumento en la inflamación del cojinete plantar que es dependiente de la dosis después de la infección con *L. major*. Además, reportan una reducción en el número de células Tregs a nivel esplénico, tanto en los ratones que fueron expuestos al BPA prenatalmente o en la etapa adulta (Yan et al., 2008). Adicionalmente, indican que los animales expuestos en la etapa adulta tienen un aumento en la producción de IL-4, IL-10 e IL-13 después de la infección y en el caso de los animales expuestos prenatalmente existe un aumento en los niveles de IL-4 e IFN- $\gamma$  (Yan et al., 2008).

Tian y cols., reportan que la administración de BPA a una sola dosis de 228 $\mu$ g/ratón, en ratones macho adultos, dos horas después de la infección con *T. spiralis* y los cuales fueron sacrificados a los 42 días post-infección (dpi), genera un menor número de larvas musculares, lo cual es un indicativo de que el BPA en este caso, ocasiona una disminución en la susceptibilidad a la infección por *T. spiralis* (Tian et al., 2003).

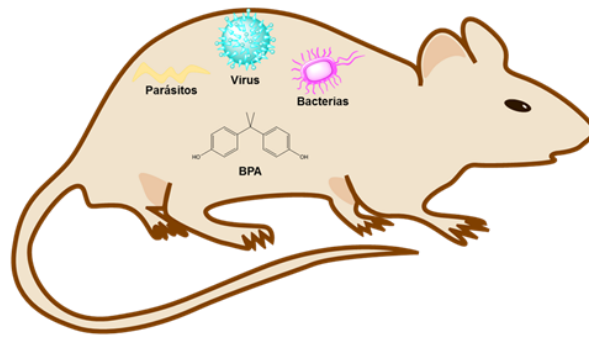
Ménard y cols., utilizando un modelo de administración perinatal (día 15 de gestación hasta el día 21 posnatal) de BPA en ratas, a una dosis de 5 $\mu$ g/kg/día en el agua de bebida e infectando con el parásito *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*), reportan un incremento en la susceptibilidad a la infección en las crías hembras jóvenes (25 días de edad) que fueron expuestas al BPA de manera perinatal (Ménard et al., 2014a).

En cuanto a los efectos directos que ejerce el BPA sobre los parásitos, Tan y cols., reportan que al exponer al nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) directamente a este compuesto, se reduce su esperanza de vida y acelera el proceso de envejecimiento mediante el incremento del estrés oxidativo mitocondrial y citosólico, así como por la generación de ROS (Tan et al., 2015). En otro reporte Mersha y cols., indican que la exposición de los embriones de *C. elegans* al BPA a concentraciones de 1 a 10 $\mu$ M disminuye la ovoposición de los parásitos durante la vida adulta (Mersha et al., 2015). Por otra parte, Zhou y cols., en un estudio



multigeneracional usando como modelo a *C. elegans*, reportan que los cambios en los efectos fisiológicos a lo largo de cuatro generaciones varían, dependiendo de las concentraciones de exposición (0.001-10 $\mu$ M). En la primera generación, los parásitos expuestos al BPA tuvieron un crecimiento menor, se movían más lentamente, y produjeron menor descendencia que los controles no expuestos al BPA (Zhou et al., 2016b). Además, también refieren que la exposición a largo plazo (10 días) genera toxicidad crónica, referida como una baja en los indicadores fisiológicos (tamaño corporal, contracciones de la cabeza, curvatura del cuerpo, vida media), aunado a una respuesta de estrés mayor y a una disminución en el tamaño de la población (Zhou et al., 2016a).

Respecto a los efectos del BPA sobre el parásito *T. canis* no existen reportes acerca de cómo se pudiera estar modificando la respuesta inmunitaria durante la infección.



Patógeno	Esquema de administración	Dosis	Efecto
Virus de la Influenza A	Perinatal (día 6 gestación-día 21 posnatal)	50µg/kg/día	Reducción temporal del grado de inflamación pulmonar
<i>Escherichia coli</i> K12	Prepuberal (4 semanas de edad)	5mg/kg/día x 5 días	Mayor cantidad de unidades formadoras de colonias
<i>Leishmania major</i>	Adulto	5.7, 11.4, 22.8 y 45.6 mg/kg una semana antes de la infección	Aumento en la susceptibilidad dosis-dependiente
<i>Leishmania major</i>	Perinatal (dos semanas antes del apareamiento y después de esto una semana más)	1, 10 y 100 nM	Aumento en la susceptibilidad dosis-dependiente
<i>Trichinella spiralis</i>	Adulto (2 horas después de la infección)	228µg/ratón	Disminución en la susceptibilidad
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Perinatal (día 15 de gestación-día 21 posnatal)	5µg/kg/día	Aumento en la susceptibilidad

**Figura 4. Efecto del BPA sobre la susceptibilidad a distintas infecciones.** En experimentos *in vivo*, el BPA puede ejercer sus efectos modulando la respuesta inmunitaria o puede actuar directamente sobre los patógenos.

## **7. *Toxocara canis* (*T. canis*)**

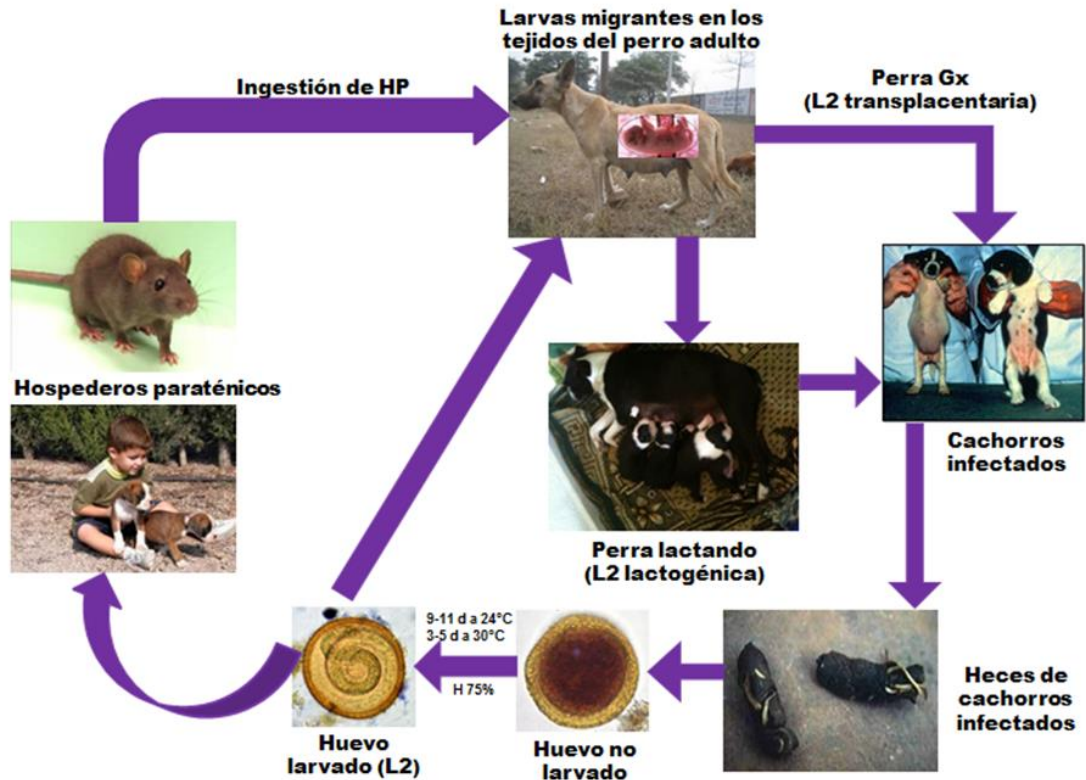
*T. canis* es el helminto causante de la Toxocariasis, enfermedad de importancia médico-veterinaria, por lo que se considera una zoonosis. Este parásito tiene como hospederos definitivos a los miembros de la familia Canidae (perros, lobos, zorros, coyotes) y como hospederos paraténicos a una gran cantidad de mamíferos (hombre, cerdos, ovejas, rata, ratón, entre otros), aves, algunos invertebrados como las lombrices y artrópodos como las pulgas. Esta helmintiasis es considerada una de las zoonosis con mayor distribución en el mundo, debido a la amplia convivencia que ha generado el hombre con perros y gatos domésticos (Despommier, 2003). A pesar de que la infección en sí en general no es mortal, se ha relacionado de manera directa con otras co-morbididades como el asma, las alergias, cáncer, obesidad, entre otras. Por lo que el conocimiento de los factores de riesgo para desarrollar la enfermedad se vuelve prioritario y muy importante.

### **7.1 Ciclo biológico**

La relación existente entre este parásito y sus hospederos es extremadamente compleja. El ciclo de vida (Figura 5) comienza con la eliminación de huevos no larvados en las heces de perros infectados y va a variar dependiendo del tipo de hospedero (definitivo o paraténico), de la edad del hospedero (cachorro o adulto), del sexo del hospedero paraténico (macho o hembra) y del estado fisiológico (gestante o no gestante). En condiciones normales, el desarrollo de la larva infectante, que es la larva de segundo estadio (L2), requiere de 9 a 11 días a 24°C y de 3 a 5 días a 30°C en presencia de oxígeno y humedad relativa del 75% (del Campillo and Vázquez Rojo, 2001).

En los cachorros el contagio en ellos puede ser por dos vías: transmisión materna (transplacentaria o lactogénica), o por la ingesta de huevos larvados (HL). La forma de infección más frecuente es la transplacentaria. Además, se ha observado que las hembras con larvas somáticas pueden infectar a sus cachorros durante varias gestaciones consecutivas (Soulsby, 1983). En el caso de perros

adultos, la infección también puede ocurrir por dos vías: por la depredación de hospederos paraténicos con larvas somáticas enquistadas; y/o por la ingesta de HL. Durante el 3/3 de la gestación, las larvas somáticas migran hacia el útero y glándula mamaria. Se ha mencionado que dicho proceso está relacionado con el aumento en la concentración de PRL en sangre (Overgaauw et al., 1998).



**Figura 5. Ciclo biológico de *T. canis*.** Desarrollo del huevo larvado infectante (L2), ingestión de huevos por parte de hospederos paraténicos (HP) (rata, humano, etc.) o definitivos (perros), ingestión de HP con larvas somáticas, transmisión de las L2 transplacentaria en hembras gestantes y lactogénica en hembras lactantes.

En hospederos paraténicos la infección es muy similar a la ocurrida en perros adultos, con la diferencia de que no existe desarrollo de parásitos adultos. Las larvas se establecen en los distintos órganos y tejidos donde entran en un estado de latencia y permanecen viables por largos periodos de tiempo esperando a ser ingeridas por un hospedero definitivo, de no ser ingeridas las larvas mueren y se calcifican.

## 7.2 Respuesta inmunitaria a larvas de *T. canis*

Durante la migración de las larvas dentro del hospedero las L2 de *T. canis* son reconocidas y rodeadas por células de la respuesta inmunitaria innata, como son neutrófilos y eosinófilos (Alba-Hurtado et al., 2000). Posteriormente, los antígenos de excreción y secreción parasitarios son reconocidos por células presentadoras de antígeno, las cuales presentan los antígenos a los linfocitos T y los estimulan a producir IL-4, la cual promueve una diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo tipo Th2, con producción de citocinas como la IL-5 e IL-13 (Allen and Maizels, 2011; Finkelman et al., 2004; Valli et al., 2010). La IL-5 es una citocina inductora de eosinofilia, la cual es característica de esta infección (Yamaguchi et al., 1988). Las características de esta eosinofilia, varían dependiendo el tipo de hospedero: en los ratones y los jerbos, se producen picos durante los primeros 40 días post-infección (Alba-Hurtado et al., 2009) mientras que en los seres humanos, hay una eosinofilia persistente hasta por un año (Beaver et al., 1952; Limaye et al., 1990). En el caso de los hospederos definitivos, la eosinofilia aparece a los 7 días post-infección y desaparece a los 42 (Zimmermann et al., 1985). En las crías con infección transplacentaria, se observa un pico de eosinófilos 7 días después del nacimiento, y disminuye lentamente, hasta que llega a niveles fisiológicos 42 días después del nacimiento (Vossmann and Stoye, 1986).

La eosinofilia puede ser inducida por pequeñas cantidades de larvas, y es dependiente de la IL-5. En modelos experimentales de la infección, se ha demostrado que la administración de anticuerpos anti-IL-5, suprime el aumento de eosinófilos en sangre (Limaye et al., 1990). También, se ha demostrado que los linfocitos Th2, son los principales productores de IL-5, ya que cuando se aplican anticuerpos anti-CD4 en modelos murinos, el segundo pico de eosinófilos timo-dependiente se reduce.

Además de estimular una respuesta Th2, en modelos murinos, se ha observado un aumento en los niveles plasmáticos de IFN- $\gamma$ , que es característico de una respuesta inmunitaria tipo Th1 (Pecinali et al., 2005). El IFN- $\gamma$ , actúa sobre

células NK, M $\phi$ , LT y LB, siendo el mediador de la inmunidad mediada por células. Se ha descrito una asociación entre el IFN- $\gamma$  y la IL-13, sobre todo en la formación de granulomas eosinofílicos, y en otras patologías como enfermedades producidas por patógenos (esquistosomiasis) o enfermedades autoinmunes (asma, colitis ulcerativa). Estos granulomas, también se presentan durante la infección crónica con larvas de *T. canis* en los distintos órganos y tejidos por los cuales realizan su migración (Meeusen and Balic, 2000; Nagy et al., 2012).

En modelos de infección con *T. canis*, al mismo tiempo que los procesos pro-inflamatorios se activan, los linfocitos Treg también se activan y comienzan a producir IL-10 (Torina et al., 2005). Esta citocina, se caracteriza por ser inmunosupresora y anti-inflamatoria, e inhibe la respuesta granulomatosa a las larvas del parásito. La IL-10, regula la inflamación y la fibrosis actuando directamente sobre los fibroblastos reduciendo la producción de colágeno (Arai et al., 2000; Moore et al., 2001). Este efecto inmunoregulador, es aparentemente el responsable del control de la respuesta inmunitaria exagerada en el hospedero cuando las larvas de *T. canis* migran a través del organismo. Del mismo modo, se ha demostrado que un elevado número de eosinófilos pueden causar la activación de células Treg induciendo con ello la producción de IL-10 (Nagy et al., 2012).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a que se ha reportado que una alteración en el sistema neuroendocrino durante un periodo crítico del desarrollo de un organismo, puede modificar permanentemente la respuesta del sistema inmunitario a todo tipo de estímulos antigénicos durante la etapa adulta, y a que también se ha documentado una constante exposición al BPA (una molécula con efectos endócrinos) desde el período prenatal y neonatal, además de que se han encontrado asociaciones entre la exposición a BPA y distintas enfermedades, es de nuestro interés evaluar los efectos que la administración perinatal del disruptor endócrino BPA ejerza sobre los principales componentes del sistema inmune encargados de controlar al parásito helminto *T. canis*, y por lo tanto la susceptibilidad del hospedero.

## **RELEVANCIA E IMPACTO**

La Toxocariasis es una enfermedad de importancia médico-veterinaria que desde hace mucho tiempo ha sido estudiada, principalmente en sus aspectos epidemiológicos y de desarrollo de nuevos fármacos, sin tomar en cuenta factores ambientales, como los compuestos disruptores endócrinos, a los cuales tanto los animales como el ser humano, estamos expuestos constantemente. Este hecho, aunado a la gran cantidad de perros callejeros existentes en nuestro país, hace que se vuelva fundamental el estudio de la relación entre factores ambientales y susceptibilidad a ciertas enfermedades que padecen los cánidos, y pueden ser transmitidas a los humanos, como es el caso de la Toxocariasis. En el caso de *T. canis*, no existen estudios que demuestren si factores ambientales (en este caso el BPA) pueden estar influyendo en la progresión de la enfermedad en su hospedero natural. Por lo anterior, este trabajo es pionero y fundamental para evaluar el efecto de este disruptor endócrino sobre el sistema inmunitario y la susceptibilidad a la Toxocariasis por *T. canis* en un hospedero paraténico. También servirá de manera muy importante a encontrar un nuevo factor de riesgo para desarrollar la infección que antes no se había contemplado.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Afecta la exposición perinatal al BPA, la susceptibilidad a la Toxocariasis por *T. canis* durante la etapa adulta, a través de la alteración de los mecanismos de inmunidad contra el parásito en la rata?

## **HIPÓTESIS**

La administración perinatal de BPA en la rata hembra, incrementará la susceptibilidad a la infección por *T. canis* durante la etapa adulta de las crías macho, a través de la disminución de la inmunidad innata y adaptativa contra el parásito.



## OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Determinar el efecto del tratamiento perinatal en la rata hembra con el disruptor endócrino Bisfenol A sobre la respuesta inmunitaria y la susceptibilidad de las crías macho a la Toxocariasis por *T. canis* durante la vida adulta.

### 2. Objetivos específicos

**En las ratas macho adultas expuestas de manera indirecta al BPA en la etapa perinatal:**

1. Analizar por digestión artificial las cargas parasitarias en hígado y pulmones.
2. Evaluar las lesiones macro y microscópicas en hígado y pulmones.
3. Estudiar por ensayo inmunoenzimático los niveles séricos de PRL.
4. Medir por Radioinmunoanálisis (RIA) los niveles séricos de Progesterona ( $P_4$ ).
5. Analizar por HPLC acoplado a espectrómetro de masas, los niveles de BPA en todos los grupos experimentales.
6. Medir por citometría de flujo en bazo, en ganglios linfáticos periféricos (GLP) y en ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) los porcentajes de las subpoblaciones celulares involucradas en el control y eliminación del parásito *T. canis* (linfocitos T totales (CD3+), linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD3+CD8+), linfocitos B (CD3-CD45RA+), células NK (CD161+), linfocitos  $T\gamma\delta$  (TCR $\gamma\delta$ +) y macrófagos (CD11b/c+).
7. Determinar por PCR tiempo real en el bazo el patrón de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .) y anti-inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13).
8. Determinar por ELISA los títulos de anticuerpos específicos anti- *T. canis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales de experimentación y alimentación

El estudio se llevó a cabo en la Ciudad de México, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), sede del circuito interior escolar de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se utilizaron ratas Wistar macho de ocho semanas de edad, hijos de hembras expuestas al BPA durante la gestación y la lactancia (ver punto 4). Las ratas son procedentes de una colonia existente en el IIB de la UNAM. Se ordenaron por grupos en cajas de policarbonato (50cm largo x 23cm de ancho y 21 cm de altura) con base en los siguientes grupos de trabajo:

- a) Ratitas macho crías de animales sin tratamiento (no expuestas al BPA) (S/Trat-Ctrl).
- b) Ratitas macho crías de animales vehículo (no expuestas al BPA) (Vhc-Ctrl).
- c) Ratitas macho crías de animales expuestos al BPA (BPA-Ctrl).
- d) Ratitas macho infectadas crías de animales sin tratamiento (no expuestas al BPA) (S/Trat-Infx).
- e) Ratitas macho infectadas crías de animales vehículo (no expuestas al BPA) (Vhc-Infx).
- f) Ratitas macho infectadas crías de animales expuestos al BPA (BPA-Infx).

Los animales se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz/obscuridad. Las camas proporcionadas fueron de aserrín estéril con cambios cada tercer día. Con el fin de cubrir los requerimientos de crecimiento y mantenimiento el alimento se ofreció *ad libitum* en condiciones estériles y el agua se suministró en envases de vidrio estériles *ad libitum*. El alimento posee una composición química de: proteína

cruda 19%, grasa cruda 9%min, fibra cruda 5%max (Harlan 2019S Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet Sterilizable).

Se contó con el permiso del Comité para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IIB, Folio ID: 192. Este permiso asegura que todos los experimentos con animales cumplan los requisitos internacionales para el cuidado y uso de los mismos en el laboratorio, y que estos sean mantenidos y sacrificados de manera humanitaria durante los experimentos.

## **2. Sincronización y determinación de la gestación en las ratas**

Para la sincronización se colocaron las ratas hembras en presencia de un macho con una rejilla de separación durante 72 horas (efecto macho). Posteriormente, el macho se juntó con las hembras y se realizaron frotis vaginales diariamente por las mañanas. El día de gestación uno se tomó como el día en el cual hubo presencia de espermatozoides en el frotis vaginal.

## **3. Administración perinatal del vehículo o BPA**

La administración del vehículo o BPA se realizó en las hembras gestantes empezando el día 5 de gestación y posterior al parto durante toda la lactancia (21 días), mediante el agua de beber, en bebederos de vidrio a una dosis de 250 µg/kg/día.

## **4. Obtención y procesamiento de los huevos de *T. canis***

Los huevos del parásito se obtuvieron a partir de parásitos adultos de perros callejeros donados por el Centro de Control Canino (CENCOCAN) de Cuautitlán, Estado de México. Los gusanos hembras se separaron de los machos, se enjuagaron con agua corriente y se colocaron en buffer de fosfatos salino (PBS) 1x. Posteriormente se obtuvieron los úteros haciendo una incisión al final del primer tercio del cuerpo. Los úteros se colocaron en solución salina fisiológica (SSF), se obtuvieron los huevos y con un colador de poro fino se eliminaron los restos del parásito. Los huevos se sometieron a varios lavados con PBS 1x centrifugando a

2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min. Los huevos sedimentados se resuspendieron en solución PBS-formaldehído al 2% y se incubaron a 27°C por 28 días para la obtención de la forma infectiva (HL). Al finalizar se verificó la viabilidad mediante la observación al microscopio de larvas móviles dentro del huevo.

La determinación de la viabilidad se realizó de la siguiente manera por triplicado: se colocaron 20µl en un portaobjetos y se contó al microscopio el número de huevos con una larva móvil en su interior, se sumaron, se sacó el promedio y se multiplicó por 50 para obtener el número de huevos viables por ml de cultivo.

### **5. Infección de las ratas**

Antes de realizar la infección, se realizaron 3 lavados del inóculo para retirar la solución PBS-formaldehído. Al finalizar los huevos quedaron resuspendidos en SSF y se concentraron a 1000 HL por ml. La infección de las ratas se realizó intragástricamente con una sonda metálica tipo Foley a las 8 semanas de edad, inoculando una concentración de 1000 HL/ml/rata. Las ratas se sacrificaron a los 7 dpi mediante sobredosis de anestesia con sevoflurano (Sevorane®).

### **6. Toma y procesamiento de las muestras**

Después del sacrificio se obtuvo una muestra sanguínea en tubos BD Vacutainer® SST™ con gel separador, para la determinación de niveles séricos de BPA, P<sub>4</sub>, PRL y para la medición de los títulos de anticuerpos específicos anti-*T. canis*. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm/10 min para separar el suero, el cual posteriormente se depositó en alícuotas y se mantuvo a -70°C hasta su análisis. Los GLM, los GLP y la mitad del bazo se utilizan para estudiar mediante citometría de flujo como se encuentran las subpoblaciones celulares del sistema inmunitario. La otra mitad del bazo se procesó para la determinación de citocinas por PCR en tiempo real. El hígado y los pulmones se obtuvieron para analizar las cargas parasitarias por medio de digestión artificial con pepsina y ácido clorhídrico al 1%.

### **7. Digestión artificial y conteo de parásitos**

Al momento del sacrificio, el hígado y los pulmones se maceraron, se tomó 1gr de tejido y se sometió a digestión artificial en 10 ml de una solución de pepsina

(SIGMA®) y ácido clorhídrico al 1% por 24 horas. Pasadas las 24 horas, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se agregó 1ml de paraformaldehído al 4%. Para el conteo de parásitos se realizaron 10 conteos por muestra de 20µl cada uno, el total de larvas contadas se multiplicó por 50 para obtener el número de larvas por mililitro y a su vez el número de larvas por gramo de tejido, este número se multiplicó por el peso total del órgano y se obtuvo el número de larvas totales.

## **8. Procesamiento de órganos para histología**

### **8.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E)**

Se tomaron porciones de pulmón e hígado de aproximadamente 2 cm, los órganos fueron lavados con PBS 1x y posteriormente fueron perfundidos con PBS1x-Paraformaldehído 4% amortiguado a un pH de 7.4 durante 24 horas. Después de esto, los tejidos se deshidrataron en un tren de alcoholes del 30%, 50%, 60%, 70% 80%, 90%, 96%, alcohol absoluto, y fueron aclarados en xilol. Posteriormente se mantuvieron en parafina durante al menos 24 horas antes de ser colocados en el anillo de inclusión con parafina.

Los cortes histológicos se realizaron con navajas de bajo perfil en el micrótopo a 4 micras, se montaron en laminillas previamente tratadas con alcohol-ácido y una solución de poli-lisina 1:10. Se desparafinaron en la estufa a 60°C y se procesaron en un tren con los reactivos para la tinción con hematoxilina-eosina: xilol, alcohol absoluto, alcohol al 70%, 50%, 30%, agua destilada, hematoxilina, agua corriente, hidróxido de amonio al 0.5%, agua corriente, eosina, alcohol al 30%, 50%, 70%, alcohol absoluto y xilol, se fijaron con resina. Se observaron al microscopio a un aumento de 10, 20 y 40X.

## **9. Medición de los niveles de BPA, P<sub>4</sub> y PRL en suero.**

La medición de los niveles séricos de BPA se realizó mediante la técnica de HPLC acoplado a espectrómetro de masas, en colaboración con el Dr. Manuel Iván

Girón Pérez, investigador del Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología de la Universidad Autónoma de Nayarit.

Los niveles de P<sub>4</sub> se determinaron por radioinmunoanálisis (RIA) en el departamento de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Finalmente, los niveles de PRL se analizaron con el kit comercial Prolactin rat ELISA (ALPCO®), siguiendo las especificaciones del fabricante.

### **10. Ensayos de citometría de flujo**

Los bazos, los GLP y los GLM obtenidos al momento del sacrificio se disgregaron con una malla de nylon de 70µm estéril y un émbolo de jeringa en PBS 1x amortiguado a pH 7.4. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1200 rpm durante 3 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500µl de buffer de lisis de eritrocitos (sólo para el bazo) y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente, después se les agregó 700µl de buffer de FACS y se centrifugaron nuevamente a 1200 rpm durante 3 min. Se decantaron y resuspendieron nuevamente en 500µl de buffer de FACS para finalmente tomar 25 µl de cada muestra para la tinción.

Se colocaron 25µl de muestra por pozo más 25µl de paraformaldehído al 4% en placas de poliestireno de 96 pozos con fondo en "U" (Costar®) y se dejaron incubar por 10 min a 37°C, después se centrifugó a 1000 rpm por 5 min, se decantó y se agregaron 200 µl de buffer de FACS para lavar y quitar los restos de paraformaldehído. Se volvió a centrifugar a 1200 rpm y se decantó, posteriormente se agregaron 150µl de metanol absoluto y se incubó durante 10 min a 4°C. Después se centrifuga nuevamente a 2000 rpm por 3 min y se decanta para proceder a agregar 200µl de buffer de FACS, volver a centrifugar (2000 rpm por 3 min) y decantar. Posteriormente se procedió a añadir 150µl de los anticuerpos primarios en los pozos correspondientes, estos se dividieron en 3 tinciones (T1, T2, T3) y se incubaron por 10 min a 4°C.

- a) T1: CD3-Alexa 488, CD4-PE/Cy5, CD8-PE
- b) T2: CD3-Alexa 488, CD45RA-PE, CD11b/c-biotina
- c) T3: CD161-AF647, TCR $\gamma\delta$ -PE

Después de la incubación se agregaron 150 $\mu$ l de buffer de FACS, se centrifugó (2000 rpm por 3 min) y se decantó para luego agregar 25 $\mu$ l del anticuerpo secundario (estreptavidina-PE/Cy5) a la T2. Se volvieron a añadir 150 $\mu$ l de buffer de FACS y la placa se centrifugó y decantó. Para finalizar, se resuspendió en 200 $\mu$ l de Buffer de FACS y se almacenó a 4°C en oscuridad total.

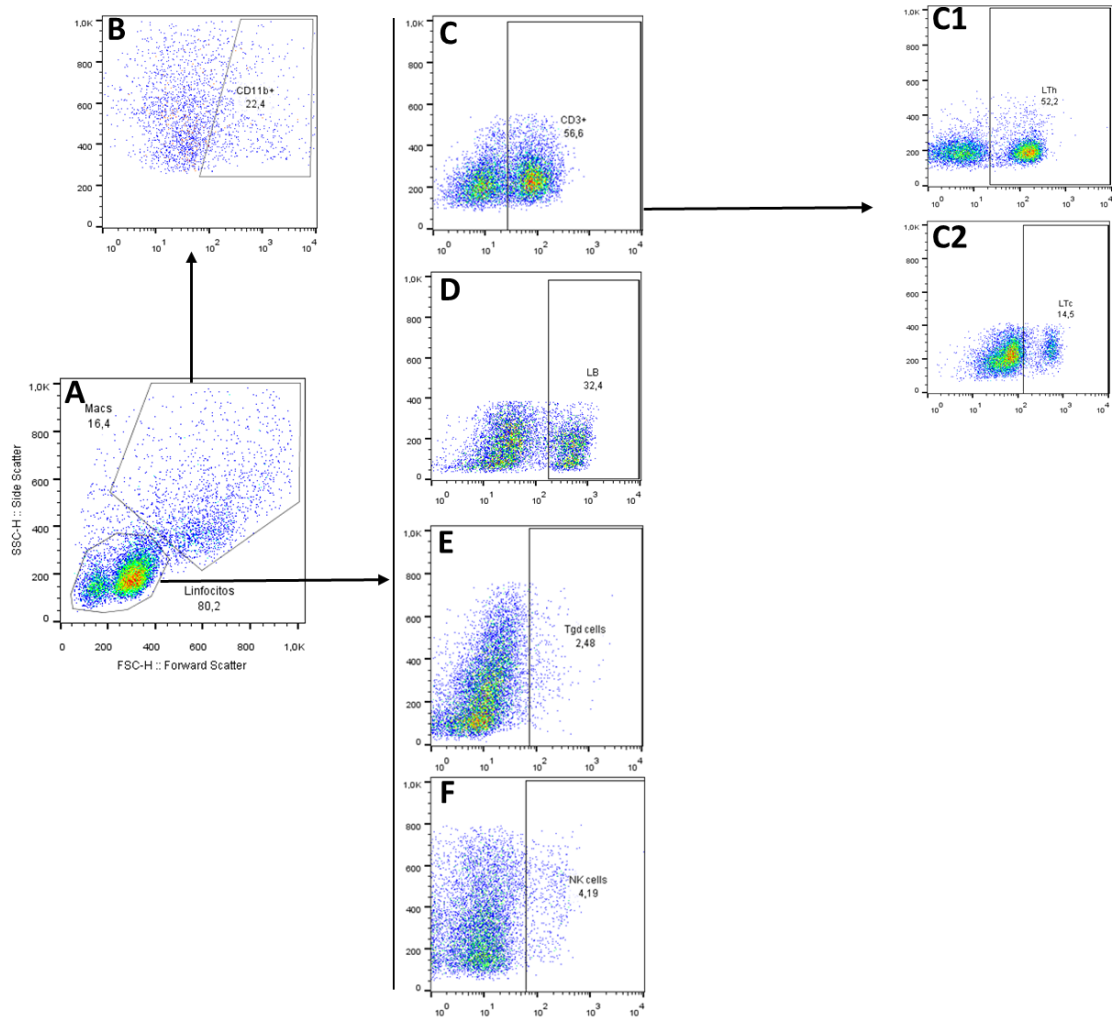
La selección de linfocitos y M $\phi$  se realizó con base en su morfología (tamaño y complejidad) con los parámetros SSC-H y FSC-H (Figura 6A).

Para seleccionar la región de los M $\phi$  se tomó en cuenta que son células de mayor tamaño y complejidad. Dentro de esta región se seleccionó el canal de fluorescencia donde se puede apreciar el fluoróforo PE/Cy5, que es el que se utilizó unido a la estreptavidina para reconocer al CD11b/c biotinilado (Figura 6B).

En el caso de los linfocitos, primeramente, se seleccionó la región de células de menor tamaño y complejidad. Dentro de ella se seleccionó el canal de fluorescencia correspondiente a Alexa488, que fue el que se usó para teñir a los LT totales (CD3) (Figura 6C). Dentro de la región de LT totales, se seleccionaron los canales de fluorescencia correspondientes a los fluorocromos PE/Cy5 y PE, con los que se tiñeron los correceptores CD4 y CD8, correspondientes a los ThL y TcL respectivamente (Figura 6C1,2). Para los LB, se seleccionó el canal de fluorescencia para el fluorocromo PE (T2) el cual se encontraba acoplado al marcador CD45RA (Figura 6D). En los linfocitos T $\gamma\delta$  (T $\gamma\delta$ L, por sus siglas en inglés), se seleccionó el canal de fluorescencia para el fluorocromo PE (T3) el cual estaba acoplado al TCR $\gamma\delta$  (Figura 6E).

Finalmente, para las células NK se ocupó un área similar a la de los linfocitos, pero abarcando una región mayor en cuanto a tamaño y complejidad. Dentro de esta área se seleccionó el canal de fluorescencia para AF647 el cual estaba

acoplado a la molécula CD161, que es un marcador característico de esta población (Figura 6F). Para el análisis e interpretación de resultados se utilizó el programa FlowJo versión 10.0.



**Figura 6. Dot plots representativos de la selección de las subpoblaciones celulares de interés para el análisis de citometría de flujo.** A) Selección de poblaciones con base en su tamaño y complejidad, B) Selección de M $\phi$ , C) Selección de LT totales, C1) Selección de ThL, C2) Selección de TcL, D) Selección de LB, E) Selección de T $\gamma\delta$ L, F) Selección de células NK. Los datos fueron analizados con el programa FlowJo V10.0.



## 11. PCR tiempo real para la determinación de citocinas en bazo

La determinación de los niveles de expresión de ARNm de los genes de las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ,) y anti-inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) se realizó por PCR- cuantitativo en tiempo real.

Las muestras de tejido esplénico se congelaron en el reactivo TRIzol<sup>®</sup> (Ambion, ARN, Carlsband CA), al momento del sacrificio. El ácido ribonucleico (ARN) total se extrajo con el mismo reactivo, siguiendo el protocolo del fabricante. Primeramente, las muestras se transfirieron a tubos de vidrio estériles que contenían 500 $\mu$ l de TRIzol<sup>®</sup> y se procedió a hacer el homogenizado de las muestras en el Polytron (todo esto se realizó a 4<sup>o</sup>C). Posteriormente, el homogenizado se transfirió a un tubo nuevo al que se le adicionaron 200 $\mu$ l de fenol-cloroformo y 200 $\mu$ l de agua con Dietilpirocarbonato (H<sub>2</sub>O DEPC), se agitó por 30 segundos y se centrifugó a 13,000rpm por 15 min a 4<sup>o</sup>C. Se recuperó la fase acuosa (contiene el ARN) y se transfirió a un tubo nuevo.

Se agregaron 200 $\mu$ l de cloroformo frío por cada mililitro de fase acuosa recuperado, se agitó la muestra nuevamente y se centrifugó a 13,000rpm por 15 min a 4<sup>o</sup>C. Nuevamente se recuperó la fase acuosa, y se transfirió a un tubo nuevo, a donde se le agregó isopropanol frío en una relación 1:1. Se agitó por inversión y se dejó a 4<sup>o</sup>C toda la noche para que se llevara a cabo la precipitación del ARN.

Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 13,000rpm por 15 min a 4<sup>o</sup>C, se decantó el sobrenadante siendo muy cuidadoso en no desprender el “pellet”, y este se lavó con 1ml de etanol (EtOH) al 75% frío. Se agitó la muestra hasta lograr desprender el pellet, y posteriormente se centrifugó a 13,000rpm por 15 min a 4<sup>o</sup>C. Nuevamente se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 13,000rpm por 1 minuto a 4<sup>o</sup>C, para poder quitar el EtOH restante con una pipeta.

Posteriormente se dejó secar el pellet a temperatura ambiente hasta que tomara un color traslucido y después se resuspendieron en 30 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC, se tomaron 7 $\mu$ l para hacer la cuantificación del ARN, y el gel de integridad. La concentración de ARN se determinó mediante absorbancia a 260 nm, y la integridad

se verificó después de la electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras de ARN total, se transcribieron inmediatamente de forma inversa, usando la enzima transcriptasa reversa MMLV-RT (Promega, Madison WI) para obtener el ADN complementario (ADNc) a una concentración de 5µg/µl. Para determinar los niveles de ARNm por PCR en tiempo real, se realizaron ensayos fluorogénicos utilizando el reactivo LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). La fluorescencia fue detectada en el equipo LightCycler 480 Instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany, Operator´s Manual Software Version 1.5).

El nivel de expresión para cada gen, se determinó por triplicado usando 113 ng del ADNc y el par de oligos para cada gen en placas de 96 pozos Ópticos LightCycler 480 Multiwell Plates 96/384 clear (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), utilizando 18s y ciclofilina como controles constitutivos. La secuencia de los oligos sense y antisense que fueron utilizados se presentan en la tabla 1.

El esquema de amplificación de PCR utilizado fue de 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, y 45 ciclos de 94 °C durante 15 segundos seguido por 60 °C durante 1 min. La expresión relativa se evaluó en comparación con los genes de referencia 18s y ciclofilina, basado en la siguiente ecuación:

$$\frac{(E \text{ gen de interés})^{CT1(CTRL-X)}}{CT2(CTRL-X)} \sqrt{(E \text{ gen constitutivo1})^{CT2(CTRL-X)} * (E \text{ gen constitutivo2})^{CT2(CTRL-X)}}$$

<b>Gen</b>	<b>Oligo sense</b>	<b>Oligo antisense</b>
IL-1 $\beta$	TGCCCGTGGAGCTTCCAGGAT	CCAGCTGCAGGGTGGGTGTG
IL-6	CACTTCACAAGTCGGAGGCT	AGCACACTAGGTTTGCCGAG
TNF- $\alpha$	TCCAGGCGGTGTCTGTGCCT	TCGGGGCAGCCTTGTCCCTT
IFN- $\gamma$	ACGCCGCGTCTTGGTTTTGC	TCAGCACCGACTCCTTTTCCGC
IL-4	TCCACGGATGTAACGACAGC	TCATTCACGGTGCAGCTTCT
IL-5	GAGCAATGAGACGATGAGGCT	CTCATCACGCCAAGGAACTCT
IL-9	TGCCAACGTGACCAGCTGCT	GCCTGCTGTGGTCTGGTTGCACG
IL-13	TATCGAGGAGCTGAGCAACATCA	ATAAACTGGGCTACTTCGAT

**Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en el experimento.**

## **12. Determinación de anticuerpos anti-*T. canis***

### **12.1 Producción de antígenos se excreción y secreción de *T. canis* (Ag-ESTc)**

Para la producción de Ag-ESTc, se cultivaron larvas en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) estéril y se colectó el sobrenadante de las cajas de cultivo cada 7 días por medio de aspiración. Este proceso se realizó semanalmente hasta obtener una cantidad considerable de sobrenadante, el cual, posteriormente se concentró por medio de un equipo de filtración (AMICON) con una membrana de 10000 Da. Al terminar de realizar la filtración de los sobrenadantes, se determinó la concentración final de los antígenos mediante la técnica de Bradford (1976).

### **12.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Se prepararon diluciones en PBS 1x de los Ag-ESTc que se mezclaron con reactivo de Bradford. La concentración de proteína se determinó comparando la densidad óptica (D.O) de la muestra en una curva patrón realizada con Albúmina sérica bovina (BSA de SIGMA). Las concentraciones preparadas fueron; 10, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu$ g/ml. La concentración de antígenos totales obtenidas en la prueba fue de 282.65 $\mu$ g/ml.

### **12.3 Electroforesis de Ag-ESTc obtenidos a partir de medios de cultivo de L2 de *T. canis***

Los Ag-ESTc se separaron por electroforesis utilizando SDS-PAGE en sistema discontinuo (gel concentrador al 4% y gel separador al 12%). Se utilizó la cámara para electroforesis Mini-Protean II Electrophoresis cell (Bio-Rad Labs). Las muestras se mezclaron con buffer reductor de Laemmli en una relación 1:1 y se sometieron a baño maría durante 2 min. De esta mezcla se colocaron 4.5µg por pozo. Las constantes del corrimiento fueron 150 voltios y 120 miliamperes para el gel concentrador y 150 voltios y 80 miliamperes para el gel separador. Todo el corrimiento se realizó en cámara fría y las proteínas en el gel fueron visualizadas con la tinción de azul de Comassie.

### **12.4 ELISA para la determinación de IgG anti-*T. canis***

Para la determinación de anticuerpos específicos, se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Maxisorp, NUNC Labs) sensibilizadas con 1µg/ml de Ag-ESTc durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces con PBS1x-Tween 20 al 0.01%, se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% y se conservaron a 4°C por 24 horas. Pasado el tiempo del bloqueo, se realizaron tres lavados PBS-Tween 20 al 0.01% y se almacenaron a 4°C. Para cada muestra, se utilizaron por duplicado 50µl por pozo en una dilución 1:200 del suero con PBS 1X, y se incubaron a 37°C por dos horas. Pasadas las dos horas, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0.01%, y a cada pozo se le adicionaron 50µl de conjugado IgG de rata (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)) a una dilución de 1: 1,000 y se colocaron en incubación a 37°C por una hora. Las placas se lavaron 5 veces con la misma solución (PBS-Tween 20 al 0.01%) y el desarrollo del color se realizó con o-fenilendiamina (OPD) al 0.05% y peróxido de hidrógeno al 0.001% en solución reguladora de citratos. Las placas se incubaron por 15 min en oscuridad total a 37°C y posteriormente se adicionaron 50µl por pozo de ácido ortofosfórico al 0.06%. La lectura de las placas

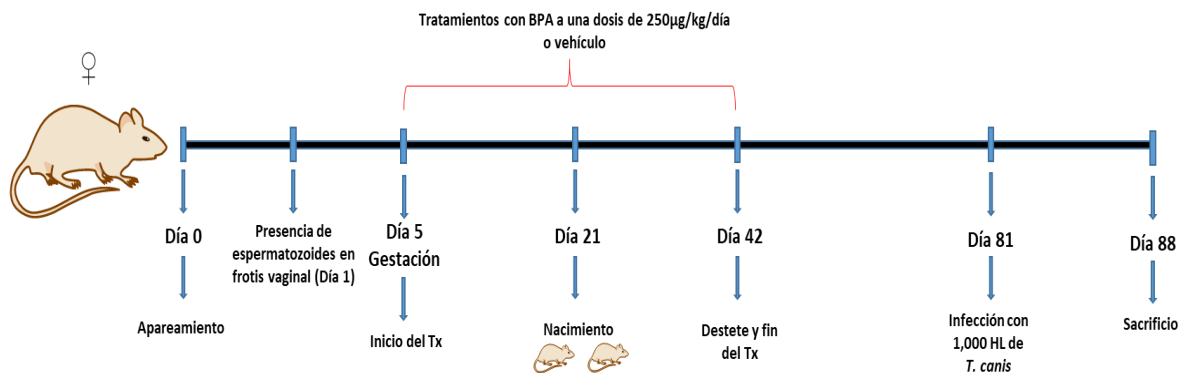
se realizó a 492 nm con 15 segundos de agitación en el lector de ELISA (Stat Facs 4200).

### 13. Análisis estadístico

Los resultados se muestran en gráficas de columnas de barras donde se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar (DE). Se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de dos factores (2-way ANOVA) y una comparación múltiple de Bonferroni para ver si existe efecto de la infección o de los distintos tratamientos. Se consideró diferencia significativa cuando  $P < 0.05$ ; se utilizó el programa GraphPad Prism versión 7.0.

### 14. Resumen del diseño experimental

La secuencia de actividades para la realización del presente trabajo se presenta en la figura 7. La determinación de los niveles de BPA, P<sub>4</sub>, PRL e IgG específica se realizó mediante el uso del suero obtenido al momento del sacrificio. La mitad del bazo, los GLM y los GLP se procesaron para realizar citometría de flujo. La otra mitad del bazo se ocupó para realizar PCR tiempo real de citocinas Th1/Th2. Los pulmones y el hígado se utilizaron para el conteo de larvas y técnicas histológicas.

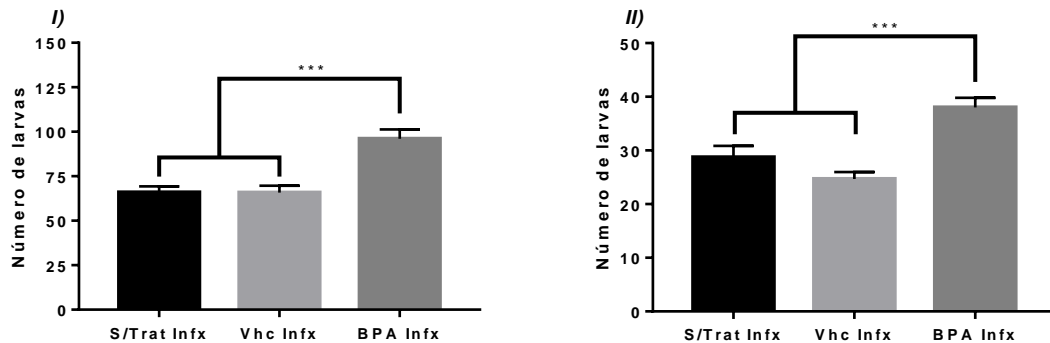


**Figura 7. Metodología experimental para la obtención de los distintos órganos y tejidos utilizados para la realización del experimento.**

## RESULTADOS

### 1. Número de larvas en pulmones e hígado

Para observar el efecto de la administración perinatal de BPA sobre la susceptibilidad a la infección, se determinaron las cargas parasitarias en pulmón e hígado (Figura 8). Los animales expuestos a BPA de manera perinatal tuvieron un aumento en la susceptibilidad a la infección por el parásito *T. canis*, lo cual se ve reflejado en un mayor número de larvas tanto a nivel pulmonar (31% más larvas) ( $P<0.001$ ) (Figura 8 I) como hepático (24% más larvas) en comparación con el grupo S/Trat ( $P<0.001$ ) (Figura 8 II).

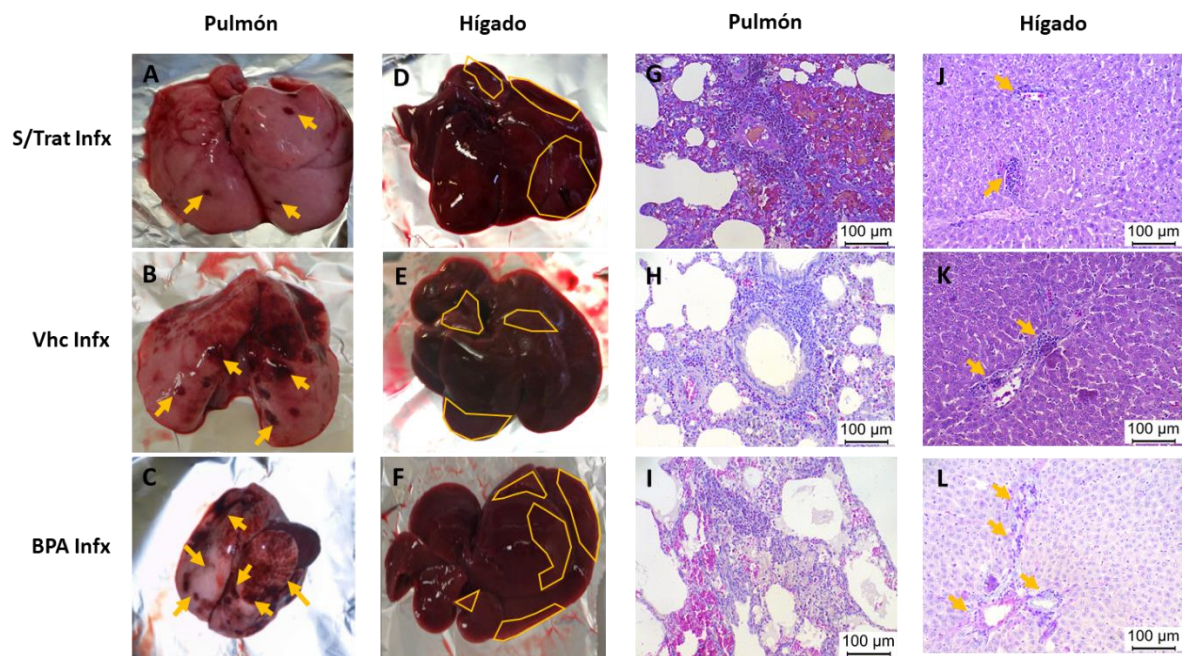


**Figura 8. Número de larvas en pulmón e hígado de ratas macho expuestas al BPA de manera perinatal e infectadas con *T. canis*.** I) Número de larvas en pulmón, II) Número de larvas en hígado. Los datos representan la media  $\pm$  DE. \*\*\* $P<0.001$ . S/Trat-Infx; ratas sin tratamiento infectadas ( $n=7$ ), Vhc-infx; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal infectadas ( $n= 6$ ), BPA-infx; ratas expuestas al BPA de manera perinatal infectadas ( $n= 5$ ).

### 2. Lesiones macro y microscópicas en pulmones e hígado

La cantidad de las lesiones macroscópicas en pulmones (Figura 9A-C) e hígado (Figura 9D-E) son mayores y más extensas en los animales que fueron expuestos al BPA perinatalmente. Este hallazgo concuerda con un mayor número de larvas recuperadas en estos órganos. Además, se observa una distribución diferencial en las lesiones, siendo mayores a nivel pulmonar que a nivel hepático.

En el pulmón, a nivel microscópico se observan zonas internas peribronquiales y perivasculares de necrosis con acúmulos de células inflamatorias, con una composición mayormente de células mononucleares, neutrófilos y eosinófilos en el intersticio alveolar. Algunos presentan una estructura para integrar un proceso granulomatoso, otras poseen una estructura irregular (Figura 9G-I). A nivel hepático, se observan pequeños focos de infiltrado inflamatorio a nivel perivascular y periportal, siendo de mayor tamaño y extensión las encontradas en las ratas expuestas al BPA, comparadas contra el grupo S/Trat (Figura 9J-L).

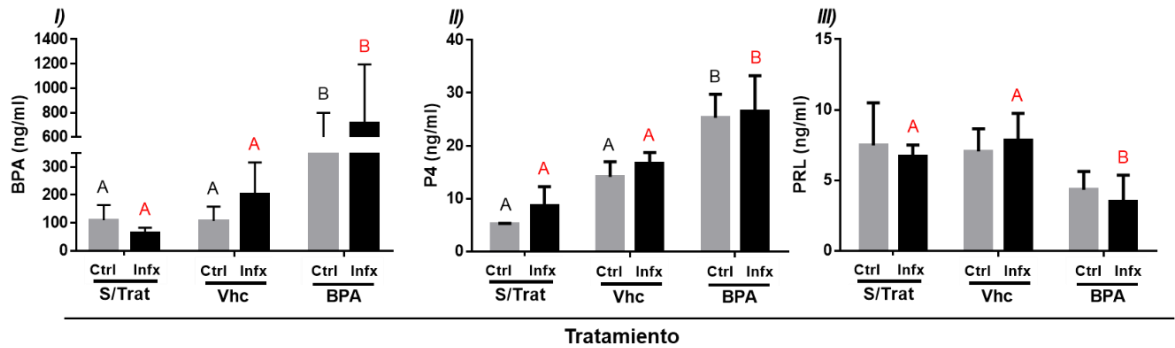


**Figura 9. Lesiones macro y microscópicas en pulmón e hígado de ratas macho expuestas al BPA de manera perinatal e infectadas con *T. canis*.** A) Pulmón ratas S/Trat-Infx, B) Pulmón ratas Vhc-Infx, C) Pulmón ratas BPA-infx. Las flechas señalan lesiones hemorrágicas a nivel pulmonar. D) Hígado ratas S/Trat-Infx, E) Hígado ratas Vhc-Infx, F) Hígado ratas BPA-Infx. Las zonas de daño se delimitan con color amarillo. G) Lesiones microscópicas en pulmón de ratas S/Trat-Infx, 20X, H) Lesiones microscópicas en pulmón de ratas Vhc-Infx, 20X, I) Lesiones microscópicas en pulmón de ratas BPA-Infx, 20X, J) Lesiones microscópicas en hígado de ratas S/Trat-Infx, 20X, K) Lesiones microscópicas en hígado de ratas Vhc-Infx, 20X, L) Lesiones microscópicas en hígado de ratas BP-Infx, 20X. Las flechas señalan presencia de infiltrado inflamatorio. S/Trat-Infx; ratas sin tratamiento infectadas ( $n=7$ ), Vhc-Infx; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal infectadas ( $n=6$ ), BPA-Infx; ratas expuestas al BPA de manera perinatal infectadas ( $n=5$ ).

### 3. Niveles de BPA, P<sub>4</sub> y PRL en suero

Debido a que el BPA es considerado un CDE con carácter estrogénico, se evaluaron los niveles de hormonas con efecto inmunomodulador y cuyos niveles se ven influenciados por el E<sub>2</sub>. En la figura 10, se observan los niveles séricos de BPA (Figura 10 I), P<sub>4</sub> (Figura 10 II) y PRL (Figura 10 III). En los animales expuestos al BPA de manera perinatal, existe un aumento en los niveles de P<sub>4</sub> en comparación con los grupos S/Trat (P<0.05) (Figura 10 II). Por otra parte, solo en los animales infectados expuestos al BPA perinatalmente existe una disminución en los niveles de PRL (P<0.05) (Figura 10 III).

Lo anterior es un indicativo de que el BPA puede estar alterando la secreción de otras hormonas que poseen un importante potencial inmunomodulador.



**Figura 10. Niveles de Bisfenol A (BPA), Progesterona (P<sub>4</sub>) y Prolactina (PRL) en ratos macho expuestas al BPA de manera perinatal e infectadas con *T. canis*.** I) BPA, II) P<sub>4</sub> y III) PRL. Los datos representan la media  $\pm$  DE. Las letras (A-B) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (Vhc o BPA) (P<0.05). S/Trat Ctrl; ratos sin tratamiento control (n=6), S/Trat Infx; ratos sin tratamiento infectadas (n=7), Vhc Ctrl; ratos expuestas al vehículo de manera perinatal control (n=6), Vhc Infx; ratos expuestas al vehículo de manera perinatal infectadas (n=6), BPA Ctrl; ratos expuestas al BPA de manera perinatal control (n=5), BPA Infx; ratos expuestas al BPA de manera perinatal infectadas (n=5).



#### 4. Subpoblaciones celulares del sistema inmune

Con la finalidad de determinar el efecto de la administración perinatal de BPA sobre el sistema inmunitario, se evaluaron las principales células encargadas de montar la respuesta inmunitaria contra el parásito *T. canis*; M $\phi$  (CD11b/c), células NK (CD161+), LT $\gamma\delta$  (TCR $\gamma\delta$ +), LT totales (CD3+), LT cooperadores (CD3+/CD4+), LT citotóxicos (CD3+/CD8+) y LB (CD45RA+) en bazo, GLP y GLM en los distintos grupos experimentales. Las diferencias estadísticas debidas a la infección se muestran con \* y las diferencias estadísticas debidas a los tratamientos con letras (A-B).

##### 4.1 Células de la inmunidad innata

En la figura 11 se muestran los porcentajes de las células de la inmunidad innata analizadas (M $\phi$ , NK y LT $\gamma\delta$ ) en bazo, GLP y GLM.

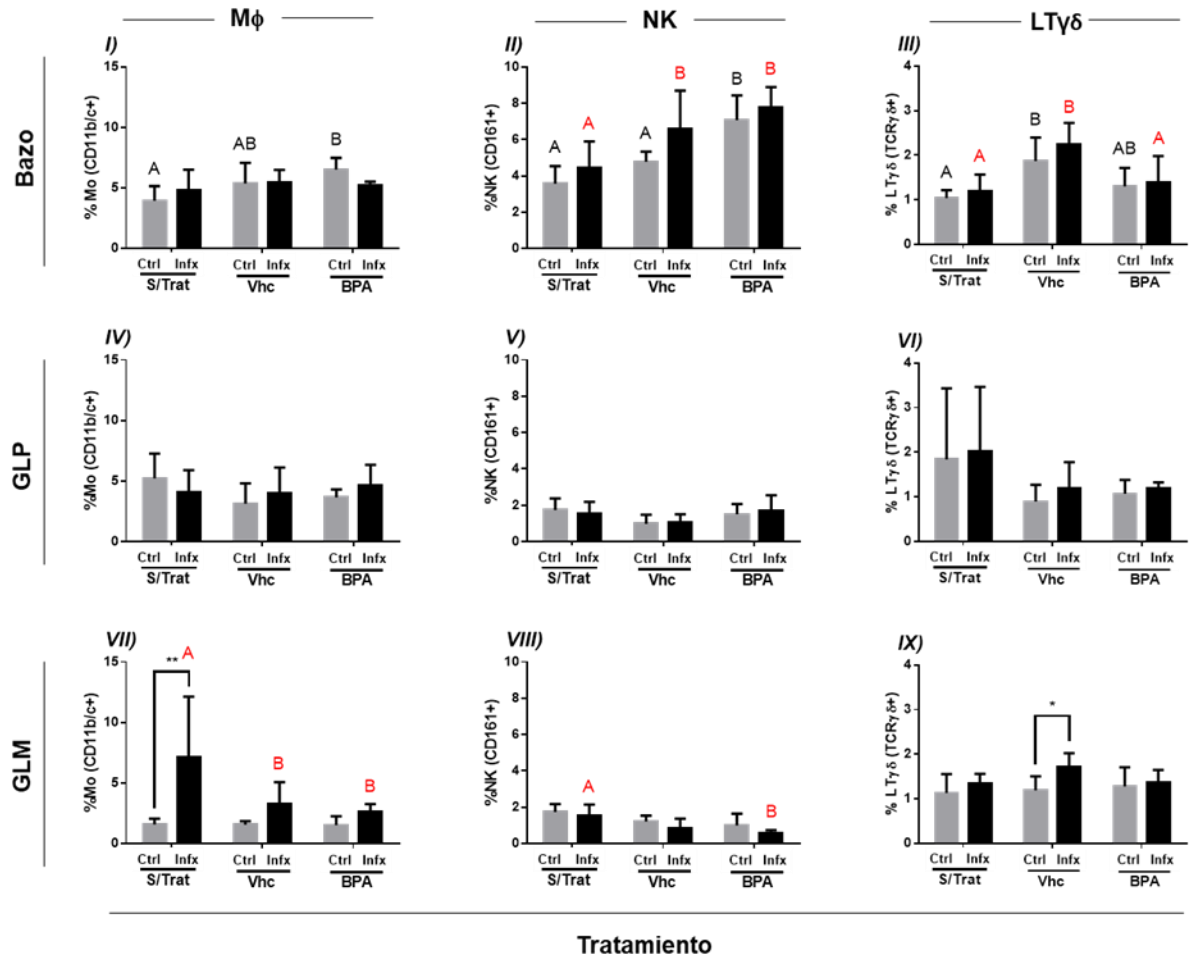
El análisis a nivel esplénico nos permite evaluar una respuesta sistémica. Este análisis es importante, debido a que las larvas del parásito migran por los diferentes órganos y tejidos. Como se puede observar, existe un aumento en el porcentaje de M $\phi$  debido al tratamiento tanto en el grupo Vhc Ctrl como en el BPA Ctrl ( $P < 0.05$ ) (Figura 11 I). En las células NK, se observa el mismo patrón, aumentos debidos al tratamiento en los grupos Vhc Infx y BPA Infx, mientras que en los animales sin infección solo se observa este aumento en el grupo BPA Ctrl ( $P < 0.05$ ) (Figura 11 II). En cuanto a los LT $\gamma\delta$  se puede observar un aumento en el porcentaje ocasionado por el Vhc en los grupos Ctrl e Infx ( $P < 0.05$ ) (Figura 11 III).

En el análisis de los GLP y los GLM, podemos evaluar la respuesta inmunológica de manera regional.

En los GLP, no se observan cambios significativos en los porcentajes de las subpoblaciones analizadas ( $P > 0.05$ ) (Figura 11 IV-VI).

Finalmente, en los GLM se observa un aumento en el porcentaje de M $\phi$  debido a la infección ( $P < 0.01$ ), pero al momento de dar alguno de los tratamientos (Vhc o BPA) este aumento no es significativo ( $P < 0.05$ ) (Figura 11 VII). En las células NK solo se observa una disminución en el porcentaje debido al tratamiento en el

grupo BPA Infx ( $P < 0.05$ ) (Figura 11 VIII). En los  $LT\gamma\delta$  solo se observa una diferencia debida a la infección en los grupos Vhc ( $P < 0.05$ ) (Figura 11 IX).



**Figura 11. Porcentaje de las subpoblaciones celulares de la respuesta inmunitaria innata en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con *T. canis*.** Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los \* muestran diferencias significativas ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (Vhc o BPA) ( $P < 0.05$ ).

*I)* Mφ en bazo, *II)* Células NK en bazo, *III)*  $LT\gamma\delta$  en bazo, *IV)* Mφ en GLP, *V)* Células NK en GLP, *VI)*  $LT\gamma\delta$  en GLP, *VII)* Mφ en GLM, *VIII)* Células NK en GLM, *IX)*  $LT\gamma\delta$  en GLM. S/Trat Ctrl; ratas sin tratamiento control ( $n=6$ ), S/Trat Infx; ratas sin tratamiento infectadas ( $n=7$ ), Vhc Ctrl; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal control ( $n=6$ ), Vhc Infx; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal infectadas ( $n=6$ ), BPA Ctrl; ratas expuestas al BPA de manera perinatal control ( $n=5$ ), BPA Infx; ratas expuestas al BPA de manera perinatal infectadas ( $n=5$ ).

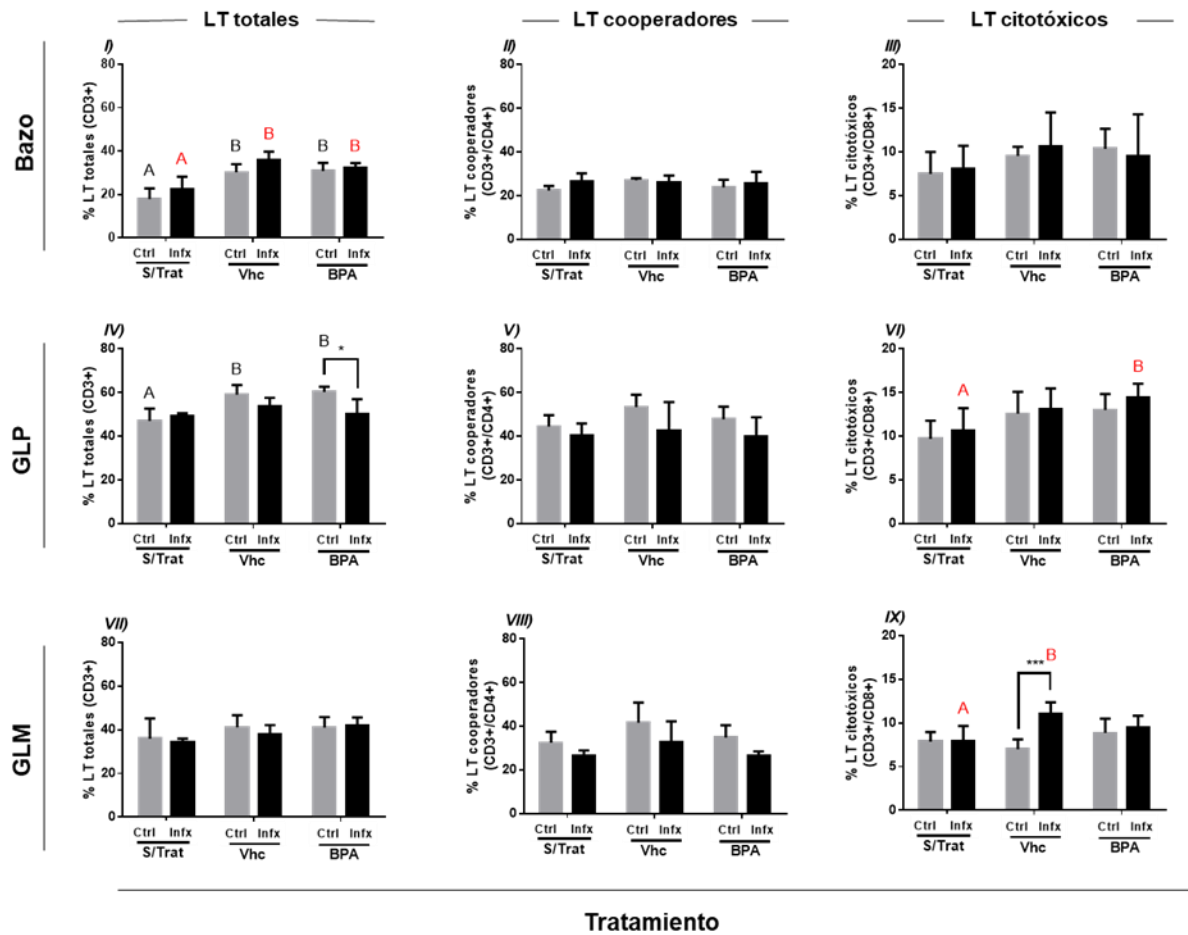
## 4.2 Células de la inmunidad adaptativa

La figura 12 muestra el porcentaje de las subpoblaciones de LT (LT totales, LT cooperadores y LT citotóxicos) analizadas en bazo, GLP y GLM.

En el bazo, existe un aumento en el porcentaje de LT totales debido al tratamiento tanto en el grupo Vhc como en el BPA. Este aumento en el porcentaje es independiente de la infección ( $P < 0.05$ ) (Figura 12 I). En el caso de los LT cooperadores y de los LT citotóxicos, no existe diferencia en el porcentaje de estas células ( $P > 0.05$ ) (Figura 12B II, III).

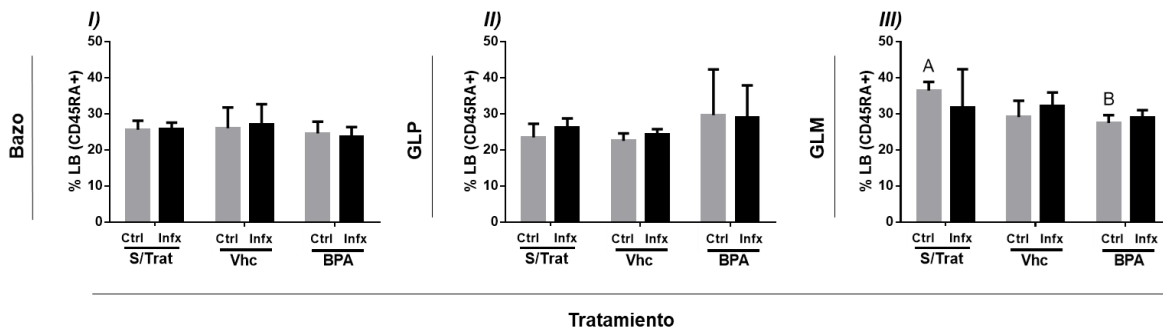
En los GLP, hay un aumento en el porcentaje de LT totales debido al tratamiento en los grupos Vhc Ctrl y BPA Ctrl ( $P < 0.05$ ), mientras que dentro de los grupos BPA hay una disminución en el porcentaje en esta subpoblación debida a la infección ( $P < 0.05$ ) (Figura 12 IV). En los LT cooperadores, no se muestran diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) (Figura 12 V), mientras que los LT citotóxicos, presentan un aumento en el porcentaje debido al tratamiento en los animales expuestos al BPA infectados ( $P < 0.05$ ) (Figura 12 VI).

En los GLM, no se observan diferencias debidas a la infección o al tratamiento en los porcentajes de los LT totales y de LT cooperadores ( $P > 0.05$ ) (Figura 12 VII, VIII), sin embargo, en los LT citotóxicos existe un aumento en el porcentaje debido a la infección en los grupos Vhc ( $P < 0.001$ ), además de un aumento debido al tratamiento en el grupo Vhc Infx en comparación con el grupo S/Trat Infx ( $P < 0.05$ ) (Figura 12 IX).



**Figura 12.** Porcentaje de LT en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con *T. canis*. Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los \* muestran diferencias significativas (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (Vhc o BPA) ( $P < 0.05$ ). I) LT totales en bazo, II) LT cooperadores en bazo, III) LT citotóxicos en bazo, IV) LT totales en GLP, V) LT cooperadores en GLP, VI) LT citotóxicos en GLP, VII) LT totales en GLM, VIII) LT cooperadores en GLM, IX) LT citotóxicos en GLM. S/Trat Ctrl; ratas sin tratamiento control ( $n=6$ ), S/Trat Infx; ratas sin tratamiento infectadas ( $n=7$ ), Vhc Ctrl; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal control ( $n=6$ ), Vhc Infx; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal infectadas ( $n=6$ ), BPA Ctrl; ratas expuestas al BPA de manera perinatal control ( $n=5$ ), BPA Infx; ratas expuestas al BPA de manera perinatal infectadas ( $n=5$ ).

Los porcentajes de LB en bazo, GLP y GLM, se muestran en la figura 13, donde se puede observar que no existen diferencias debidas a la infección en ninguno de los compartimientos analizados ( $P>0.05$ ) (Figura 13 I-III), y solo se observa una disminución en el porcentaje debido al tratamiento en el grupo BPA Ctrl en comparación con el grupo S/Trat Ctrl ( $P<0.05$ ) (Figura 13C).



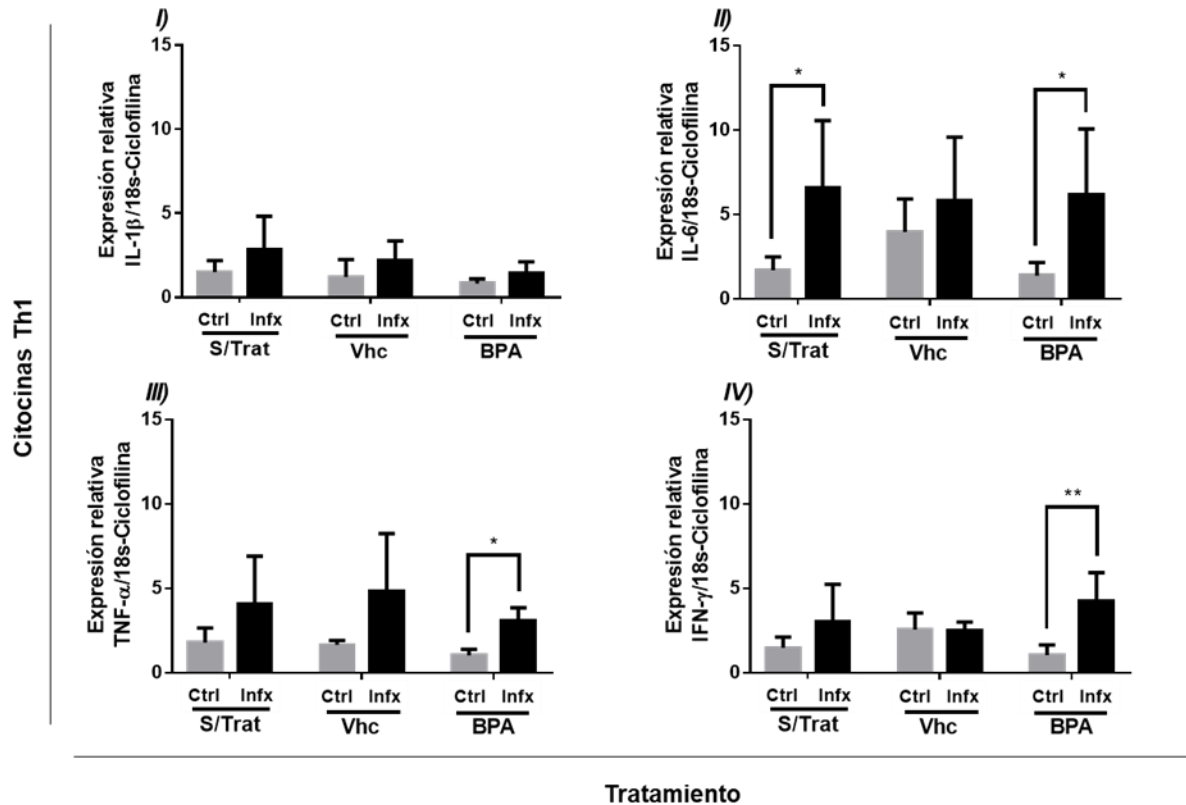
**Figura 13. Porcentaje de LB en bazo, GLP y GLM provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con *T. canis*.** Las letras (A, B) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (Vhc o BPA) ( $P<0.05$ ). I) LB en bazo, II) LB en GLP, III) LB en GLM. S/Trat Ctrl; ratas sin tratamiento control ( $n=6$ ), S/Trat Infx; ratas sin tratamiento infectadas ( $n=7$ ), Vhc Ctrl; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal control ( $n=6$ ), Vhc Infx; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal infectadas ( $n=6$ ), BPA Ctrl; ratas expuestas al BPA de manera perinatal control ( $n=5$ ), BPA Infx; ratas expuestas al BPA de manera perinatal infectadas ( $n=5$ ).

## 5. Expresión relativa de citocinas Th1/Th2 en bazo

Al no observarse diferencias biológicamente significativas en los porcentajes de las diferentes subpoblaciones celulares del sistema inmunitario, se prosiguió a evaluar los mecanismos humorales de estas células mediante la determinación de la expresión de citocinas Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) (Figura 14) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) (Figura 15) a nivel esplénico.

En cuanto a la producción de citocinas Th1 se puede observar que no existen cambios en la expresión de IL-1 $\beta$  ( $P>0.05$ ) (Figura 14 I) y TNF- $\alpha$  ( $P>0.05$ ) (Figura 14 III). Sin embargo, la expresión de IL-6 se ve aumentada debido a la infección en los grupos S/Trat y BPA ( $P<0.05$ ) (Figura 14 II). En el caso del IFN- $\gamma$  solo se observa

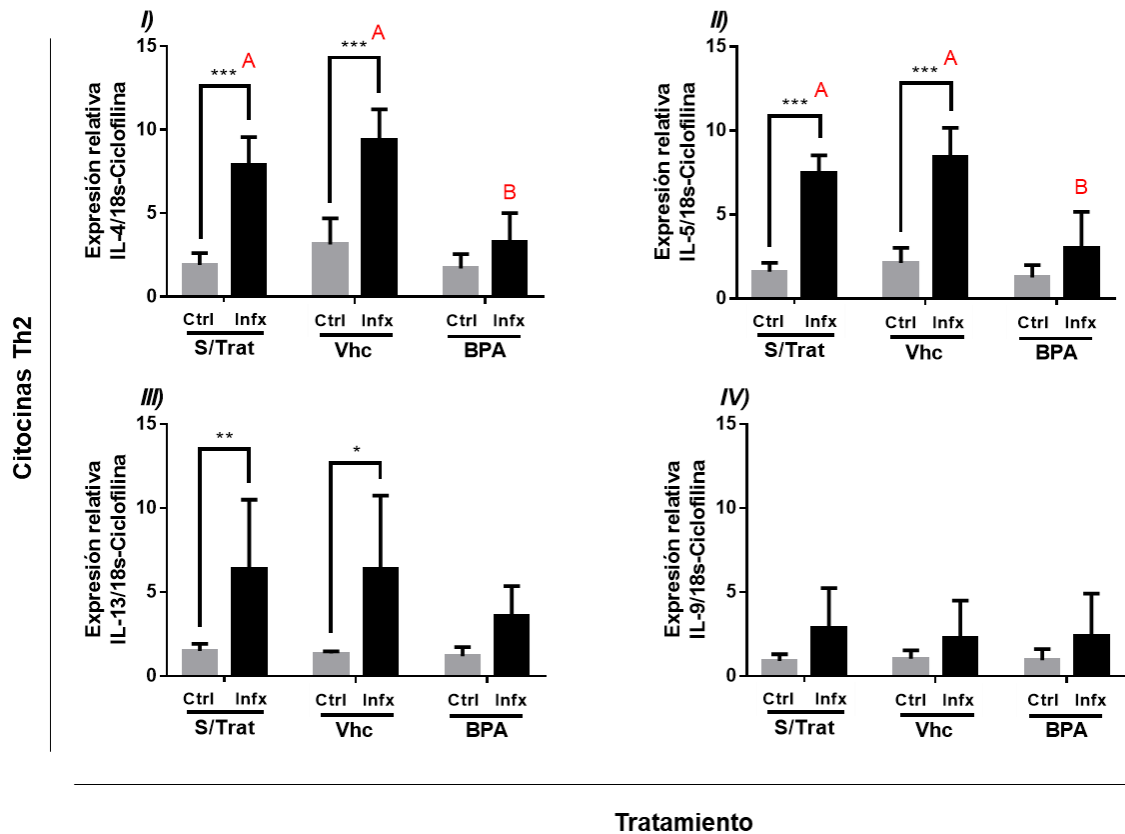
un aumento en la expresión debido a la infección en el grupo expuesto a BPA perinatalmente ( $P < 0.01$ ) (Figura 14 IV).



**Figura 14. Expresión relativa de citocinas Th1 en bazo provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con *T. canis*. Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los \* muestran diferencias significativas ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ) debidas al efecto de la infección. I) IL-1 $\beta$ , II) IL-6, III) TNF- $\alpha$  y IV) IFN- $\gamma$ . S/Trat Ctrl; ratas sin tratamiento control ( $n=6$ ), S/Trat Infx; ratas sin tratamiento infectadas ( $n=7$ ), Vhc Ctrl; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal control ( $n=6$ ), Vhc Infx; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal infectadas ( $n=6$ ), BPA Ctrl; ratas expuestas al BPA de manera perinatal control ( $n=5$ ), BPA Infx; ratas expuestas al BPA de manera perinatal infectadas ( $n=5$ ).**

En el caso de las citocinas Th2 se observan cambios debidos a la infección y al tratamiento. Primeramente, en la expresión de IL-4 (Figura 15 I) e IL-5 (Figura 15 II) se observa un aumento en la expresión debido a la infección en los grupos S/Trat y Vhc ( $P < 0.001$ ), sin embargo, en el grupo de animales expuestos al BPA perinatalmente no se observa este incremento ( $P > 0.05$ ) (Figura 15 I, II). En el caso

de la IL-13 existe un aumento en la expresión debido a la infección en los mismos grupos (S/Trat  $P < 0.01$ , Vhc  $P < 0.05$ ), sin que en el grupo BPA se observe este aumento ( $P > 0.05$ ) (Figura 15 III). En la expresión de IL-9 no hay diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ) (Figura 15 IV).

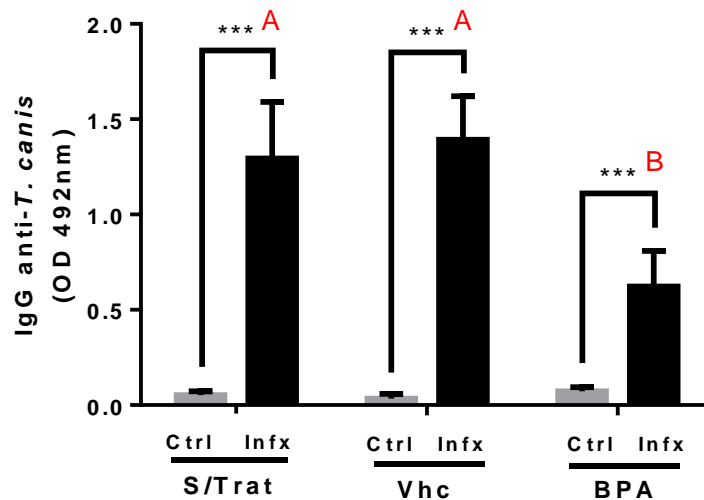


**Figura 15. Expresión relativa de citocinas Th2 en bazo provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con *T. canis*.** Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los \* muestran diferencias significativas ( $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ ) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (Vhc o BPA) ( $P < 0.05$ ). I) IL-4, II) IL-5, III) IL-13 y IV) IL-9. S/Trat Ctrl; ratas sin tratamiento control ( $n=6$ ), S/Trat Infx; ratas sin tratamiento infectadas ( $n=7$ ), Vhc Ctrl; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal control ( $n=6$ ), Vhc Infx; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal infectadas ( $n=6$ ), BPA Ctrl; ratas expuestas al BPA de manera perinatal control ( $n=5$ ), BPA Infx; ratas expuestas al BPA de manera perinatal infectadas ( $n=5$ ).

## 6. Producción de anticuerpos anti-*T. canis*

Finalmente, se evaluaron los niveles séricos de anticuerpos específicos contra el parásito *T. canis*, debido a que son componentes esenciales en el control de las infecciones causadas por helmintos (Figura 16).

La infección ocasiona un aumento en los títulos de anticuerpos anti-*T. canis* en los grupos S/Trat y Vhc ( $P < 0.001$ ), pero en el grupo de los animales expuestos a BPA al momento de ser infectados, este aumento es 50% menor que en el grupo S/Trat y Vhc ( $P < 0.05$ ) (Figura 16).



**Figura 16. Niveles séricos de anticuerpos anti-*T. canis* provenientes de ratas macho sin tratamiento (S/Trat) o expuestas al vehículo (Vhc) o al Bisfenol A (BPA) de manera perinatal, sin infección (Ctrl) o infectadas (Infx) con *T. canis*.** Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los \* muestran diferencias significativas ( $***P < 0.001$ ) debidas al efecto de la infección y las letras (A, B) muestran las diferencias significativas ocasionadas por efecto de los tratamientos (Vhc o BPA) ( $P < 0.05$ ). S/Trat Ctrl; ratas sin tratamiento control ( $n=6$ ), S/Trat Infx; ratas sin tratamiento infectadas ( $n=7$ ), Vhc Ctrl; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal control ( $n=6$ ), Vhc Infx; ratas expuestas al vehículo de manera perinatal infectadas ( $n=6$ ), BPA Ctrl; ratas expuestas al BPA de manera perinatal control ( $n=5$ ), BPA Infx; ratas expuestas al BPA de manera perinatal infectadas ( $n=5$ ).



## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la disrupción endócrina con BPA durante la etapa perinatal (que incluye las etapas prenatal y neonatal), considerada como etapa crítica del desarrollo, y la relación que tiene esta disrupción, sobre la respuesta inmunitaria durante la vida adulta. Dado que para estudiar el funcionamiento del sistema inmunitario, este se tiene que poner a trabajar, se partió de la premisa de evaluar esta respuesta retando al sistema inmune con un parásito de importancia médico-veterinaria (*T. canis*), en el cual, durante su ciclo biológico las etapas prenatal y neonatal, juegan un papel importante en la transmisión del parásito de la madre a la descendencia.

Durante estas etapas críticas del desarrollo, se presenta la formación de los órganos linfoides y la hematopoyesis, además de la maduración del sistema inmunitario. Además, en distintos estudios se ha observado, que la remoción quirúrgica del timo de 2-4 días posnatales, así como el tratamiento con ciclosporina a esta edad, puede afectar el desarrollo de la inmunidad adaptativa mediada por LT (Classen, 1998; Sakaguchi et al., 1982). En otro estudio se ha observado que una disrupción endócrina durante estos periodos tiene un efecto en la respuesta inmunitaria y la susceptibilidad a infecciones durante la etapa adulta (Guzmán et al., 2009).

Lo anterior, es un indicador de que una disrupción endócrina durante estos periodos del desarrollo puede afectar la respuesta inmunitaria y con ello modificar la susceptibilidad a distintas infecciones durante la vida adulta. Por esto, se decidió utilizar un esquema de disrupción endócrina perinatal indirecta (día 5 de gestación hasta el día 21 posnatal) con BPA, a una dosis de 250µg/kg/día, administrado en el agua de beber en ratas gestantes, para evaluar la respuesta inmunológica y la susceptibilidad a la infección por *T. canis* durante la vida adulta en las crías macho.

El abordaje para analizar estos puntos se centró en 4 principales puntos: a) mediante el conteo de las cargas parasitarias para observar si existen cambios en

la susceptibilidad a la infección, b) estimando los niveles hormonales debido a que estamos trabajando con un disruptor endócrino, c) evaluando las subpoblaciones celulares encargadas del control del parásito tanto a nivel sistémico como a nivel local y d) determinando los mecanismos humorales de las células del sistema inmunitario (producción de citocinas Th1/Th2 y anticuerpos) con la finalidad de ver si existe algún tipo de polarización en el tipo de respuesta inmunológica debido a la exposición perinatal al BPA. Las ventajas de realizar el abordaje de este problema en machos, y ya que estamos trabajando con un CDE de carácter estrogénico se centran en el punto de que los niveles de hormonas inmunomoduladoras como la P<sub>4</sub> y la PRL se encuentran en niveles muy bajos en comparación con las hembras, además de evitar los ciclos estrales presentes en las hembras debido a los cambios en los niveles de estas hormonas que se presentan durante el mismo.

En los resultados se observa que la exposición perinatal a BPA genera un incremento en el número de larvas a nivel pulmonar en un 31% más y a nivel hepático un 24% más durante la vida adulta. En la literatura, solo existen dos reportes en donde se evalúa la exposición perinatal a BPA y la susceptibilidad a infecciones causadas por helmintos, los cuales difieren entre ellos en cuanto al reto antigénico utilizado, el esquema de exposición, la dosis y el tiempo de infección. Primeramente, nuestros hallazgos son similares a lo reportado por Ménard y cols., quienes reportan un incremento en la susceptibilidad en las crías a la infección por *N. brasiliensis* administrando una dosis baja de BPA perinatalmente (5µg/kg/día) en el agua de bebida desde el día 15 de gestación, y hasta el momento del destete, realizando la evaluación a los 25 días de edad (Ménard et al., 2014a). Por el lado contrario, Tian y cols., reportan una disminución en la susceptibilidad a la infección por *T. spiralis* a los 40 dpi cuando se administró una sola dosis de BPA de 228µg/animal dos horas después de la infección durante la vida adulta (Tian et al., 2003).

Otro aspecto importante que fue importante evaluar, debido al efecto que pueden tener sobre la respuesta inmunológica y a la susceptibilidad a distintas

infecciones, es la determinación de hormonas inmunomoduladoras, ya que al estar trabajando con un CDE se pueden estar alterando sus niveles y con ello generar un efecto indirecto, mediado por la liberación de las mismas sobre la respuesta de las células del sistema inmunitario. Los resultados muestran que la exposición perinatal a BPA genera un aumento en los niveles de P<sub>4</sub> tanto en animales Ctrl como Infx y una disminución en los niveles de PRL solamente en los animales Infx.

En este punto es importante resaltar que tanto la infección por diversos parásitos, así como la exposición al BPA pueden generar alteraciones en los niveles de algunas hormonas.

Por ejemplo, se ha reportado que la infección crónica con cisticercos de *T. crassiceps* genera un aumento en los niveles de E<sub>2</sub> y una disminución en los niveles de T<sub>4</sub> en los machos (Larralde et al., 1995). En el caso de la P<sub>4</sub> no existen reportes de alteración en los niveles durante la infección por *T. canis*. Sin embargo, no se puede descartar el efecto que tiene la P<sub>4</sub> sobre el parásito como ha sido reportado en experimentos *in vitro* donde se ha observado que esta hormona genera una inhibición en el proceso de muda de las larvas del parásito *Haemonchus contortus* (Gutiérrez-Amézquita et al., 2017) Respecto a la PRL, se ha reportado que la infección crónica con el parásito *T. canis* genera un incremento en los niveles de esta hormona en ratas macho (Del Rio-Araiza et al., 2018). Lo anterior difiere de nuestros hallazgos probablemente por el tiempo de infección. En nuestro experimento es una infección aguda (7días), en comparación con lo reportado por Del Río y cols. donde la infección fue crónica (70 días). En el caso de la evaluación del efecto de la PRL sobre el parásito Chávez-Güitrón y cols., reportan que larvas de *T. canis* estimuladas con PRL *in vitro*, aumentan su tamaño y motilidad, además de la expresión del PRL-R (Chávez-Güitrón et al., 2016), lo cual es un indicativo de que dicha hormona puede estar ejerciendo sus efectos directamente sobre el parásito.

Por otra parte, en distintos experimentos se han reportado cambios en distintos niveles hormonales debidos a la exposición a BPA. Akingbemi y cols.,

reportan que la exposición posnatal aguda (del día 21 al día 35 de edad) a BPA en ratas Long-Evans macho a una dosis de 2.5µg/Kg/día genera una disminución en los niveles séricos de hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) y de T<sub>4</sub> (Akingbemi et al., 2004). Aunque nosotros no realizamos la determinación de estas hormonas cabe señalar que la LH es una hormona importante en la regulación de la secreción de P<sub>4</sub>, y nosotros al notar un incremento en los niveles de esta hormona no podríamos descartar que dichos cambios sucedan por una alteración en los niveles de secreción de LH por parte de la adenohipófisis. En el caso de la secreción de PRL, Khurana y cols., reportaron que la administración neonatal (del día 1 al 5 de edad) de BPA en ratas a dosis de 100 y 500µg/día, genera un incremento en la secreción de PRL durante la etapa prepuberal (a partir del día 25 de edad) tanto en machos como en hembras (Khurana et al., 2000). En nuestros resultados no se observan diferencias debidas a la exposición perinatal a BPA en los niveles séricos de PRL en los animales Ctrl. Sin embargo, en los animales expuestos al BPA e infectados si se observa una disminución la cual puede ser generada por la dosis utilizada, la infección, o el tipo de respuesta inmunitaria que se está generando durante la fase aguda de la infección, y la cual es el siguiente punto a evaluar dentro de nuestro análisis.

Para el análisis de las subpoblaciones celulares se decidió evaluar en distintos órganos linfoides como son; el bazo, los GLP y los GLM, las distintas subpoblaciones celulares de la inmunidad innata y adaptativa encargadas de controlar al parásito y en las cuales se ha reportado que tiene efectos el BPA. Este análisis se realizó en estos órganos debido a que el parásito tiene una migración sistémica dentro del hospedero y en ellos podemos observar si la respuesta inmunitaria específica contra el parásito está siendo alterada por la exposición perinatal al BPA.

Dentro de los cambios encontrados en las células de la inmunidad innata (M $\phi$ , NK y LT $\gamma\delta$ ) se observan pequeñas diferencias, las cuales, aunque son estadísticamente significativas, no parecen tener relevancia biológica. Sin embargo,

cabe mencionar que la mayoría de los reportes se basan en la evaluación de los mecanismos funcionales de estas células y no en evaluar aspectos relacionados con su proliferación. En cuanto a las células de la inmunidad adaptativa (LT totales, LT cooperadores, LT citotóxicos y LB) pasa algo similar a lo reportado en las células de la inmunidad innata, cambios en algunas subpoblaciones celulares, pero sin relevancia biológica. Sin embargo, el cambio más relevante se presenta a nivel esplénico, donde hay un aumento importante en el porcentaje de LT totales, aunque dicho efecto parece ser mediado por causa del vehículo.

Dado que no se observaron cambios biológicamente significativos en los porcentajes de las subpoblaciones celulares del sistema inmunitario se prosiguió a dilucidar los aspectos funcionales de estas células, como son la producción de citocinas y de anticuerpos.

Se ha reportado que la infección por *T. canis* genera una respuesta mediada por células Th2, con producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (Allen and Maizels, 2011; Finkelman et al., 2004; Valli et al., 2010). Además, en modelos murinos se ha observado un aumento en los niveles plasmáticos de IFN- $\gamma$  a los 7 dpi (Pecinali et al., 2005). Lo anterior concuerda con nuestros resultados, los cuales muestran que se presenta un aumento en la expresión de las citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) debido a la infección por *T. canis*. Sin embargo, cuando los animales son expuestos al BPA perinatalmente y son infectados no se presenta este incremento en la expresión de citocinas Th2 y si se observa un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$ , las cual es una citocina Th1 por excelencia.

Como se mencionó en la introducción, existen estudios donde se reporta que el BPA puede polarizar respuestas de tipo Th1 y otros donde indican respuestas Th2. Durante este experimento y dado que se usó un reto antigénico que polariza una respuesta Th2 y que donde al momento de administrar BPA perinatalmente no se observó un aumento en la expresión de estas citocinas y si un aumento en la expresión de IFN- $\gamma$ , lo cual podría indicar que el BPA está polarizando una

respuesta inmunitaria de tipo Th1, que es permisiva para el establecimiento del parásito.

Finalmente, se decidió evaluar el mecanismo final para el control de las infecciones por helmintos, que es la producción de anticuerpos específicos contra el parásito. La producción de estos anticuerpos es mediada por aumentos en citocinas como la IL-4, la cual estimula la proliferación y la maduración de los LB, la variación de isotipo de IgM a IgE y la producción de anticuerpos IgG específicos (Allen and Maizels, 2011). En nuestro experimento se observa que la infección por *T. canis* genera un incremento en los anticuerpos anti-*T. canis*, lo cual es concordante con lo anteriormente referido, pero, al momento de exponer a los animales al BPA perinatalmente la producción de anticuerpos específicos disminuye aproximadamente a la mitad en comparación con los animales control. Esta disminución puede ser debida a que el principal estímulo para la diferenciación de LB a células plasmáticas y para la producción de anticuerpos es la IL-4, la cual también se encuentra disminuida.

La información obtenida durante este experimento nos indica que la exposición a un CDE durante un periodo crítico del desarrollo, puede alterar la respuesta inmunológica durante la vida adulta de un individuo. En este caso, alterando la respuesta inmunitaria, no tanto en los porcentajes de las diferentes subpoblaciones analizadas, si no en sus mecanismos efectores, lo cual se ve reflejado en un aumento en el número de parásitos. Lo anterior trae como consecuencia una polarización inadecuada en cuanto a la producción de citocinas que repercute en un menor número de anticuerpos específicos contra el parásito.

Cabe mencionar que faltan estudios más profundos para poder dilucidar a que nivel se dan estas alteraciones, ya que podría ser que exista algún efecto epigenético que altere la funcionalidad del sistema inmune, o ver a que nivel se está dando, si hay alguna falla en la polarización de la respuesta a partir de un defecto en la polarización de los M $\phi$ , si es directamente en los linfocitos, o si es el algún paso de la diferenciación de los LB hacia células plasmáticas o si hay alguna

alteración en la expresión de receptores para estrógenos. Además, es importante investigar si el BPA puede tener un efecto directo sobre el parásito el cual pueda estar favoreciendo su metabolismo y desarrollo dentro del hospedero, ya que como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que los parásitos pueden tener receptores para hormonas endógenas y el BPA al ser un CDE con carácter estrogénico podría estarse uniéndose a dichos receptores.

## CONCLUSIONES

- La exposición perinatal al BPA a una dosis de 250µg/kg/día genera un aumento en la susceptibilidad a la Toxocariasis por *T. canis* durante la vida adulta en los machos.
- La disrupción endócrina con BPA durante periodos críticos del desarrollo genera alteraciones en los niveles hormonales de P<sub>4</sub> durante la vida adulta en los machos.
- En este trabajo se observa que no existen cambios biológicamente relevantes en cuanto al porcentaje de células del sistema inmunitario, sin embargo, si hay alteraciones en cuanto a sus mecanismos efectores.
- La exposición perinatal al BPA generó una deficiencia en la producción de citocinas Th<sub>2</sub>, particularmente IL-4, IL-5 e IL-13 y un aumento en las citocinas Th<sub>1</sub> TNF-α e IFN-γ durante la vida adulta en los machos.
- La producción de anticuerpos anti-*T. canis* disminuyó en un 50% en los machos que fueron expuestos al BPA perinatalmente.



## BIBLIOGRAFÍA

- Agency, U.S.E.P., Environmental Protection Agency, 2011. Bisphenol A Action Plan [WWW Document]. Environ. Heal. URL [http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol\\_A#Environmental\\_risk%5Cnhttp://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/bpa\\_action\\_plan.pdf](http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol_A#Environmental_risk%5Cnhttp://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/bpa_action_plan.pdf)
- Agro, A., Stanisz, A.M., 1995. Neuroimmunomodulation: classical and non-classical cellular activation. *Adv. Neuroimmunol.* 5, 311–9.
- Aguilar-Díaz, H., Nava-Castro, K.E., Escobedo, G., Domínguez-Ramírez, L., García-Varela, M., Del Río-Araiza, V.H., Palacios-Arreola, M.I., Morales-Montor, J., 2018. A novel progesterone receptor membrane component (PGRMC) in the human and swine parasite *Taenia solium*: Implications to the host-parasite relationship. *Parasites and Vectors* 11. doi:10.1186/s13071-018-2703-1
- Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., Hardy, M.P., 2004. Inhibition of Testicular Steroidogenesis by the Xenoestrogen Bisphenol a Is Associated with Reduced Pituitary Luteinizing Hormone Secretion and Decreased Steroidogenic Enzyme Gene Expression in Rat Leydig Cells. *Endocrinology* 145, 592–603. doi:10.1210/en.2003-1174
- Akmaev, I.G., 1996. Current concepts of the interactions of regulating systems: nervous, endocrine and immune. *Usp. Fiziol. Nauk* 27, 3–20.
- Alba-Hurtado, F., Muñoz-Guzmán, M.A., Valdivia-Anda, G., Tórtora, J.L., Ortega-Pierres, M.G., 2009. *Toxocara canis*: Larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol.* 122, 1–5.
- Alba-Hurtado, F., Tórtora, P.J.L., Tsutsumi, V., Ortega-Pierres, M.G., 2000. Histopathological investigation of experimental ocular toxocariasis in gerbils.

Int. J. Parasitol. 30, 143–147. doi:10.1016/S0020-7519(99)00173-3

Alizadeh, M., Ota, F., Hosoi, K., Kato, M., Sakai, T., Satter, M., 2006. Altered allergic cytokine and antibody response in mice treated with Bisphenol A. *J. Med. Invest.* 53, 70–80.

Allen, J.E., Maizels, R.M., 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 375–88.

Amaral Mendes, J.J., 2002. The endocrine disrupters: A major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* 40, 781–788. doi:10.1016/S0278-6915(02)00018-2

Ambrosio, J.R., Ostoa-Saloma, P., Palacios-Arreola, M.I., Ruíz-Rosado, A., Sánchez-Orellana, P.L., Reynoso-Ducoing, O., Nava-Castro, K.E., Martínez-Velázquez, N., Escobedo, G., Ibarra-Coronado, E.G., Valverde-Islas, L., Morales-Montor, J., 2014. Oestradiol and progesterone differentially alter cytoskeletal protein expression and flame cell morphology in taenia crassiceps. *Int. J. Parasitol.* 44, 687–696. doi:10.1016/j.ijpara.2014.04.004

Ambrosio, J.R., Valverde-Islas, L., Nava-Castro, K.E., Palacios-Arreola, M.I., Ostoa-Saloma, P., Reynoso-Ducoing, O., Escobedo, G., Ruíz-Rosado, A., Dominguez-Ramírez, L., Morales-Montor, J., Ambrosio, J., 2015. Androgens Exert a Cysticidal Effect upon Taenia crassiceps by Disrupting Flame Cell Morphology and Function. *PLoS One* 10, 1–17. doi:10.1371/journal

Ansar Ahmed, S., Penhale, W.J., Talal, N., 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am. J. Pathol.* 121, 531–51.

Arai, T., Abe, K., Matsuoka, H., Yoshida, M., Mori, M., Goya, S., Kida, H., Nishino, K., Osaki, T., Tachibana, I., Kaneda, Y., Hayashi, S., 2000. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L914-22.

Bayoumi, N.K., Elhassan, E.M., Elbashir, M.I., Adam, I., 2009. Cortisol, prolactin,

cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 111–117.

Beaver, P.C., Snyder, C.H., Carrera, G.M., Dent, J.H., Lafferty, J.W., 1952.

Chronic Eosinophilia Due To Visceral Larva Migrans. *Pediatrics* 9, 7–19.

Benedetto, N., Folgore, A., Carratelli, C.R., Galdiero, F., 2001. Effects of cytokines and prolactin on the replication of *Toxoplasma gondii* in murine microglia. *Eur. Cytokine Netw.* 12, 348–358.

Besedovsky, H., Del Rey, A., 1996. Immune-Neuro-Endocrine Interactions : Facts and Hypotheses. *Endocr. Rev.* 17, 64–102.

Bonfeld-Jørgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M. V., Vinggaard, A.M., 2007.

Endocrine-disrupting potential of Bisphenol A, Bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: New data and a brief review.

*Environ. Health Perspect.* 115, 69–76. doi:10.1289/ehp.9368

Byun, J.A., Heo, Y., Kim, Y.O., Pyo, M.Y., 2005. Bisphenol A-induced

downregulation of murine macrophage activities in vitro and ex vivo. *Environ.*

*Toxicol. Pharmacol.* 19, 19–24. doi:10.1016/j.etap.2004.02.006

Camarca, A., Gianfrani, C., Ariemma, F., Cimmino, I., Bruzzese, D., Scerbo, R.,

Picascia, S., D'Esposito, V., Beguinot, F., Formisano, P., Valentino, R.V.,

2016. Human peripheral blood mononuclear cell function and dendritic cell

differentiation are affected by bisphenol-A exposure. *PLoS One* 11, 1–18.

doi:10.1371/journal.pone.0161122

Campesi, I., Marino, M., Montella, A., Pais, S., Franconi, F., 2017. Sex Differences

in Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Levels and Activation Status in LPS-Stimulated

Human Macrophages. *J. Cell. Physiol.* doi:10.1002/jcp.25425

Chávez-Güitrón, L.E., Morales-Montor, J., Muñoz-Guzmán, M.A., Nava-Castro,

K.E., Ramírez-Álvarez, H., Moreno-Mendoza, N.A., Hernández-Cervantes, R.,

Alba-Hurtado, F., 2016. The in vitro effect of prolactin on the growth, motility

and expression of prolactin receptors in larvae of *Toxocara canis*. *Vet. Parasitol.* 224, 33–38.

Chiodi, H., 1940. The relationship between the thymus and the sexual organs. *Endocrinology*. *Endocrinology* 26, 107–116.  
doi:10.1113/jphysiol.1911.sp001434

Classen, J.B., 1998. Cyclosporine induced autoimmunity in newborns prevented by early immunization. *Autoimmunity* 27, 135–9.

Clevenger, C. V, Russell, D.H., Appasamy, P.M., Prystowsky, M.B., 1990. Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6460–4. doi:10.1073/pnas.87.16.6460

Da Silva, J.A.P., 1999. Sex hormones and glucocorticoids: Interactions with the immune system, in: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Wiley/Blackwell (10.1111), pp. 102–118. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07628.x

Damian, R.T., 1997. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology* 115 Suppl, S169–S175.

De Leon-Nava, M.A., Morales-Montor, J., 2006. Immune sexual dimorphism: can sex steroids affect the Th1/Th2 cytokine profile? *Rev Invest Clin* 58, 161–169.

del Campillo, M.C., Vázquez Rojo, F.A., 2001. *Parasitología Veterinaria, Parasitología Veterinaria*.

Del Rio-Araiza, V.H., Nava-Castro, K.E., Alba-Hurtado, F., Quintanar-Stephano, A., Aguilar-Díaz, H., Muñoz-Guzmán, M.A., Ostoa-Saloma, P., Ponce-Regalado, M.D., Morales-Montor, J., 2018. Prolactin as immune cell regulator in *Toxocara canis* somatic larvae chronic infection. *Biosci. Rep.* BSR20180305. doi:10.1042/BSR20180305

Despommier, D., 2003. *Toxocariasis : Clinical Aspects , Epidemiology , Medical*

Ecology , and Molecular Aspects. Society 16, 265–272.

Dogusan, Z., Hooghe, R., Verdood, P., Hooghe-Peters, E.L., 2001. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. J. Neuroimmunol. 120, 58–66. doi:10.1016/S0165-5728(01)00420-9

Dzitko, K., Malicki, S., Komorowski, J., 2008. Effect of hyperprolactinaemia on *Toxoplasma gondii* prevalence in humans. Parasitol. Res. 102, 723–729.

Elenkov, I.J., 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1024, 138–146. doi:10.1196/annals.1321.010

Escobedo, G., Camacho-Arroyo, I., Hernández-Hernández, O.T., Ostoa-Saloma, P., García-Varela, M., Morales-Montor, J., 2010. Progesterone induces scolex evagination of the human parasite taenia solium: Evolutionary implications to the host-parasite relationship. J. Biomed. Biotechnol. 2010. doi:10.1155/2010/591079

Escobedo, G., Camacho-Arroyo, I., Nava-Luna, P., Olivos, A., Pérez-Torres, A., Leon-Cabrera, S., Carrero, J.C., Morales-Montor, J., 2011. Progesterone induces mucosal immunity in a rodent model of human taeniosis by *Taenia solium*. Int. J. Biol. Sci. 7, 1443–56.

Escobedo, G., Roberts, C.W., Carrero, J.C., Morales-Montor, J., 2005. Parasite regulation by host hormones: An old mechanism of host exploitation? Trends Parasitol. 21, 588–593. doi:10.1016/j.pt.2005.09.013

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

Freilich, D., Ferris, S., Wallace, M., Leach, L., Kallen, A., Frincke, J., Ahlem, C., Hacker, M., Nelson, D., Hebert, J., 2000. 16alpha-bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum*

- and *Plasmodium berghei* growth. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63, 280–283.
- Gellersen, B., Dimattia, G.E., Friesen, H.G., Bohnet, H.G., 1984. Regulation of Prolactin Secretion in the Human B- Lymphoblastoid Cell Line IM-9-P3 Dexamethasone but no Other Regulators of Pituitary Prolactin 125, 2853–2861.
- Ghansah, T.J., Freeman-junior, P., Villalta, F., Lima, M.F., 2002. Epidermal Growth Factor Binds to a Receptor on *Trypanosoma cruzi* Amastigotes Inducing Signal Transduction Events and Cell Proliferation. *Eukaryot. Microbiol* 49, 383–390.
- Gomez-Ochoa, P., Gascon, F.M., Lucientes, J., Larraga, V., Castillo, J.A., 2003. Lactating females Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) show protection against experimental *Leishmania infantum* infection. *Vet. Parasitol.* 116, 61–64.
- Goto, M., Takano-Ishikawa, Y., Ono, H., Yoshida, M., Yamaki, K., Shinmoto, H., 2007. Orally administered bisphenol A disturbed antigen specific immunoresponses in the naïve condition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2136–43. doi:10.1271/bbb.70004
- Grossman, C., 1989. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *J. Steroid Biochem.* 34, 241–51.
- Grossman, C.J., Roselle, G.A., 1983. The interrelationship of the HPG-thymic axis and immune system regulation. *J. Steroid Biochem.* 19, 461–7.
- Guo, H., Liu, T., Uemura, Y., Jiao, S., Wang, D., Lin, Z., Narita, Y., Suzuki, M., Hirose, N., Ichihara, Y., Ishihara, O., Kikuchi, H., Sakamoto, Y., Senju, S., Zhang, Q., Ling, F., 2010. Bisphenol A in combination with TNF- $\alpha$  selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity. *Cell. Mol. Immunol.* 7, 227–34. doi:10.1038/cmi.2010.14
- Gutiérrez-Amézquita, R.A., Morales-Montor, J., Muñoz-Guzmán, M.A., Nava-

- Castro, K.E., Ramírez-Álvarez, H., Cuenca-Verde, C., Moreno-Mendoza, N.A., Cuéllar-Ordaz, J.A., Alba-Hurtado, F., 2017. Progesterone inhibits the in vitro L3/L4 molting process in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 248, 48–53. doi:10.1016/J.VETPAR.2017.10.011
- Guzmán-Arriaga, C., Zambrano, E., 2007. Endocrine disruptor compounds and their role in the developmental programming of the reproductive axis. *Rev. Investig. Clin.* 59, 73–81.
- Guzmán, C., Camacho-Arroyo, I., De León-Nava, M.A., Morales-Montor, J., 2009. Neonatal exposure to estradiol induces resistance to helminth infection and changes in the expression of sex steroid hormone receptors in the brain and spleen in adult mice of both sexes. *Brain. Behav. Immun.* 23, 709–715. doi:10.1016/j.bbi.2009.02.014
- Hartmann, D.P., Holaday, J.W., Bernton, E.W., 1989. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB J.* 3, 2194–202.
- He, M., Ichinose, T., Yoshida, S., Takano, H., Nishikawa, M., Shibamoto, T., Sun, G., 2016. Exposure to bisphenol A enhanced lung eosinophilia in adult male mice. *Allergy Asthma. Clin. Immunol.* 12, 16. doi:10.1186/s13223-016-0122-4
- Holladay, S.D., Xiao, S., Diao, H., Barber, J., Nagy, T., Ye, X., Gogal, R.M., 2010. Perinatal bisphenol a exposure in C57B6/129svj male mice: Potential altered cytokine/chemokine production in adulthood. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2845–2852. doi:10.3390/ijerph7072845
- Hong, C.-C., Shimomura-Shimizu, M., Muroi, M., Tanamoto, K., 2004. Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1136–1139. doi:10.1248/bpb.27.1136
- Khurana, S., Ranmal, S., Ben-Jonathan, N., 2000. Exposure of Newborn Male and Female Rats to Environmental Estrogens: Delayed and Sustained

Hyperprolactinemia and Alterations in Estrogen Receptor Expression\*. *Endocrinology* 141, 4512–4517.

Kim, J.Y., Jeong, H.G., 2003. Down-regulation of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by bisphenol A via nuclear factor- $\kappa$ B inactivation in macrophages. *Cancer Lett.* 196, 69–76. doi:10.1016/S0304-3835(03)00219-2

Kim, K.H., Yeon, S.M., Kim, H.G., Choi, H.S., Kang, H., Park, H.D., Park, T.W., Pack, S.P., Lee, E.H., Byun, Y., Choi, S.E., Lee, K.S., Ha, U.H., Jung, Y.W., 2014. Diverse influences of androgen-disrupting chemicals on immune responses mounted by macrophages. *Inflammation* 37, 649–656. doi:10.1007/s10753-013-9781-1

Klein, S.L., Flanagan, K.L., 2016. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* advance on. doi:10.1038/nri.2016.90

Kovats, S., 2015. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell. Immunol.* 294, 63–69. doi:10.1016/j.cellimm.2015.01.018

Krishnan, L., Guilbert, L.J., Russell, A.S., Wegmann, T.G., Mosmann, T.R., Belosevic, M., 1996. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN- $\gamma$  response and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.* 156, 644–652.

Kuan, Y.H., Huang, F.M., Li, Y.C., Chang, Y.C., 2012. Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NF- $\kappa$ B activation via PI3K/Akt pathway. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4003–4009. doi:10.1016/j.fct.2012.08.019

Kuan, Y.H., Li, Y.C., Huang, F.M., Chang, Y.C., 2012. The upregulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  and surface antigens expression on macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate. *Int. Endod. J.* 45, 619–626.



doi:10.1111/j.1365-2591.2012.02017.x

- Labib Salem, M., Sohrab Hossain, M., Nomoto, K., 2000. Mediation of the Immunomodulatory Effect of  $\beta$ -Estradiol on Inflammatory Responses by Inhibition of Recruitment and Activation of Inflammatory Cells and Their Gene Expression of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . *Int Arch Allergy Immunol* 121:121.
- Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., Romano, M.C., 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 575–580. doi:10.1016/0960-0760(95)00062-5
- Lee, J., Lim, K.-T., 2010. Plant-originated glycoprotein (36 kDa) suppresses interleukin-4 and -10 in bisphenol A-stimulated primary cultured mouse lymphocytes. *Drug Chem. Toxicol.* 33, 421–9. doi:10.3109/01480541003739229
- Lee, M.H., Chung, S.W., Kang, B.Y., Park, J., Lee, C.H., Hwang, S.Y., Kim, T.S., 2003. Enhanced interleukin-4 production in CD4<sup>+</sup> T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: Involvement of nuclear factor- $\kappa$ B and CA2<sup>+</sup>. *Immunology* 109, 76–86. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01631.x
- Limaye, a P., Abrams, J.S., Silver, J.E., Ottesen, E. a, Nutman, T.B., 1990. Regulation of parasite-induced eosinophilia: selectively increased interleukin 5 production in helminth-infected patients. *J. Exp. Med.* 172, 399–402. doi:10.1084/jem.172.1.399
- Liu, Y., Mei, C., Liu, H., Wang, H., Zeng, G., Lin, J., Xu, M., 2014. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 592–598. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.031
- Luo, S., Li, Y., Li, Y., Zhu, Q., Jiang, J., Wu, C., Shen, T., 2016. Gestational and

lactational exposure to low-dose bisphenol A increases Th17 cells in mice offspring. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 47, 149–158.

doi:10.1016/j.etap.2016.09.017

Matera, L., 1997. Action of pituitary and lymphocyte prolactin.

*Neuroimmunomodulation* 4, 171–180.

Meeusen, E.N.T., Balic, A., 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today* 16, 95–101.

Ménard, S., Guzylack-Piriou, L., Lencina, C., Leveque, M., Naturel, M., Sekkal, S., Harkat, C., Gaultier, E., Olier, M., Garcia-Villar, R., Theodorou, V., Houdeau, E., 2014a. Perinatal exposure to a low dose of bisphenol a impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. *PLoS One* 9, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0112752

Ménard, S., Guzylack-Piriou, L., Leveque, M., Braniste, V., Lencina, C., Naturel, M., Moussa, L., Sekkal, S., Harkat, C., Gaultier, E., Theodorou, V., Houdeau, E., 2014b. Food intolerance at adulthood after perinatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A. *FASEB J.* 28, 4893–4900. doi:10.1096/fj.14-255380

Mersha, M.D., Patel, B.M., Patel, D., Richardson, B.N., Dhillon, H.S., 2015. Effects of BPA and BPS exposure limited to early embryogenesis persist to impair non-associative learning in adults. *Behav. Brain Funct.* 11, 27.

doi:10.1186/s12993-015-0071-y

Miao, S., Gao, Z., Kou, Z., Xu, G., Su, C., Liu, N., 2008. Influence of bisphenol a on developing rat estrogen receptors and some cytokines in rats: a two-generational study. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 71, 1000–1008.

doi:10.1080/15287390801907467

Midoro-Horiuti, T., Tiwari, R., Watson, C.S., Goldblum, R.M., 2010. Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in

- mouse pups. *Environ. Health Perspect.* 118, 273–277.  
doi:10.1289/ehp.0901259
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin - 10 and the Interleukin -10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765.  
doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683
- Morales-Montor, J., Mohamed, F., Ghaleb, A.M., Baig, S., Hallal-Callerost, C., Damian, R.T., 2001. In vitro effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 87, 1132–1139.
- Morales, J., Larralde, C., Arteaga, M., Govezensky, T., Romano, M.C., Moralí, G., 1996. Inhibition of sexual selection in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Parasitol.* 82, 689–693.
- Muñoz-Cruz, S., Togno-Pierce, C., Morales-Montor, J., 2011. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 1714–27.
- Nagy, D., Bede, O., Danko, J., Szénási, Z., Sipka, S., 2012. Analysis of serum cytokine levels in children with chronic cough associated with *Toxocara canis* infection. *Parasite Immunol.* 34, 581–588.
- Nagy E, Berczi I, F.H., 1983. Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol* 351–7.
- Nagy, E., Berczi, I., Wren, G.E., Asa, S.L., Kovacs, K., 1983. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* 6, 231–243.
- Nagy, E., Berkzi, I., 1978. Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol* 89, 530–537.
- Ohnishi, T., Yoshida, T., Igarashi, A., Muroi, M., Tanamoto, K.I., 2008. Effects of possible endocrine disruptors on MyD88-independent TLR4 signaling. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 293–295. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00355.x

- Ohshima, Y., Yamada, A., Tokuriki, S., Yasutomi, M., Omata, N., Mayumi, M., 2007. Transmaternal exposure to bisphenol a modulates the development of oral tolerance. *Pediatr. Res.* 62, 60–64. doi:10.1203/PDR.0b013e3180674dae
- Overgaauw, P.A., Okkens, A.C., Bevers, M.M., Kortbeek, L.M., 1998. Incidence of patent *Toxocara canis* infection in bitches during the oestrous cycle. *Vet. Q.* 20, 104–107.
- Pecinali, N.R., Gomes, R.N., Amendoeira, F.C., Bastos, A.C.M.P., Martins, M.J.Q.A., Pegado, C.S., Bastos, O.M.P., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., 2005. Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet. Parasitol.* 134, 121–130.
- Pisapia, L., Del Pozzo, G., Barba, P., Caputo, L., Mita, L., Viggiano, E., Russo, G.L., Nicolucci, C., Rossi, S., Bencivenga, U., Mita, D.G., Diano, N., 2012. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 178, 54–63. doi:10.1016/j.ygcen.2012.04.005
- Reistad, T., Mariussen, E., Fonnum, F., 2005. The effect of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol-A, on free radical formation in human neutrophil granulocytes: The involvement of the MAP kinase pathway and protein kinase C. *Toxicol. Sci.* 83, 89–100. doi:10.1093/toxsci/kfh298
- Roberts, C.W., Walker, W., Alexander, J., 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 476–488.
- Roy, A., Bauer, S.M., Lawrence, B.P., 2012. Developmental exposure to bisphenol a modulates innate but not adaptive immune responses to influenza a virus infection. *PLoS One* 7, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0038448
- Sakaguchi, S., Takahashi, T., Nishizuka, Y., 1982. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1

- effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J. Exp. Med.* 156, 1565–76.
- Sawai, C., Anderson, K., Walser-Kuntz, D., 2003. Effect of bisphenol A on murine immune function: Modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB ?? NZW F1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 1883–1887. doi:10.1289/ehp.6359
- Segura, J.J., Jiménez-Rubio, A., Pulgar, R., Olea, N., Guerrero, J.M., Calvo, J.R., 1999. In Vitro Effect of the Resin Component Bisphenol A on Substrate Adherence Capacity of Macrophages. *J. Endod.* 25, 341–344.
- Smith, P.E., 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anat. Rec.* 47, 119–129. doi:10.1002/ar.1090470110
- Soulsby, E.J., 1983. Toxocariasis. *Br. Vet. J.* 139, 471–5.
- Spangelo, B.L., Macleod, R.M., 1990. The role of immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol. Metab.*
- Sugita-Konishi, Y., Shimura, S., Nishikawa, T., Sunaga, F., Naito, H., Suzuki, Y., 2003. Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli*. *Toxicol. Lett.* 136, 217–227. doi:10.1016/S0378-4274(02)00388-0
- Švajger, U., Dolenc, M.S., Jeras, M., 2016. In vitro impact of bisphenols BPA, BPF, BPAF and 17 $\beta$ -estradiol (E2) on human monocyte-derived dendritic cell generation, maturation and function. *Int. Immunopharmacol.* 34, 146–154. doi:10.1016/j.intimp.2016.02.030
- Sweeney, T., 2002. Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 203–209. doi:10.1016/S0739-7240(02)00157-1

- Tan, L., Wang, S., Wang, Y., He, M., Liu, D., 2015. Bisphenol A exposure accelerated the aging process in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Lett.* 235, 75–83. doi:10.1016/j.toxlet.2015.03.010
- Teixeira, D., Marques, C., Pestana, D., Faria, A., Norberto, S., Calhau, C., Monteiro, R., 2016. Effects of xenoestrogens in human M1 and M2 macrophage migration, cytokine release, and estrogen-related signaling pathways. *Environ. Toxicol.* 31, 1496–1509. doi:10.1002/tox
- Tian, X., Takamoto, M., Sugane, K., 2003. Bisphenol A promotes IL-4 production by Th2 cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132, 240–247. doi:10.1159/000074305
- Tonelli, L.H., Postolache, T.T., 2005. Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and major histocompatibility complex molecules in the normal brain and after peripheral immune challenge. *Neurol. Res.* 27, 679–684. doi:10.1179/016164105X49463
- Torina, A., Caracappa, S., Barera, A., Dieli, F., Sireci, G., Genchi, C., Deplazes, P., Salerno, A., 2005. *Toxocara canis* infection induces antigen-specific IL-10 and IFN- $\gamma$  production in pregnant dogs and their puppies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 247–251. doi:10.1016/j.vetimm.2005.08.006
- Valli, J.L., Williamson, A., Sharif, S., Rice, J., Shewen, P.E., 2010. In vitro cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134, 218–229.
- Viselli, S.M., Stanek, E.M., Mukherjee, P., Hymer, W.C., Mastro, A.M., 1991. Prolactin-Induced Mitogenesis of Lymphocytes from Ovariectomized Rats\*. *Endocrinology* 129, 983–990.
- Vossmann, T., Stoye, M., 1986. Clinical, hematologic and serologic findings in puppies after prenatal infection with *Toxocara canis* Werner 1782

- (Anisakidae). Zentralbl. Veterinarmed. B 33, 574–85.
- Wang, Y., Wang, L., Zhao, J., Qiao, Z., 2005. Estrogen, but not testosterone, down-regulates cytokine production in nicotine-induced murine macrophage. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27, 311–316.  
doi:10.1358/mf.2005.27.5.893666
- Watanabe, H., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Kasahara, T., Suzuki, K., 2003. Bisphenol A significantly enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells. *Int. Immunopharmacol.* 3, 1601–1608.  
doi:10.1016/S1567-5769(03)00182-6
- Welshons, W. V., Nagel, S.C., Vom Saal, F.S., 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147, 56–69. doi:10.1210/en.2005-1159
- Yamaguchi, B.Y.Y., Suda, T., Suda, J., Tominaga, A., Takatsu, K., 1988. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J Exp Med* 167, 43–56.
- Yamashita, U., Sugiura, T., Yoshida, Y., Kuroda, E., 2005. Effect of endocrine disrupters on macrophage functions in vitro. *J. UOEH* 27, 1–10.
- Yan, H., Takamoto, M., Sugane, K., 2008. Exposure to bisphenol A prenatally or in adulthood promotes TH2 cytokine production associated with reduction of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Environ. Health Perspect.* 116, 514–519.  
doi:10.1289/ehp.10829
- Yang, M., Qiu, W., Chen, B., Chen, J., Liu, S., Wu, M., Wang, K.J., 2015. The in vitro immune modulatory effect of bisphenol a on fish macrophages via estrogen receptor ?? and Nuclear Factor-??B signaling. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1888–1895. doi:10.1021/es505163v
- Yoshino, S., Yamaki, K., Li, X., Sai, T.A.O., Takano, H., Hayashi, H., 2004.

Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses , including T helper 1 and T helper 2 responses , in mice. *Immunology* 112, 495.  
doi:10.1046/j.1365-2567.2004.01900.x

Yoshino, S., Yamaki, K., Yanagisawa, R., Takano, H., Hayashi, H., Mori, Y., 2003. Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice. *Br. J. Pharmacol.* 138, 1271–6. doi:10.1038/sj.bjp.0705166

Yoshitake, J., Kato, K., Yoshioka, D., Sueishi, Y., Sawa, T., Akaike, T., Yoshimura, T., 2008. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways. *Nitric oxide Biol. Chem.* 18, 223–8. doi:10.1016/j.niox.2008.01.003

Youn, J.-Y., Park, H.-Y., Lee, J.-W., Jung, I.-O., Choi, K.-H., Kim, K., Cho, K.-H., 2002. Evaluation of the immune response following exposure of mice to bisphenol A: induction of Th1 cytokine and prolactin by BPA exposure in the mouse spleen cells. *Arch. Pharm. Res.* 25, 946–53. doi:10.1007/BF02977018

Yurino, H., Ishikawa, S., Sato, T., Akadegawa, K., Ito, T., Ueha, S., Inadera, H., Matsushima, K., 2004. Endocrine disruptors (environmental estrogens) enhance autoantibody production by B1 cells. *Toxicol. Sci.* 81, 139–147. doi:10.1093/toxsci/kfh179

Zhou, D., Yang, J., Li, H., Cui, C., Yu, Y., Liu, Y., Lin, K., 2016a. The chronic toxicity of bisphenol A to *Caenorhabditis elegans* after long-term exposure at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere* 154, 546–551. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.04.011

Zhou, D., Yang, J., Li, H., Lu, Q., Liu, Y. Di, Lin, K.F., 2016b. Ecotoxicity of bisphenol A to *Caenorhabditis elegans* by multigenerational exposure and variations of stress response in vivo across generations. *Environ. Pollut.* 208, 767–773. doi:10.1016/j.envpol.2015.10.057



Zimmermann, U., Lowenstein, M.D., Stoye, M., 1985. Migration and distribution of *Toxocara canis* Werner 1782 (Anisakidae) larvae in the definitive host (Beagle) following primary infection and reinfection. *J. Vet. Med.* 32, 1–28.

Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607–612. doi:10.1210/en.2004-1018

## **ANEXO I**

### **ARTÍCULOS ORIGINALES**



## Research paper

# Endocrine immune interactions during chronic Toxocariasis caused by *Toxocara canis* in a murine model: New insights into the pathophysiology of an old infection

Víctor Hugo Del Río-Araiza<sup>a</sup>, Karen Elizabeth Nava-Castro<sup>b</sup>, Fernando Alba-Hurtado<sup>c</sup>,  
Andrés Quintanar-Stephano<sup>d</sup>, Marco Antonio Muñoz-Guzmán<sup>c</sup>, Olga CUenca-Micò<sup>a</sup>,  
Jorge Morales-Montor<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México, D.F., 04510, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Genotoxicología y Mutagénesis Ambientales, Departamento de Ciencias Ambientales, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>d</sup> Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Toxocara canis*  
Toxocariasis  
Hypophysectomy  
Immune response  
Immunopathology  
Chronic infection

## ABSTRACT

*Toxocara canis* is the helminth causing Toxocariasis, a parasitic disease with medical and veterinary implications. Their final host are members of the family Canidae and as paratenic hosts, most of the mammals are sensitive (man, rat, mouse, among others). It has been reported that a pituitary hormone, prolactin, it is responsible for reactivation and migration of larvae to the uterus and mammary gland during the last third of gestation in bitches. In addition, this hormone has been shown to play an important role in the regulation of the immune response. Thus, the aim of this study, was to evaluate the effect of hypophysectomy in the rat model of Toxocariasis, on the immune response against this parasite during a chronic infection, for which parasite loads were analyzed in different organs (lung and brain). Furthermore, serum specific antibody titers, and percentages of different cells of the immune system were also determined. The results showed a decrease in the number of larvae recovered from lung and brain in the hypophysectomized animals. In this same group of animals, there was no production of specific antibodies against the parasite. As for the percentages of the cells of the immune system, there are differences in some subpopulations due to surgery and others due to infection. Our results demonstrated that the lack of pituitary hormones alters parasite loads and the immune response to the helminth parasite *Toxocara canis*.

## 1. Introduction

*Toxocara canis* (*T. canis*) is one of the parasite nematodes most frequently found in dogs worldwide. Toxocariasis is also considered one of the zoonoses with the largest distribution in the world, due to the wide co-existence that has generated man with domestic dogs and cats (Despommier, 2003). The disease in man is caused by the accidental ingestion of embryonated eggs accumulated in water and contaminated food. It is more common in children who play in highly polluted green areas, and because of mineral deficiencies have habits such as geophagy (Holland et al., 1991; Overgaauw, 1997). Based on the different clinical forms during the disease, it has been classified as Visceral Larva Migrans, Ocular Larva Migrans, Neurological Toxocariasis, Covert Toxocariasis, and Asymptomatic Toxocariasis (Beaver et al., 1952). The

embryonated egg conform the infecting phase of the parasite. In pregnant females, somatic larvae undergo a process of reactivation, which consists in the migration of the larvae to the uterus and mammary gland. During this process, it has been proposed an increase of a hormone of pituitary origin, prolactin, as the trigger for this phenomenon of larval reactivation (Overgaauw et al., 1998). Nowadays, there are few reports of the role of prolactin in *T. canis* infection, however, a study in a murine model suggests that reactivation and migration of somatic larvae to the uterus and mammary gland, in the case of paratenic hosts, could also be triggered by an increase in the concentration of this hormone, favoring transplacental and lactogenic transmission to offspring (Jin et al., 2008).

Previously, several studies have shown the effect of pituitary removal on the immune response during helminth parasitic infections.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jmontor66@biomedicas.unam.mx](mailto:jmontor66@biomedicas.unam.mx), [jmontor66@hotmail.com](mailto:jmontor66@hotmail.com) (J. Morales-Montor).

Hernández-Cervantes et al. (2013) reported that neurointermedia hypophysectomy reduces the number of *Trichinella spiralis* larvae in the duodenum at 5 days post-infection. In addition, they demonstrated an increase in the expression of Th2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) evaluated in the duodenum of hamsters with neurointermediate hypophysectomy, whilst the expression of Th1 cytokines is increased, concluding that hormones from the pituitary gland affect the gastrointestinal immune responses to *Trichinella spiralis* through various mechanisms (Hernández-Cervantes et al., 2013). In another study, Quintanar-Stephano et al. (2015), reported a reduction in the number and size of adult parasites of *Taenia solium* (a cestode human parasite), recovered from hypophysectomized hamsters at 15 days post-infection. In addition, they describe differences in Th1 and Th2 cytokines level expression at the duodenal level, as well as an exacerbated inflammatory infiltrate located along the lamina propria related to the presence of the parasite. Authors concluded that specific pituitary hormones from different pituitary lobes affect differentially the development of *Taenia solium* and the immune response to the parasite at the intestinal level (Quintanar-Stephano et al., 2015). The above-mentioned studies revealed the close relationship between the endocrine system and the immune system, and how a hormonal imbalance can favor the disease. Thus, the aim of this study was to determine the effect of the elimination of the hormones produced by the pituitary gland, by means of hypophysectomy on the immunological response associated with chronic Toxocarosis caused by *T. canis* in a murine model.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics statement

Animal care and experiments at Universidad de Aguascalientes and the Instituto de Investigaciones Biomédicas are constantly evaluated and approved by both Institute's Animal Care and Use Committee, (Comité de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación, CICUAL, permit number 201-2016) adhering to the official Mexican regulations (NOM-062-ZOO-1999). Mexican regulations are in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institute of Health (NIH) of the USA, to ensure compliance with established international regulations and guidelines. The rats were euthanized using anesthesia overdose (Sevorane®) followed by decapitation.

### 2.2. Animals

A total of 30 Wistar, 2-month-old male rats were used for the experiments, kindly provided by the bioterium of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. The animals were organized into 6 groups and allocated in polycarbonate boxes (50cm l x 23cm w x 21cm h). The groups were distributed as follows: a) untreated control (Int-Ctrl  $n = 7$ ), b) untreated infected (Int-Infx  $n = 7$ ), c) simulated hypophysectomy surgery (Sham) control (Sh-Hpx-Ctrl  $n = 7$ ), d) simulated hypophysectomy surgery (Sham) infected (Sh-Hpx-Infx  $n = 7$ ), e) hypophysectomy surgery control (Hpx-Ctrl  $n = 7$ ) and f) hypophysectomy surgery infected (Hpx-Infx  $n = 7$ ) (Table 1). One round of experiments were performed. Animals were kept in cycles of 12 h light/darkness. Water and food

**Table 1**  
Experimental groups.

Control rats	Infected rats
Intact $n = 7$	Intact $n = 7$
Simulated hypophysectomy surgery (Sham) $n = 7$	Simulated hypophysectomy surgery (Sham) $n = 7$
Hypophysectomy $n = 7$	Hypophysectomy $n = 7$

were provided *ad libitum* in sterile conditions.

### 2.3. Harvest and processing of *Toxocara canis* eggs

*T. canis* eggs were obtained from adult parasites donated by Centro de Control Canino de Cuautitlán, Estado de México. Worm females were separated, rinsed in tap water and placed in 1x PBS. Afterwards, uteri of these female worms were collected through incision in the first third of the body, and placed in physiological saline solution. Eggs were obtained using a fine pore filter. The ova were washed several times in 1x PBS and centrifuged at 3250g/5 min. and eggs from pellet were resuspended in a 1x PBS/2% formaldehyde solution and incubated at 27 °C for 28 days to obtain the infective form (embryonated eggs).

### 2.4. *Toxocara canis* infection

Previous to infection, the inoculum was washed three times to eliminate the PBS/formaldehyde solution. Eggs were then resuspended in PBS and concentrated to 2000 larvated eggs per ml. Infection was performed by intragastric administration using a type Foley metallic probe inoculating 2000 larvated eggs per rat at 8 weeks of age.

### 2.5. Surgical procedures and euthanasia

Surgical procedures were performed at 45 days post-infection (dpi): Hypophysectomy and Sham surgery. The procedures were performed as previously described (Quintanar-Stephano, 1994; Hernández-Cervantes et al., 2013; Quintanar-Stephano et al., 2015). After surgery, rats were placed in a recuperation chamber (clinical O<sub>2</sub>+ thermic mattress) and administered 5000 UI procaine penicillin G IM every 24 h for 3 days. Animal euthanasia was performed 25 days after surgery by anesthesia overdose (Sevorane®) followed by decapitation. Immediately after, several tissues were collected i.e. blood, spleen, lungs, brain, peripheral lymph nodes (PLN) and mesenteric lymph nodes (MLN).

### 2.6. Larvae recovery

After euthanasia, a tissue sample from lungs was taken for histopathology. Then, lungs and brain of infected animals were weighted and macerated; tissue was digested in artificial gastric juice (1% pepsin (250 units/mg, SIGMA®) and 1% HCl 37%. pH: 2.0 (10 ml of artificial gastric juice/ 1 gr of tissue) for 24 h. Samples were centrifuged at 791g/5 min, and the pellet was resuspended in 1 ml 4% paraformaldehyde. Parasite counting involved 10 counts per 20 µl sample, total number of larvae was multiplied x50 to calculate the number of larvae per ml and therefore the number of larvae per gram of tissue (Alba-Hurtado et al., 2009).

### 2.7. Histopathology

Prior to maceration to obtain larvae from sampled tissues, a tissue sample of (4 × 4x4 mm = 0.6 mm<sup>3</sup>) was taken from lung of all groups of infected animals. Histological sections of 4 µm thickness were performed, sections were mounted in slides previously treated with acid and alcohol and 1:10 Poly-L-lysine solution; samples were stained with hematoxylin/eosin and observed under the microscope at 20x amplification.

### 2.8. Flow cytometry

Spleen, peripheric lymphatic nodes (PLN) and mesenteric lymphatic nodes (MLN) collected at the time of sacrifice were disaggregated using a sterile nylon mesh (70 µm) and a syringe plunge in 1x PBS pH 7.4/4 °C. Cell suspension was centrifuged at 182g/3 min, decanted and resuspended in 500 µl of erythrocyte lysis buffer (spleen only), incubated for 10 min at room temperature; 700 µl of FACS buffer was added

followed by centrifugation at 182g/3 min. Supernatant was decanted and cells were resuspended in 500 µl FACS buffer. 25 µl was pipetted and cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min/37 °C in a 96-well plate, then centrifuged at 127g/5 min and washed with 200 µl FACS buffer. 150 µl of absolute methanol was added and incubated for 10 min/4 °C. Plate was centrifuged again at 506g/3 min, and washed with 200 µl FACS buffer; 150 µl of primary antibody solution was added to the corresponding wells and incubated for 10 min/ 4 °C. After incubation, following primary antibodies were selected: AF 488 anti-rat CD3 (Biolegend. Clone 1F4), PE-Cy5 Mouse anti-rat CD4 (BD bioscience. Clone Ox-35), PE Mouse anti-rat CD8α (BD bioscience. Clone Ox-8), PE anti-rat CD45RA (Biolegend. Clone Ox-33), PE anti-rat TCRγδ (Biolegend. Clone V65) and AF647 anti-rat CD161 (Biolegend. Clone 1F4). Wells were washed with 150 µl FACS buffer after incubation. Cells were finally resuspended in 200 µl of FACS buffer and stored at 4 °C in the dark. Data analysis was performed using the software FlowJo v10.0.

## 2.9. TES-Ag purification

TES-Ag were obtained by culturing the *T. canis* larvae according to the method described by Savigny (de Savigny, 1975), and modified by Bowman (Bowman et al., 1987). Purity and integrity of excretion and secretion antigens (ESA) was determined by SDS-PAGE and Coomassie staining, protein content was quantified by Bradford method (Bradford, 1976).

## 2.10. *T. canis* specific IgG determination

Specific antibodies in serum were measured by indirect ELISA. Antigen concentration was of 1 µg/ml, serum dilution was of 1:200 and the conjugate (rat IgG) was diluted 1: 10,000. Plate reading was done at 492nm, in an ELISA plate reader (Multiscan Ascent).

## 2.11. Statistical analysis

Data were expressed as mean average ± standard deviation (SD). Results obtained are presented in bar graphs, describing the mean average and standard deviation. These values were evaluated by 2-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison between all groups. A significant difference was considered when  $p < .05$ ; (GraphPad Prism v7.0).

## 3. Results

### 3.1. Larval recovery and lung inflammatory process

Parasitic loads in lung and brain are shown in Fig. 1. Larvae recovery in lungs and brain, at 70 days post-infection, was obtained by

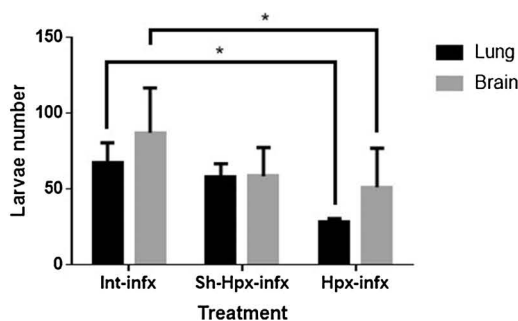


Fig. 1. Mean (± SD) of recuperated larvae number through the digestion of lung and brain of *T. canis* infected male rats with different treatments. Int-infx; infected rats, Sh-Hpx-infx; simulated hyphophysectomy surgery infected rats, Hpx-infx; hyphophysectomy surgery infected rats. Statistical difference between means \* $p < 0.05$ .

dividing the number of recovered larvae in those tissues with the total number of larvated eggs used for infection was: In lungs, a) Intact Infected (Int-Infx): 3.18%, b) Sh-Hpx Infected (Sh-Hpx-Infx): 2.9% and c) Hpx Infected (Hpx-Infx): 1.42%. In brain was: a) Intact Infected (Int-Infx): 4.35%, b) Sh-Hpx Infected (Sh-Hpx-Infx): 2.91% and c) Hpx Infected (Hpx-Infx): 2.56%. A significant decrease in larvae number was observed in the lungs and brains of Hpx groups (Fig. 1).

In the lungs of all groups of infected animals (Fig. 2), there is an eosinophilic granuloma, with collagen and a core containing epithelioid cells, giant multinucleated cells and macrophages, as well as the presence of larvae or larvae debris can be observed. Larvae are often found within a blanket of eosinophils. Outside the collagen capsule of each larva containing granuloma, the presence of a mixed infiltrate was found, predominantly of lymphocytic with a moderate number of eosinophils and neutrophils. No differences were observed in the inflammatory infiltrates between experimental groups (Fig. 2).

### 3.2. Immune system's cell subpopulation

Flow cytometry analysis was performed in order to determine changes in the percentage of innate NK (CD 161+);  $T\gamma\delta$  cells (TCR  $\gamma\delta$ +) and adaptive immune cell subpopulations, such as total T cells (CD3+); T helper cells (CD3+/CD4+); T cytotoxic cells (CD3+/CD8+) and B cells (CD3-/CD45RA+) in the spleen, PLN and MNL of control and infected rats.

#### 3.2.1. Innate immune cells (NK and $T\gamma\delta$ cells)

In the spleen (Fig. 3A) of Sh-Hpx-Ctrl and Hpx-Ctrl animals (gray bars), NK cells population is decreased. As to changes due to infection, also in the spleen, a clear decrease was observed in the Sh-Hpx group (4-fold). In the PLN there is a two-fold increase in the NK cells in the Hpx-Ctrl animals, while in the MLN, there is no difference in all Ctrl groups.

In the Infx animals (black bars), there is a decrease in NK cells in the Sh-Hpx-Infx and Hpx-Infx groups in the spleen and MLN (Fig. 3A, C).

$T\gamma\delta$  cells showed an increase (1.5 fold) in the spleen of Sh-Hpx-Ctrl animals group (Fig. 3D). However, when we compare control versus infected groups (grey bars vs black bars), Sh-Hpx and Hpx groups, show a decrease in the percent of  $T\gamma\delta$  cells in the spleen (Fig. 3D). In PLN there is no difference in the percent of  $T\gamma\delta$  cells among all groups (Fig. 3E), whilst in MLN only Hpx-Infx group, there was a 2-fold increase in  $T\gamma\delta$  cell. (Fig. 3F).

#### 3.2.2. Adaptive immune system cells (T-helper cells, T cytotoxic cells)

Total T cells (CD3+) in the spleen, only showed a decrease in the Sh-Hpx due to infection (grey bar vs black bar), with no change in the percent of CD3+ in all the other groups (Fig. 4A). As for the PLN, the opposite pattern was found: CD3+ only showed an increase in the Sh-Hpx due to infection (grey bar vs black bar), with no changes among all other groups (Fig. 4B). As for the MLN, if we compare the groups of Int-Ctrl animals, there is a decrease of 2.4-fold in the Sh-Hpx-Ctrl group, and the opposite in the Hpx-Ctrl group: an increase of 2-fold compared to the Int-Ctrl group (Fig. 4C). In the Infx groups (black bars) there are no changes in CD3+ cells, not due to treatment (Fig. 4C). However, if we compare Ctrl versus Infx groups (grey bars vs black bars), an increase in the percent of total T cells are observed in the Sh-Hpx group (3-fold), while in the Hpx group, a decrease is observed (50%) (Fig. 4C).

In the case of T helper (CD4+) cells, in the spleen there are no changes in the percent of CD4+ cells if we compare all Ctrl groups (gray bars), but if we compare Ctrl groups (gray bars) versus the Infx ones (black bars), there is an increase in the Ctrl and Sh-Hpx group (2-fold) (Fig. 4D). In PLN, the clearest difference is due to infection (grey bars vs black bars), where all groups have an increase in the percent of CD4+ lymphocytes compared to Ctrl groups (Fig. 4E). Furthermore, same pattern is seen in MLN as in the PLN: all Infx groups have an increase in the percent of CD4+ lymphocytes compared to Ctrl groups

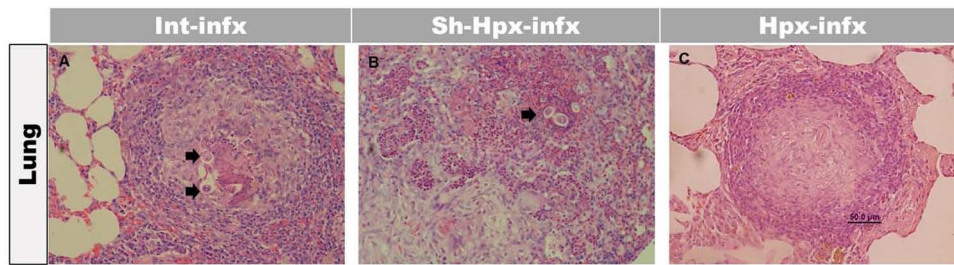


Fig. 2. Inflammatory process in lungs from uninfected and infected rats. The black arrows indicated the presence of *T. canis* larvae. Int-infx; infected rats, Sh-Hpx-infx; simulated hypophysectomy surgery infected rats, Hpx-infx; hypophysectomy surgery infected rats.

(Fig. 4F). In the case of T cytotoxic lymphocytes (CD8 +), in the spleen (Fig. 4G), PLN (Fig. 4H) and MLN (Fig. 4I) the same trend is seen: an increase in the percent of CD8+ cells due to infection in Sh-Hpx and Hpx groups (Figs. 4G–I). In regard to B lymphocytes (CD45RA+ cells), there is a pattern in all Ctrl animals in all studied compartments (gray bars): an increase in the percent of B-cells in Sh-Hpx groups (Fig. 5A–C). However, infection (black bars) induce an increase in B-cells in spleen (Fig. 5A), PLN (5B) and MLN (5C), in Intact and Hpx groups (Fig. 5A–C).

### 3.3. *T. canis* specific antibody production

Production of specific antibodies against the parasite was evaluated. Infection resulted in an increase of specific IgG levels in the Intact and Sh-Hpx groups; however, interestingly, in the Hpx group there was no specific antibody production detected ( $P < 0.001$ ) (Fig. 6).

## 4. Discussion

Pituitary gland is one of the major glands involved in homeostatic maintenance in the body. It is responsible for secreting different hormones, which, in addition to perform their main biological functions,

have been shown to play a role in the regulation of the immune response, such as PRL (Parra et al., 2013) and Arginine- Vasopressin (Rotondo et al., 2016). Additionally, intermediary pituitary hormones play a preponderant role in the release of other hormones, which an immunomodulatory function has been reported, as is the case of sex steroids (Klein and Flanagan, 2016). In different parasitic infections, a hormonal regulation of the immune response has been reported (Roberts et al., 2001; Legorreta-Herrera et al., 2015;). In the case of *T. canis* Toxocariasis, only PRL has been reported as a triggering factor for the migration of somatic larvae to the uterus and mammary gland for transmission of the parasite to offspring (Overgaauw et al., 1998). However, there are no further studies about the regulation of the immune system by prolactin during Toxocariasis.

In here, we evaluated the role of pituitary hormones on the immunological response against the parasite *T. canis* during a chronic infection in an experimental murine model, in order to elucidate the role of these hormones, and on the establishment or elimination of the pathogen. The approaching to this problem, was the elimination of PRL levels, through hypophysectomy, and our results concur and extend the notion of PRL as the regulation of the immune system.

Our results, showed a decrease in the larvae recovered from lung and brain of Hpx-Infx rats compared to Intact-Infx rats. This effect, is

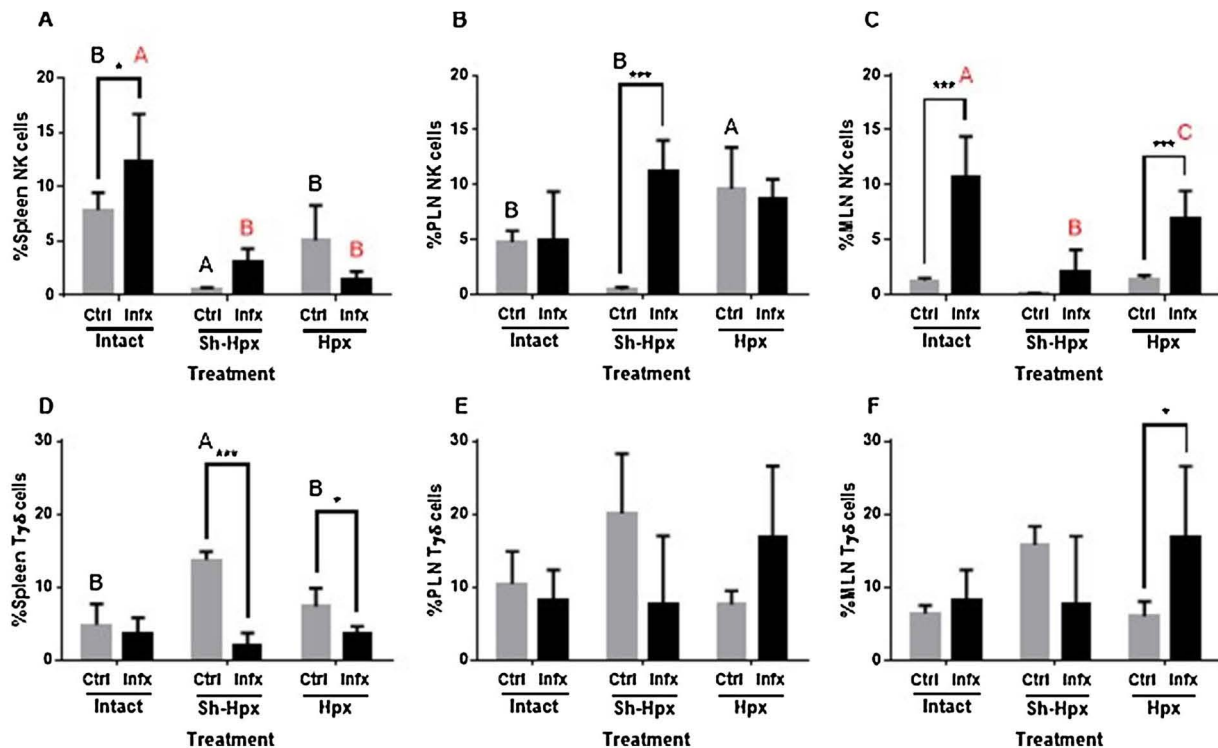


Fig. 3. Percentage of NK (CD161 +) (A, B, C) and Tγδ (TCRγδ +) (D, E, F) cells in spleen, PLN and MLN, from uninfected and infected rats. The data represents the mean average (± SD). \* Significant differences due to infection status (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Letters (A, B, C) show significant differences ( $p < 0.05$ ) due to treatment (surgery). Ctrl; uninfected rats, Infx; infected rats, Intact; untreated rats, Sh-Hpx; simulated hypophysectomy surgery, Hpx; hypophysectomy surgery.

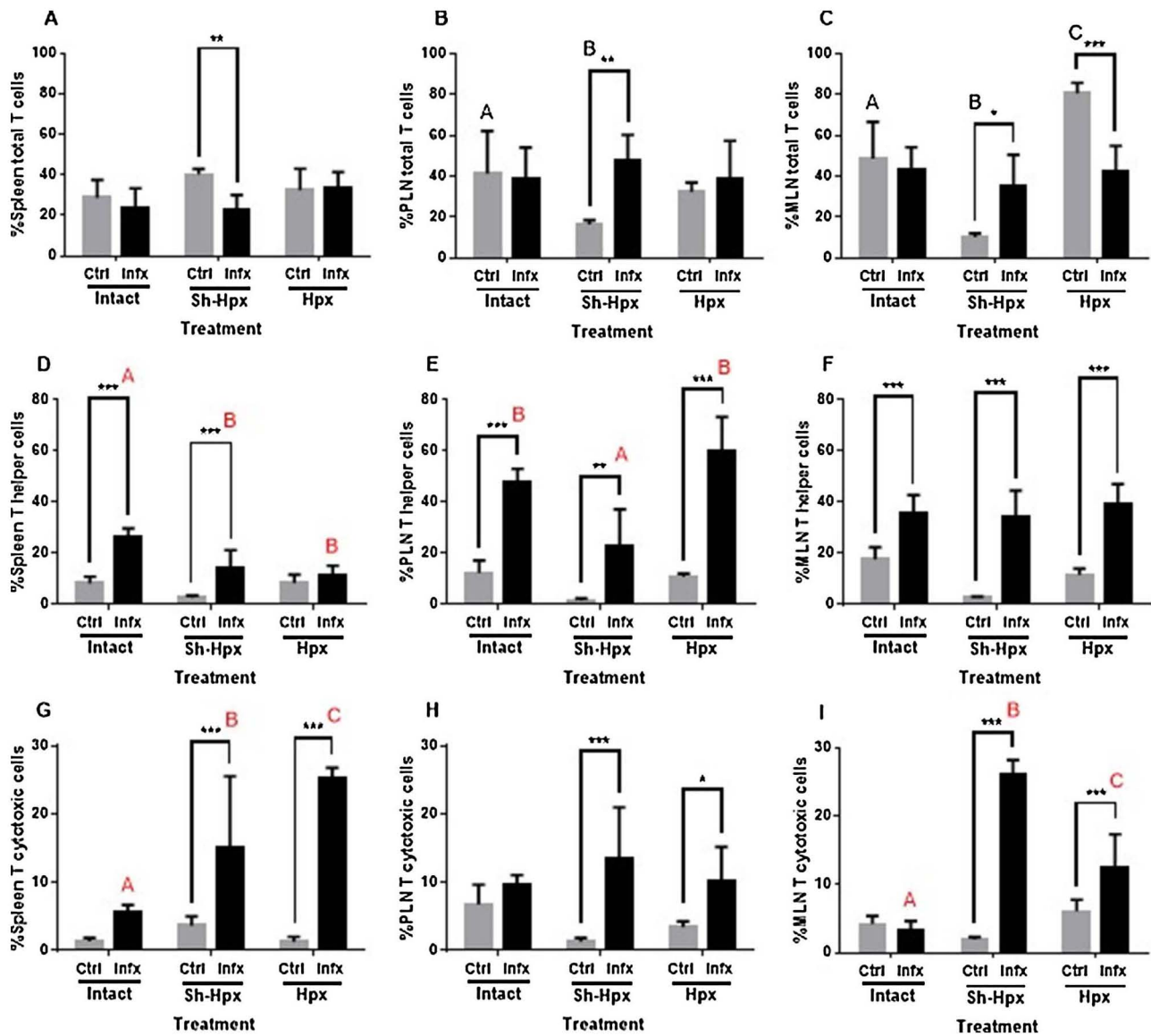


Fig. 4. Percentage of total T cells (CD3 + ) (A, B, C), Th cells (CD4 + ) (D, E, F) and CTLs (CD8 + ) (G, H, I) in spleen, PLN and MLN from uninfected and infected rats. The data represents the mean average ( ± SD). \* Significant differences due to infection status (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). Letters (A, B, C) show significant differences (p < 0.05) due to treatment (surgery). Ctrl; uninfected rats, Infx; infected rats, Intact; untreated rats, Sh-Hpx; simulated hypophysectomy surgery, Hpx; hypophysectomy surgery.

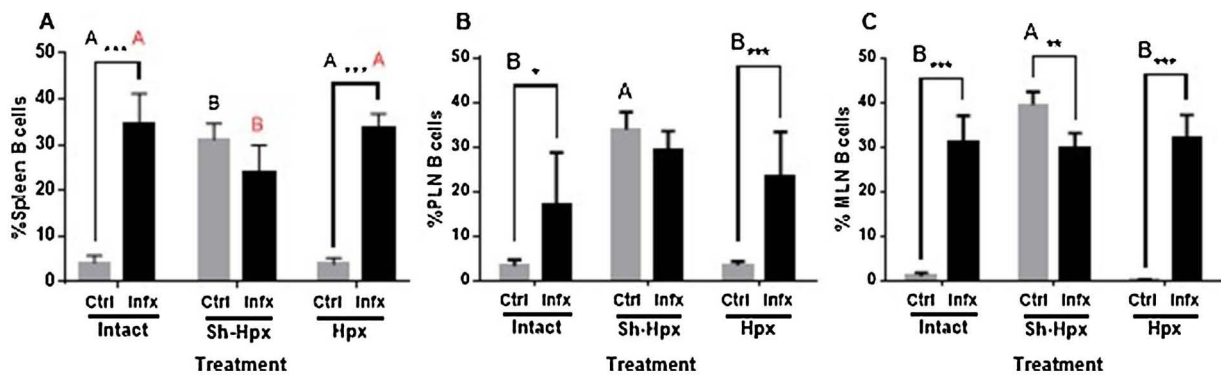


Fig. 5. Percentage of B cells (CD45RA + ) (A, B, C) in spleen, PLN and MLN from uninfected and infected rats. The data represents the mean average ( ± SD). \* Significant differences due to infection status (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). Letters (A, B, C) show significant differences (p < 0.05) due to treatment (surgery). Ctrl; uninfected rats, Infx; infected rats, Intact; untreated rats, Sh-Hpx; simulated hypophysectomy surgery, Hpx; hypophysectomy surgery.

even lower than the reported by Havasióvá et al., who, at 70 days post-infection in C57BL6/J mice, reported a brain recovery level of 10.23% (Havasióvá-Reiterová et al., 1995). On the same line of thinking,

Lescano et al., reported approximately 1% recovery of larvae in the lung and a 3.94% in the brain (Lescano et al., 2004). In another report (using gerbils infected with 1000 larvated eggs of *T. canis* and sacrificed

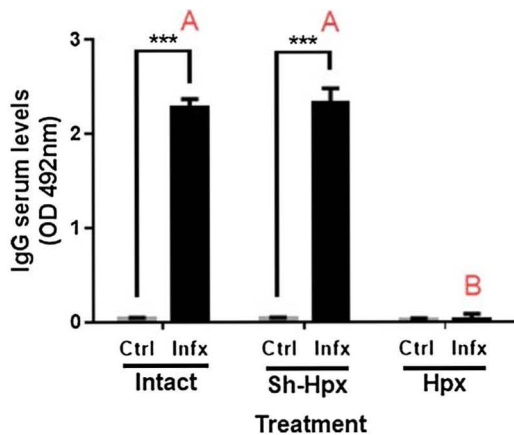


Fig. 6. Specific anti-*T. canis* antibody titration in control and infected male rats. The data represents the mean average ( $\pm$  SD). \*\*\* $p < 0.001$ . Letters (A, B) show significant differences ( $p < 0.001$ ) due to treatment (surgery). Ctrl; uninfected rats, Infx; infected rats, Intact; untreated rats, Sh-Hpx; simulated hypophysectomy surgery, Hpx; hypophysectomy surgery.

at 60 days post-infection) 4.5% of larvae from the brain were recovered, while no larvae were recovered from lung tissue (Alba-Hurtado et al., 2009).

Regarding the evaluation of the role of the hypophysis on other parasitic diseases Quintanar et al. reported a decrease in number and size of adult parasites of *Taenia solium* in hypofisectized hamsters (Quintanar-Stephano et al., 2015). Similarly, Hernández-Cervantes et al. using as a model the acute infection by *Trichinella spiralis* in the golden hamster, reported a decrease in the number of intestinal parasites only when the neurointermedia hypophysectomy was performed (Hernández-Cervantes et al., 2013).

Several studies have observed the role of hormones of the different pituitary axes in the modulation of the immune response. For instance, steroid hormones, besides participating and coordinating various functions in mammals, such as stress, reproduction, sleep, among others, are also able to regulate the immune response against different pathogens (Akmaev, 2010). On the other hand, parasites have developed several mechanisms of survival within the host to help to colonize it. These mechanisms are grouped into 3 types: 1) evasion of the immune response through different strategies such as anatomical exclusion, masking and antigenic variation and molecular mimicry (Damian, 1997) 2) polarization of the immune response of the host to a permissive response of infection and the exploitation of some component of the host by the parasite, (Rosales Borjas and Ortiz Ortiz, 2008) 3) recent evidence suggests a new mechanism of host exploitation by the parasite, where the latter uses directly or indirectly hormones and growth factors produced by the host, which will allow a rapid establishment and greater effectiveness in its reproductive rate, both, key processes in the maintenance of the life cycle of parasites (Escobedo et al., 2005; Escobedo et al., 2009; Morales-Montor et al., 2001; Morales-Montor, 2006).

In inflammatory processes at pulmonary level, sections of larvae surrounded by eosinophilic granulomas can be observed, which are consistent with previous reports on *T. canis* chronic infections in murine models (Parsons et al., 1986).

Our results show, in terms of changes of cellular subpopulations, variations depending on the surgery to which the animals were subjected, the organ being analyzed (spleen, PLN, MLN) and the infection itself. The most relevant changes are mentioned below, in MLN there is an increasing in the percentage of total T cells in Hpx-Ctrl animals, which could indicate that it is independent of the pituitary hormones or that the lymphoid tissue associated to the intestine responds different. On the other hand, in T helper cells an increase in this subpopulation is observed at PLN level and MLN due to infection. This effect agrees with

the increase reported not only in infections caused by this parasite, but also with what has been documented in many other parasites (Allen and Maizels, 2011; Finkelman et al., 2004; Valli et al., 2010). Differences due to infection in both the spleen, MLN and PLN of the Sh-Hpx and Hpx groups are observed in cytotoxic T cells. The increasing in this subpopulation during chronic infection would be consistent with the polarization of the immune response to Th1 occurring during this stage in murine models to produce IFN- $\gamma$  (Pecinali et al., 2005) and thereby collaborate with the formation of the eosinophilic granuloma. B cells are very important in the immune response against *T. canis*, as they are cells that will differentiate into plasmatic cells, responsible for producing specific antibodies against the parasite. Although there are no reports in the literature about the amount of LB during infection, there is evidence that there is an increasing in IgM, IgG (Matsumura and Endo, 1982) and IgE levels (Kaye, 2006). Our data show that the infection causes an increasing in the percentages of these cells in the spleen, the PLN and the MLN of the intact and Hpx groups, however, in the Sh-Hpx-Ctrl group, increase is seen in this subpopulation in the spleen, PLN and MLN.

As for the production of specific antibodies against the parasite, results show that animals of the Hpx-Infx group had no antibody production. In literature, only one study reports that total hypophysectomy leads to a decrease in serum levels of IgM and IgG, in addition to a decrease in IgA at the intestinal level in response to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Campos-Rodríguez et al., 2006), which may be indicative of the importance of pituitary hormones or pituitary axes to establish adequate antibody production.

That effect, and the found by us of a null production of specific anti-*T. canis* antibodies, could be to the lack of estrogens, that help in the process of differentiation of B lymphocytes to plasmatic cells. Thus, B lymphocytes increase, but they do not differentiate to plasmatic cells, and thereby the lack of specific antibodies. More studies are necessary to elucidate why there is this decreased response in anti-*T. canis* antibodies as the result of hypophysectomy.

## 5. Conclusion

In conclusion, the absence of pituitary hormones causes alterations in subpopulations of the immune system, which is reflected in a decrease in the number of somatic larvae in lung and brain. On the other hand, contrary to expectations, there is an absence of production of specific antibodies against for *T. canis*, which is an indication that pituitary hormones are important for the establishment of an appropriate humoral immune response, however, further studies are needed to elucidate the possible mechanisms involved in the absence of antibody production.

## Acknowledgments

Financial support: Grant # IN-208715 to Jorge Morales Montor, was obtained from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), and Grant 176803 from Programa de Fondos Sectoriales CB-SEP, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) also to Jorge Morales Montor. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Victor Hugo Del Río-Araiza is a Doctorate student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas, UNAM., and has a Doctoral scholarship from CONACyT

## References

- Akmaev, I.G., 2010. Current concepts of the interactions of regulating systems: nervous, endocrine and immune. *Usp. Fiziol. Nauk* 27, 3–20.
- Alba-Hurtado, F., Muñoz-Guzmán, M.A., Valdivia-Anda, G., Tórtora, J.L., Ortega-Pierres,



- M.G., 2009. *Toxocara canis*: larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol.* 122, 1–5.
- Allen, J.E., Maizels, R.M., 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 375–388.
- Beaver, P.C., Snyder, C.H., Carrera, G.M., Dent, J.H., Lafferty, J.W., 1952. Chronic Eosinophilia Due To Visceral Larva Migrans. *Pediatrics* 9, 7–19.
- Bowman, D.D., Mika-Grieve, M., Grieve, R.B., 1987. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 75–82.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Campos-Rodríguez, R., Quintanar-Stephano, A., Jarillo-Luna, R.A., Oliver-Aguillón, G., Ventura-Juárez, J., Rivera-Aguilar, V., Berczi, I., Kovacs, K., 2006. Hypophysectomy and neurointermediate pituitary lobectomy reduce serum immunoglobulin M (IgM) and IgG and intestinal IgA responses to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in rats. *Infect. Immun.* 74, 1883–1889.
- Damian, R.T., 1997. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology* 115 (Suppl), S169–S175.
- de Savigny, D.H., 1975. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J. Parasitol.* 61, 781–782.
- Escobedo, G., Roberts, C.W., Carrero, J.C., Morales Montor, J., 2005. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol.* 21 (12), 588–593.
- Escobedo, G., López-Griego, L., Morales-Montor, J., 2009. Neuroimmunoendocrine modulation in the host by helminth parasites: a novel form of host-parasite coevolution? *Neuroimmunomodulation* 16 (2), 78–87.
- Despommier, D., 2003. *Toxocarosis*: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Society* 16, 265–272.
- Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., Urban, J.F., 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol. Rev.* 201, 139–155.
- Havasióvá-Reiterová, K., Tomašovicová, O., Dubinský, P., 1995. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol. Res.* 81, 13–17.
- Hernández-Cervantes, R., Quintanar-Stephano, A., Moreno-Méndoza, N., López-Griego, L., López-Salazar, V., Hernández-Bello, R., Carrero, J.C., Morales-Montor, J., 2013. Regulation of intestinal immune response by selective removal of the anterior, posterior, or entire pituitary gland in *Trichinella spiralis* infected Golden Hamsters. *PLoS One* 8, 14–21.
- Holland, C., O'Connor, P., Taylor, M.R.H., Hughes, G., Girdwood, R.W.A., Smith, H., 1991. Families, parks, gardens and *Toxocarosis*. *Sacnd J. Infect. Dis.* 23, 225–231.
- Jin, Z., Akao, N., Ohta, N., 2008. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitol. Int.* 57, 495–498.
- Kayes, S.G., 2006. Inflammatory and immunological responses to *toxocara canis*. In: Holland, C.V., Smith, H.V. (Eds.), *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. Trowbridge, UK, pp. 158–173.
- Klein, S.L., Flanagan, K.L., 2016. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.90>. advance on.
- Legorreta-Herrera, M., Mosqueda-Romo, N.A., Nava-Castro, K.E., Morales-Rodríguez, A.L., Buendía-González, F.O., Morales-Montor, J., 2015. Sex hormones modulate the immune response to *Plasmodium berghei* ANKA in CBA/Ca mice. *Parasitol. Res.* 114, 2659–2669.
- Lescano, S.Z., Queiroz, M.L., Chieffi, P.P., 2004. Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 627–628.
- Matsumura, K., Endo, R., 1982. Investigation of antibodies against *toxocara canis* in naturally infected puppies. *Zentralblatt für Bakteriologie. Mikrobiol. und Hyg. 1. Abt. Orig. A, Medizinische Mikrobiol. Infekt. und Parasitol.* 253, 139–143.
- Morales-Montor, J., Mohamed, F., Ghaleb, A.M., Baig, S., Hallal-Callerost, C., Damian, R.T., 2001. In vitro effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 87, 1132–1139.
- Morales-Montor, J., 2006. Host hormones as regulators of establishment, growth and reproduction of parasites: can we use this knowledge to control parasite infections? *Parasite Immunol.* 28 (6), 263–265.
- Overgaaauw, P.A., Okkens, A.C., Bevers, M.M., Kortbeek, L.M., 1998. Incidence of patent *Toxocara canis* infection in bitches during the oestrous cycle. *Vet. Q.* 20, 104–107.
- Overgaaauw, Pa, 1997. Aspects of *toxocara* epidemiology: *toxocarosis* in dogs and cats. *Crit. Rev. Microbiol.* 23, 233–251.
- Parra, A., Ramírez-Peredo, J., Reyes-Muñoz, E., Ruiz-Argüelles, A., Ruiz-Argüelles, G.J., 2013. A Th1-type cytokine named prolactin. facts and hypotheses. *Adv. Neuroimmune Biol.* 4, 1–6.
- Parsons, J.C., Bowman, D.D., Grieve, R.B., 1986. Tissue localization on excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine *Toxocarosis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 974–981.
- Pecinali, N.R., Gomes, R.N., Amendoeira, F.C., Bastos, A.C.M.P., Martins, M.J.Q.A., Pegado, C.S., Bastos, O.M.P., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., 2005. Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet. Parasitol.* 134, 121–130.
- Quintanar-Stephano, A., 1994. Hipofisectomía Transfaringea En La Rata (descripción de la técnica). *Vet. Mex.* 25, 13–17.
- Quintanar-Stephano, A., Hernández-Cervantes, R., Moreno-Mendoza, N., Escobedo, G., Carrero, J.C., Nava-Castro, K.E., Morales-Montor, J., 2015. The endocrine-immune network during taeniosis by *Taenia solium*: the role of the pituitary gland. *Exp. Parasitol.* 159, 233–244.
- Roberts, C.W., Walker, W., Alexander, J., 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 476–488.
- Rosales Borjas, D., Ortiz Ortiz, L., 2008. Infecciones parasitarias: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. *Rev. Médica la Extensión Port. - ULA.* 2, 89–98.
- Rotondo, F., Butz, H., Syro, L.V., Yousef, G.M., Di Ieva, A., Restrepo, L.M., Quintanar-Stephano, A., Berczi, I., Kovacs, K., 2016. Arginine vasopressin (AVP): a review of its historical perspectives, current research and multifunctional role in the hypothalamo-hypophysial system. *Pituitary* 19, 345–355.
- Valli, J.L., Williamson, A., Sharif, S., Rice, J., Shewen, P.E., 2010. In vitro cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134, 218–229.

Research Article

# Prolactin as immune cell regulator in *Toxocara canis* somatic larvae chronic infection

Víctor Hugo Del Río-Araiza<sup>1</sup>, Karen Elizabeth Nava-Castro<sup>2</sup>, Fernando Alba-Hurtado<sup>3</sup>, Andrés Quintanar-Stephano<sup>4</sup>, Hugo Aguilar-Díaz<sup>5</sup>, Marco Antonio Muñoz-Guzmán<sup>3</sup>, Pedro Ostoa-Saloma<sup>1</sup>, María Dolores Ponce-Regalado<sup>6</sup> and Jorge Morales-Montor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México D.F. 04510, México; <sup>2</sup>Departamento de Genotoxicología, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>3</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México; <sup>4</sup>Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México; <sup>5</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, INIFAP, Jiutepec, Morelos, México; <sup>6</sup>Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Altos - Departamento de clínicas. Carretera a Yahualica, Km. 7.5. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México

**Correspondence:** Jorge Morales-Montor (jmontor66@biomedicas.unam.mx, jmontor66@hotmail.com)



Toxocariasis is a zoonotic disease produced by ingestion of larval *Toxocara* spp. eggs. Prolactin (PRL) has been considered to have an important role in *Toxocara canis* infection. Recent evidence has found that PRL directly can increase parasite growth and differentiation of *T. canis*. The present study, evaluated the effect of high PRL levels on the immune system's response and parasites clearance in chronic infection. Our results showed that hyperprolactinemia did not affect the number of larvae recovered from several tissues in rats. Parasite-specific antibody production, showed no difference between the groups. Lung tissue presented eosinophilic granulomas typical of a chronic infection in all the experimental groups. Flow cytometry analysis was made in order to determine changes in the percentage of innate and adaptive immune cell subpopulations in the spleen, peripheric (PLN) and mesenteric (MLN) lymphatic nodes. The results showed a differential effect of PRL and infection on different immune compartments in the percent of total T cells, T helper cells, T cytotoxic cells, B cells, NK cells, and T $\gamma\delta$  cells. To our knowledge, for the first time it is demonstrated that PRL can have an immunomodulatory role during *T. canis* chronic infection in the murine host.

## Introduction

*Toxocara canis* (*T. canis*) is the main helminth responsible for Toxocariasis, a disease of medical and veterinarian importance. Adult worms of this parasite usually have dogs, foxes, coyotes, and wolves (mainly pups) as definitive hosts. In Mexico, and in many other places, it is the most commonly found helminth in dogs [1]. *T. canis* also has paratenic hosts, amongst which can be found most mammals (e.g. humans, pigs, sheep, rats, mice etc.), birds and invertebrates such as earthworms and arthropods such as fleas. Toxocariasis is considered as one of the most widely distributed zoonoses due to the ample and close relationship between humans and domestic cats and dogs [2]. The biological cycle of *T. canis* is complex and varies depending on the host type (definitive or paratenic), host's age (pup or adult), and physiological state (gestating or non-gestating). In pregnant bitches, somatic larvae go through a reactivation process consisting of the migration of larvae toward the uterus and mammary glands. It has been previously reported that this process is started by an increased concentration of Prolactin (PRL) in the bloodstream [3]. According to literature review, there are few studies on the role of PRL on *T. canis* infection; however, a study performed in a murine model suggests that the reactivation and migration of somatic larvae toward the uterus and mammary glands could be started by an increased level of this hormone, thus favoring transplacental and lactogenic transmission into the offspring [4]. Another study performed by Reiterová

Received: 27 February 2018  
Revised: 01 June 2018  
Accepted: 18 June 2018

Accepted Manuscript Online:  
19 June 2018  
Version of Record published:  
31 July 2018

et al. [5] with the murine model reported the presence of *T. canis* larvae in mice pups 5 days post-birth, thus evidencing the role of lactogenic transmission in this parasite's life cycle. Besides the apparent role of PRL on *T. canis* larvae reactivation, this hormone also has an immunomodulatory role that has been demonstrated in several studies; Nagy and Berkzi [6] proved that PRL, growth hormone, and placental lactogen administration in previously hypophysectomized rats, that were undergoing an immunodeficient course, had their immune activity restored after the treatment. Another experiment utilizing bromocriptine (a dopaminergic agonist) to selectively inhibit PRL secretion showed similar results, meaning that the decreased immune response, both humoral and cellular, is restored after bromocriptine withdrawal [7]. Moreover, it has also been reported that the immune system is capable of regulating PRL secretion. Cytokines interleukin (IL)-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  can also act as endocrine regulators of hypophysis PRL secretion [8]. Therefore, PRL is currently considered not only as a hormone but also as a cytokine possessing distinct immunomodulating qualities.

Concerning the immune response, it has been reported that during larvae migration inside the host, an adaptive type response is triggered targeting excretion and secretion antigens (TES-Ag) of the parasite, this response is characterized by an increased number of T lymphocytes (TL), helper TLs (Th), and cytotoxic TLs (CTLs). On the other hand, it also stimulates macrophages to produce ILs. IL-4 promotes a Th2 response increasing cytokines such as IL-5, IL-6, and IL-13 [9-11]. An increased IL-4 stimulates in turn the proliferation and maturation of B lymphocytes (BL), isotype IgM switch to IgE and specific IgG production, besides contributing to the stimulation of mastocytes that elevate the inflammatory response. These antigens also induce an increased concentration of IL-5, a powerful eosinophil inductor [12], characteristic of this infection. In addition to stimulating a Th2 response, an increased plasmatic level of IFN- $\gamma$  has been observed in murine models, characteristic of a Th1 response [13]. IFN- $\gamma$  acts on T, BL, NK cells, and macrophages; it is a key modulator of cell-mediated immunity. An association between IFN- $\gamma$  and IL-3 has been described in the formation of eosinophilic granulomas in pathogen-related diseases (schistosomiasis) or in autoimmune diseases. These granulomas are also present due to *T. canis* chronic infection in the different organs and tissues through which it migrates [14,15]. Often, larvae remain within these granulomas until stimulated to do otherwise, by PRL per example, thus triggering their migration toward the uterus and mammary glands in order to be transmitted into the offspring.

Based on these observations, the present study aims to evaluate the immune system's behavior and the migration of *T. canis* somatic larvae under normal and hyperprolactinemia conditions in a murine model, seeking a better understanding of a host-generated response and the possible transregulating mechanisms of the parasite.

## Materials and methods

### Ethics statement

Animal care and experimentation practices at Universidad de Aguascalientes and the Instituto de Investigaciones Biomédicas were constantly evaluated and approved by both Institute's Animal Care and Use Committee (Comité de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación, CICUAL, permit number: 201-2016) adhering to the official Mexican regulations (NOM-062-ZOO-1999). Mexican regulations are in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH) of the U.S.A., to ensure compliance with established international regulations and guidelines. The rats were killed using anesthesia overdose (Sevorane<sup>®</sup>) followed by decapitation. Efforts were made to minimize suffering.

### Animals

A total of 30 Wistar male rats were used (2 months old) in each round of experiments, kindly provided by the Bioterium of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM). The animals were organized into six groups and allocated in polycarbonate boxes (50 cm l  $\times$  23 cm w  $\times$  21 cm h). The groups were distributed as follows: (i) untreated control (Int-Ctrl  $n=5$ ), (ii) untreated infected (Int-Infx  $n=5$ ), (iii) simulated adenohipofisis implant in renal capsule surgery (Sham) control (Sh-HPRL-Ctrl  $n=5$ ), (iv) simulated adenohipofisis implant in renal capsule surgery (Sham) infected (Sh-HPRL-Infx  $n=5$ ), (v) adenohipofisis implant in renal capsule surgery control (HPRL-Ctrl  $n=5$ ), and (vi) adenohipofisis implant in renal capsule surgery infected (HPRL-Infx  $n=5$ ). Two rounds of experiments were performed. Animals were kept in cycles of 12 h of light/darkness. Water and food (Harlan 2019S Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet Sterilizable) were supplied *ad libitum* in sterile conditions.

## Harvesting and processing of *T. canis* eggs

*T. canis* eggs were obtained from adult parasites collected from the small intestine of naturally infected pups, killed humanely at the Centro de Control Canino de Cuautitlán, Estado de Mexico. Females were separated, rinsed in tap water, and placed in  $1 \times$  PBS. Afterward, uteri were collected by incising the first third of the body. Uteri were placed in physiological saline solution (PSS), eggs were obtained using a fine pore filter. The ova were washed several times in  $1 \times$  PBS and centrifuged at  $3250 \text{ g}$  for 5 min. The sedimented eggs were resuspended in a  $1 \times$  PBS/2% formaldehyde solution and incubated at  $27^\circ\text{C}$  for 28 days to obtain the infective form (embryonated eggs (EE)).

## *T. canis* infection in rats

Previous to infection, the inoculum was washed three times to eliminate the PBS/formaldehyde solution. Eggs were then resuspended in PSS and concentrated to 2000 EE per ml. Infection was performed by intragastric administration using a type Foley metallic probe at 8 weeks of age inoculating 2000 EE per rat.

## Surgical procedures and culling

The procedures were performed at 45 days post-infection, the performed surgeries were: simulated adenohipophysis implant in renal capsule (Sham) and adenohipophysis implant in renal capsule. The adenohipophysis for the implants were obtained from littermates donating females. A total of four adenohipophysis were implanted per rat. To perform the surgery, the back of the rat is shaved to the level of the kidneys and placed on the surgery table in the prone position. The area is cleaned with benzalkonium chloride and an incision is made 2–3 cm above the skin media line. Subsequently, the right kidney is exposed dorsally and with the insulin needle a small incision is made in the renal capsule. Using thin transplants, a sac is formed between the capsule and the kidney being very careful not to break it. When the sac is ready, the adenohipophysis is placed deep inside it, the kidney is returned to its original position and the dorsal wound is sutured. The average time between the pituitary excision and completion of the transplantation was 4–6 min. In general, total surgical time did not exceed 15 min, and full recovery of the animals occurred within 20–30 min [16]. At the end of surgery, the rats were placed in a recuperation chamber (clinical  $\text{O}_2$  + thermic mattress) and administered 5000 UI procaine penicillin G IM every 24 h for 3 days. The animal culling was performed 25 days after surgery by anesthesia overdose (Sevorane<sup>®</sup>) followed by decapitation. Immediately after euthanasia, several tissues were collected, i.e. blood, spleen, liver, lungs, brain, right kidney, peripheral lymph nodes (PLN) and mesenteric lymph nodes (MLN). Concerning the infected animals, the mammary gland was collected by scraping the subcutaneous tissue in the corresponding area.

## PRL levels in serum

PRL levels titration in serum was evaluated using the commercial kit PRL rat ELISA (ALPCO<sup>®</sup>) following the manufacturer's instructions. Results were expressed in ng/ml.

## Larvae recovery

After the moment of euthanasia, lungs, brain, and mammary glands of infected animals were weighted and macerated; tissue was digested in artificial gastric juice (1% pepsin (250 units/mg, SIGMA<sup>®</sup>) and 1% HCl 37% (pH: 2.0) (10 ml of artificial gastric juice/ 1 g of tissue) for 24 h. Samples were centrifuged at  $791 \text{ g}$  for 5 min, and the pellet was resuspended in 1 ml 4% paraformaldehyde. The parasite count involved ten counts per 20  $\mu\text{l}$  sample, the total number of larvae was multiplied 50 times to calculate the number of larvae per milliliter and therefore the number of larvae per gram of tissue, this number was then multiplied times the total weight of the collected organ resulting in the total number of larvae.

## Histopathology

Tissue samples ( $4 \times 4 \times 4 \text{ mm} = 0.6 \text{ mm}^3$ ) were taken from lung, liver, and kidney. Histological sections of 4  $\mu\text{m}$  thickness were made using low profile blades in the microtome, the sections were mounted in slides previously treated with acid alcohol and a 1:10 poly-L-lysine solution; sections were stained with Hematoxylin/Eosin and observed under the microscope at  $20\times$  amplification.

## Flow cytometry

Spleen, PLN and MLN collected at the time of killing were disaggregated using a sterile nylon mesh (70  $\mu\text{m}$ ) and a syringe plunger in  $1 \times$  PBS pH 7.4/4°C. The cell suspension was centrifuged at  $182 \text{ g}$  for 3 min, decanted and resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of erythrocyte lysis buffer (spleen only), incubated for 10 min at room temperature; 700  $\mu\text{l}$  of

FACS buffer were added followed by centrifugation at 182 *g* for 3 min. The supernatant was decanted and the cells resuspended in 500  $\mu$ l of FACS buffer from which 25  $\mu$ l were taken and the cells fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min/37°C in a 96-well plate. Cells were centrifuged at 127 *g* for 5 min and washed with 200  $\mu$ l FACS buffer; 150  $\mu$ l absolute methanol were added and incubated for 10 min/4°C. The plate was centrifuged again at 506 *g* for 3 min, and washed with 200  $\mu$ l FACS buffer; 150  $\mu$ l of primary antibody solution were added to the corresponding wells and incubated for 10 min/4°C. After incubation (following primary antibodies were used: AF 488 anti-rat CD3 (Biolegend, Clone 1F4), PE-Cy5 mouse anti-rat CD4 (BD Biosciences, Clone Ox-35), PE Mouse anti-rat CD8 $\alpha$  (BD Biosciences, Clone Ox-8), PE anti-rat CD45RA (Biolegend, Clone Ox-33), PE anti-rat TCR $\gamma\delta$  (Biolegend, Clone V65), and AF647 anti-rat CD161 (Biolegend, Clone 1F4)). Wells were washed with 150  $\mu$ l FACS buffer after incubation. Cells were finally resuspended in 200  $\mu$ l of FACS buffer and stored at 4°C in the dark. Data analysis was performed using the software FlowJo v7.6.

## TES-Ag purification

TES-Ag was obtained by culturing the *T. canis* larvae according to the method described by de Savigny [17] Purity and integrity of ESA was determined by SDS/PAGE and Coomassie staining, protein content was quantitated by Bradford method [18].

## *T. canis* specific IgG determination

The levels of ESA targeting antibodies in serum were measured indirectly by ELISA optimized according to the antigen's concentration, serum, and conjugate's dilution. Antigen concentration was 1  $\mu$ g/ml, serum dilution was of 1:200 and the conjugate (rat IgG) was diluted as 1:10000. Plate reading was done at 492 nm, 15 s agitation in an ELISA plate reader (Multiscan Ascent).

## Statistical analysis

Data were showed as the mean average  $\pm$  S.D. The results obtained are shown in bar graphics, describing the mean average and S.D. These values were evaluated by two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison amongst all groups. A significant difference was considered when  $P < 0.05$ ; the software GraphPad Prism v6.0 was used.

## Results

### PRL levels in serum

Figure 1 shows the concentration level of PRL obtained in the Int-Ctrl, Int-Infx, Sh-HPRL-Ctrl, Sh-HPRL-Infx, HPRL-Ctrl, and HPRL-Infx groups. An increased PRL concentration can be observed due to infection in the Intact and Sh-HPRL groups compared with the control ( $P < 0.05$ ). Also, note that in the figure that PRL levels are also significantly increased in the HPRL-Ctrl group as compared with the non-infected Int-Ctrl and Sh-HPRL-Ctrl groups.

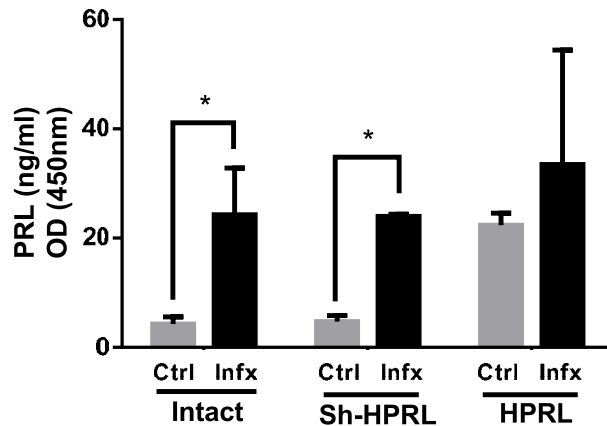
### Larval counts

Parasitic load of lung, brain, and mammary gland is shown in Figure 2. No larvae were recovered from mammary glands in any of the experimental groups. The larvae number recovery in lungs, at 70 days post-infection, were in groups: (i) Int:  $67.32 \pm 13.15$ , (iv) Sh-HPRL:  $46.8 \pm 11.34$ , and (v) HPRL:  $65 \pm 13.62$ . In brain, percentages were: (i) Int:  $87 \pm 29.74$ , (iv) Sh-HPRL:  $54.83 \pm 17.37$ , and (v) HPRL:  $53.76 \pm 16.8$ . We found that a significant decrease in larvae number was observed in the brains of Sh-HPRL and HPRL rat groups.

### Histopathology

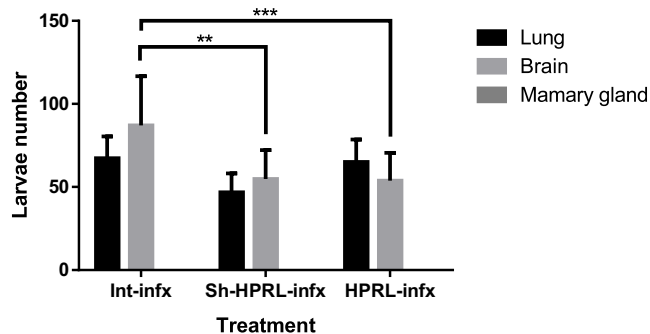
In order to evaluate the effect of PRL on the reactivation of *T. canis* larvae, the histological differences were examined concerning the inflammatory response to infiltration in lungs, liver, and kidney between the infected experimental groups (Figure 3).

In lungs (Figure 3A,D,G), the presence of granulomas, collagen compounds, and a core containing epithelioid cells, giant multinucleated cells, and macrophages, as well as the presence of larvae or remains of the same can be observed. Larvae are often found within a blanket of eosinophils. Outside the collagen capsule of each larva containing granuloma, the presence of a mixed infiltrate was found, predominantly of lymphocytic with a moderate number of eosinophils and neutrophils. Larva-exempted granulomas also had a collagen capsule surrounded by lymphocytes and plasmatic cells, but in the internal core were found the remains of necrotic cells instead of macrophages, epithelioid cells, and eosinophils. No differences were observed in the inflammatory infiltrates between experimental groups.



**Figure 1. Means ( $\pm$  S.D.) of PRL levels in serum from experimental rats**

We used five animals per group, two rounds of experiments. Infection was performed by intragastric administration using a type Foley metallic probe at 8 weeks of age inoculating 2000 *T. canis* eggs per rat. PRL level in serum was evaluated using an ELISA commercial kit. Results were expressed in ng/ml. Data are shown as the mean average  $\pm$  S.D. These values were evaluated by two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparisons amongst all groups. A significant difference was considered when  $P < 0.05$ . Abbreviations: Ctrl; uninfected rats, HPRL; adenohypophysis implant in renal capsule surgery; Infx; infected rats, Intact; untreated rats, Sh-HPRL; simulated adenohypophysis implant in renal capsule surgery. \* $P < 0.05$ .

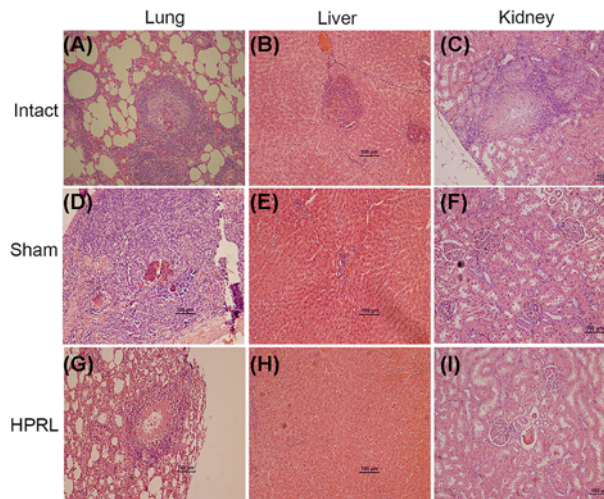


**Figure 2. Mean ( $\pm$  S.D.) of recuperated larvae number through the digestion of lungs and brain of *T. canis* infected male rats with different treatments**

We used five animals per group, two rounds of experiments. Infection was performed by intragastric administration using a type Foley metallic probe at 8 weeks of age inoculating 2000 *T. canis* eggs per rat. After of the moment of euthanasia, lungs, brain, and mammary glands of infected animals were digested in artificial gastric juice for 24 h. No larvae were recuperated from mammary glands. Data were shown as the mean average  $\pm$  S.D. These values were evaluated by two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison a all groups. A significant difference was considered when  $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . Abbreviations: Infx; infected rats, Intact; untreated rats, HPRL; adenohypophysis implant in renal capsule surgery; Sh-HPRL; simulated adenohypophysis implant in renal capsule surgery.

On the other hand, lesions become more evident in the liver tissue of untreated rats, where evidence was found of granulomatous lesions. These lesions show the same organization previously described in lung; however, they were found in lesser quantity and magnitude. There was the presence of macrophages and eosinophils with a certain degree of fibromatosis (Figure 3B,E,H). Lesions are found in minor degree since it is a chronic infection and the liver is a byway organ during the migration of somatic larvae in the early stages of infection.

In kidney, an inflammatory process was observed in the renal cortex area only in the group of intact rats. Likewise, the presence of eosinophilic granulomas composed of a dense layer of collagen and core containing epithelioid cells can be noted. All other experimental groups show undamaged tissues (Figure 3C,F,I).



**Figure 3. Histologic sections of lung, liver and kidney from infected rats.**

(A) Lung intact. (B) Liver intact. (C) Kidney intact. (D) Lung Sham. (E) Liver Sham. (F) Kidney Sham, (G) Lung HPRL. (H) Liver HPRL. (I) Kidney HPRL; 20 $\times$ . Characteristic eosinophilic granulomas can be observed with abundant infiltrate inflammation. The exterior zone is mainly composed of fibrocytes and collagen. In the interior zone, eosinophils and larvae can be observed. We used five animals per group and two rounds of experiments. Infection was performed by intragastric administration using a type Foley metallic probe at 8 weeks of age inoculating 2000 *T. canis* eggs per rat. Tissue samples were taken from lung, liver, and kidney. Histological sections were made using low profile blades in the microtome, the sections were mounted in slides previously treated with acid alcohol and a 1:10 poly-L-lysine solution; sections were stained with Hematoxylin/Eosin and observed under the microscope at 20 $\times$  amplification. Abbreviations: Intact; untreated rats, HPRL; adenohipophysys implant in renal capsule surgery; Sham; simulated adenohipophysys implant in renal capsule surgery.

## Immune system's cell subpopulation

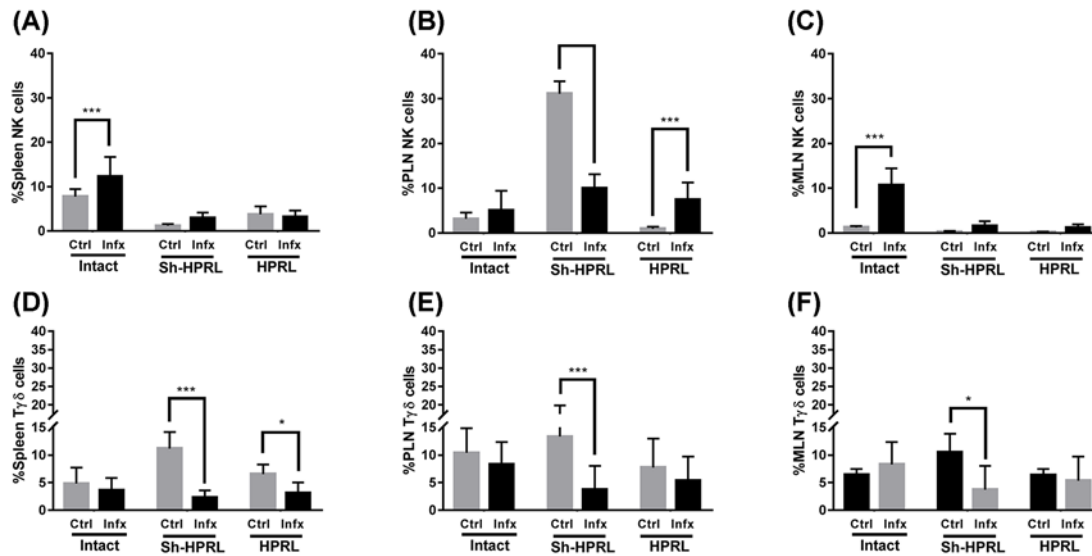
Flow cytometry analysis was made in order to determine changes in the percentage of innate and adaptive immune cell subpopulations in the spleen, PLN and MLN of control and infected mice. Cells were first gated by size and complexity, then we selected them as T cells (CD3+); T cells were then gated as T helper (CD4+) or T cytotoxic (CD8+) (Supplementary Figure S1). B cells (CD45RA+) (Supplementary Figure S2), NK (CD161+) (Supplementary Figure S3), or T $\gamma\delta$  cells (TCR $\gamma\delta$ +) (Supplementary Figure S4).

## Innate immune system's cell subpopulation

NK cells from the spleen may show an increase due to infection in the animals with not surgery (intact) ( $P < 0.01$ ), whereas the differences due to the surgical treatments showed a decrease in the percentage of this subpopulation in both uninfected and infected animals of the Sh-HPRL and HPRL groups ( $P < 0.001$ ) (Figure 4A). In the PLN, there is an increase in the percentage in the SH-HPRL group ctrl ( $P < 0.001$ ), whereas in the HPRL group there is an increase in the proportion due to the infection (Figure 4B). In MLN, an increase in the percentage that is due to infection in intact animals is observed ( $P < 0.001$ ), but at the moment of being submitted to the surgical procedure this difference disappears (Figure 4C). In the spleen T $\gamma\delta$  cells, there is an increase in the percentage of these cells in the SH-HPRL ctrl group ( $P < 0.001$ ), in addition to a decrease due to infection in the Sh-HPRL and HPRL group ( $P < 0.001$ ) (Figure 4D). In PLN and MLN, a decrease due to infection was observed in the percentage in the Sh-HPRL group ( $P < 0.05$ ) (Figure 4E,F).

## Adaptive immune system's cells and *T. canis* specific antibody production

The total T-cell subpopulation (CD3+) in spleen was decreased ( $P < 0.001$ ) in the uninfected HPRL group, but when infected, this decrement is compensated and the percentages become equalized compared with the remaining experimental groups (Figure 5A). In PLN, differences were observed associated with the surgical procedure in the Sh-HPRL ctrl group, in addition to increased proportions of these cells in the Sh-HPRL ( $P < 0.001$ ) and HPRL ( $P < 0.05$ ) groups caused by infection (Figure 5B). On the other hand, the MLN of the uninfected Sh-HPRL and HPRL groups are found in decreased proportion. In the latter groups, there were increased percentages due to infection (Figure 5C). Spleen



**Figure 4. Percentage of NK and T $\gamma$  $\delta$  cells in spleen, PLN and MLN, from uninfected and infected rats**

We used five animals per group and two rounds of experiments. Infection was performed by intragastric administration using a type Foley metallic probe at 8 weeks of age inoculating 2000 *T. canis* eggs per rat. Percentage of NK and T $\gamma$  $\delta$  cells were done by Flow cytometry. Briefly, spleen, PLN and MLN were collected at the time of killing. They were disaggregated using a 70- $\mu$ m sterile nylon mesh. The following primary antibodies were used: AF647 anti-rat CD161 and PE anti-rat TCR $\gamma$  $\delta$ . A secondary antibody solution was added with AF488 or AF647 anti-Rabbit IgG. Data analysis was performed using the software FlowJo v10.0. The data represent the mean average ( $\pm$  S.D.). \*Significant differences due to infection status (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001). Abbreviations: Ctrl, uninfected rats; HPRL, adenohipophysis implant in renal capsule surgery; Infx, infected rats; Intact, untreated rats; Sh-HPRL, simulated adenohipophysis implant in renal capsule surgery.

Th cells showed no differences in percentage in the uninfected groups, whereas they were found decreased in the infected Sh-HPRL and HPRL groups ( $P$ <0.05). There were also increments ( $P$ <0.001) in percentage due to infection in the spleens of the uninfected Sh-HPRL and HPRL groups (Figure 5D). The PLN showed no difference ( $P$ >0.05) between the uninfected groups, whereas the infected Sh-HPRL and HPRL groups showed a decreased percentage of these cells; additionally, all the infected groups showed increased proportions (Figure 5E). Concerning the MLN cells, no differences were found between the infected and uninfected groups; regardless, in all cases, infection produced an increased proportion of cells (Figure 5F). Spleen CTLs showed no differences between the infected and uninfected groups ( $P$ >0.05) and the infection induced effect on these cells was only observed in the HPRL group, where and increased proportion was found (Figure 5G). The PLN cells showed no difference in percentage of CTLs between the treatments in both uninfected and infected groups, differences in percentage were observed only after infection in the Sh-HPRL and HPRL groups (Figure 5H). Neither there were any significant differences in MLN of the uninfected groups; on the other hand, the infected groups showed an increased percentage ( $P$ <0.001) of the CTL subpopulation in the Sh-HPRL and HPRL groups. Infection produced changes were present in the Sh-HPRL and HPRL groups (Figure 5I).

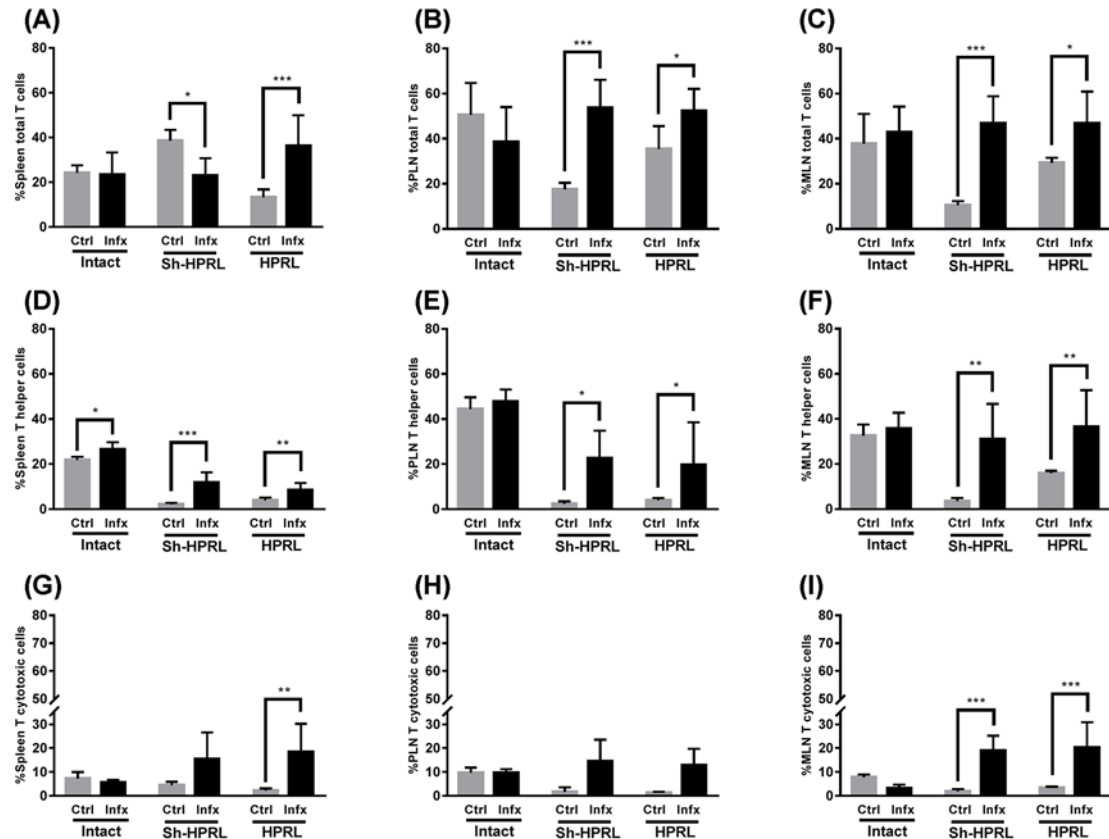
B-cell percentages in spleen, PLN and MLN were increased due to infection in the untreated and HPRL groups, whereas in MLN a decreased percentage can be observed in the Sh-HPRL group. Increments can also be observed due to treatment in the uninfected Sh-HPRL group in three organs, and a decrement can be observed only in the spleen of infected rats in the Sh-HPRL and HPRL groups (Figure 6A–C).

Finally, parasite-specific antibodies were measured. The infection causes an increased production of IgG specific against the *T. canis* parasite ( $P$ <0.001) in all experimental groups, no significant differences were observed caused by the applied treatments ( $P$ >0.05) (Figure 6D).

## Discussion

The analysis approach for larvae reactivation was performed in three different ways: (i) by evaluating the parasitic load in different organs, particularly in the mammary gland; (ii) by determining the specific antibody titration targeting the parasite; and (iii) by observing the inflammatory process present during infection. On the other hand,



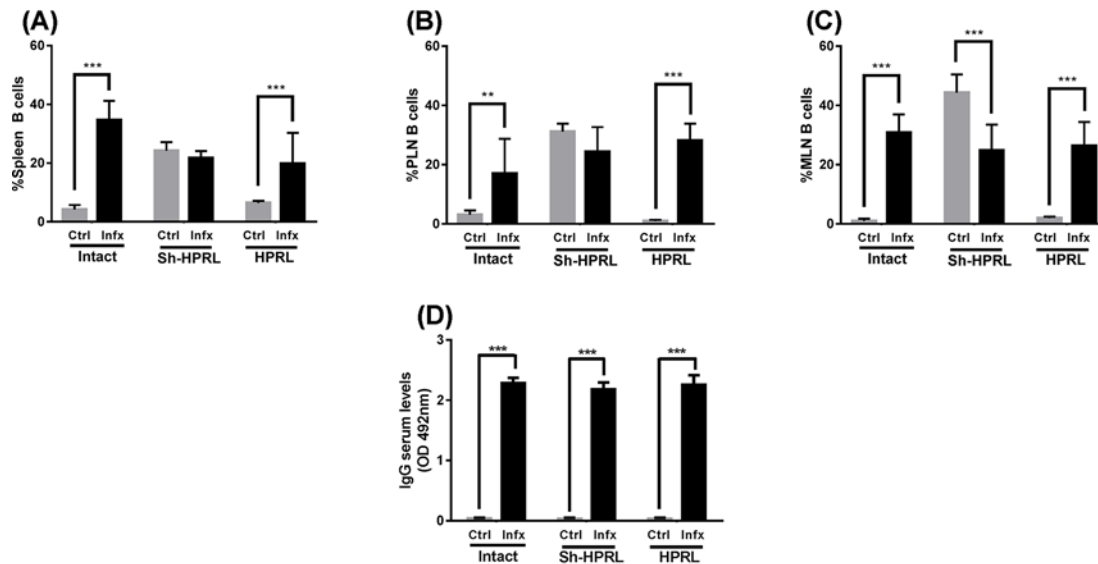


**Figure 5. Percentage of total T cells (CD3+), Th cells (CD4+) and CTLs (CD8+) in spleen, PLN and MLN from uninfected and infected rats**

We used five animals per group and two rounds of experiments. Infection was performed by intragastric administration using a type Foley metallic probe at 8 weeks of age inoculating 2000 *T. canis* eggs per rat. Percentage of T cells (CD3+), Th cells (CD4+), and CTLs (CD8+) in spleen, PLN and MLN were performed by Flow cytometry. Briefly, spleen, PLN and MLN were collected at the time of killing. They were disaggregated using a 70- $\mu$ m sterile nylon mesh. The following primary antibodies were used: AF 488 anti-rat CD3, PE-Cy5 Mouse anti-rat CD4, PE Mouse anti-rat CD8 $\alpha$ , PE. A secondary antibody solution was added AF488 or AF647 anti-Rabbit IgG. Data analysis was performed using the software FlowJo v10.0. The data represent the mean average ( $\pm$  S.D). \*Significant differences due to infection status (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001). Abbreviations: Ctrl, uninfected rats; HPRL, adenohypophysis implant in renal capsule surgery; Infx, infected rats; Intact, untreated rats; Sh-HPRL, simulated adenohypophysis implant in renal capsule surgery.

the role of PRL was analyzed in different cells of the immune system, where their behavior was determined under normal, infected, and hyperprolactinemic conditions. The advantages of analyzing larvae reactivation in males are: (i) lack of estrous cycle; (ii) low PRL and female sex steroid levels; and (iii) normally undeveloped mammary glands. Although a fully developed mammary gland could not be achieved in the experimental groups, the hyperprolactinemic conditions did generate some degree of growth and, despite this PRL induced growth, no larvae migrated into these mammary glands.

Our results indicate lower larvae recuperation percentages from lungs at 70 days post-infection than those previously described by Havasiová-Reiterová et al. [19], which report a 10.23% larvae recuperation in brain at 70 days post-infection in C57BL6/J mice infected with 1000 HL. In another experiment performed on Wistar rats infected with 500 HL and killed at 60 days post-infection, only ~1% of larvae were recuperated from lungs and 3.94% from brain tissue [20]. Obtained data from gerbil infected with 1000 HL and killed at 60 days post-infection show a recuperation of 4.5% from brain, whereas no larvae were recuperated from lungs [21]. These data show that the migration of *T. canis* L2 can vary depending on factors such as the animals species utilized and time of infection, besides host type, age, and gender. Generally speaking, it could be suggested that the migration pattern in paratenic hosts is similar



**Figure 6. Percentage of B cells (CD45RA+) in spleen, PLN, MLN, and anti-*T. canis* antibody titration from uninfected and infected rats**

We used five animals per group and two rounds of experiments. Infection was performed by intragastric administration using a type Foley metallic probe at 8 weeks of age inoculating 2000 *T. canis* eggs per rat. They were performed by Flow cytometry. Briefly, spleen, PLN and MLN were collected at the time of killing. They were disaggregated using a 70- $\mu$ m sterile nylon mesh. The following primary antibodies were used: PE anti-rat CD45RA. A secondary antibody solution was added AF488 or AF647 anti-Rabbit IgG. Data analysis was performed using the software FlowJo v10.0. The data represent the mean average ( $\pm$  S.D.). \*Significant differences due to infection status (\*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001). TES-Ag were obtained by culturing the *T. canis* larvae according to the method described by de Savigny [17]. Purity and integrity of ESA was determined by SDS/PAGE and Coomassie staining, protein content was quantitated by Bradford method. The levels of ESA targeting antibodies in serum were measured indirectly by ELISA, Plate reading was done at 492 nm, 15 s agitation in an ELISA plate reader. The data represent the mean average ( $\pm$  S.D.). \*\*\* $P$ <0.001. Abbreviations: Ctrl, uninfected rats; HPRL, adenohipophysis implant in renal capsule surgery; Infx, infected rats; Intact, untreated rats; Sh-HPRL, simulated adenohipophysis implant in renal capsule surgery.

to that occurring in the definitive host. However, larvae distribution depends in great measure upon the species being infected, as it is likely that each one of these species possesses preferred migration sites.

In observing the inflammatory process, our results are in accord with those described by Parsons et al. (1986) [22] who reported the same type of hepatic lesions during chronic toxocariasis (8 months of infection) in BALB/c BYJ mice. Martínez reported similar lesions in lung, liver, and kidney at 60 days post-infection in gerbilis [23]. In the surgically treated groups, no lesions were found in either kidneys or liver, this could be due to an insufficient number of tissue sections performed that could have missed any inflammatory processes or that perhaps larvae had already allocated into muscle tissue, which usually contained the highest number of larvae during chronic infection. None of the experimental groups showed acute inflammatory processes that could suggest the movement of larvae into other tissues such as uterus and mammary glands.

As it has been previously mentioned, PRL has distinct effects in the modulation of the immune system, exerting paracrine and autocrine effects. As to the writing of this manuscript, there are no detailed descriptions concerning how PRL could be affecting the immune system cell subpopulations under hyperprolactinemic conditions caused by adenohipophysis transplants. Neither are there data concerning the joint effect that an additional factor could provoke, such as an antigenic challenge (in this case, the parasite *T. canis*). The findings made by the present study concerning the role of PRL over the percentages of cell subpopulations differs depending upon the type of surgery utilized, the analyzed organs (spleen, PLN, MLN) and infection status.

Concerning NK cells, it has been reported that these respond to PRL stimulation in a dose-dependent manner: PRL concentrations corresponding to a nominal plasmatic value induce cytotoxicity [24], whereas concentrations ten times higher exert a clear inhibitory effect over development, activity, and proliferation after IL-2 activation. Our results show that the percentage of NK cells was independent of plasmatic PRL concentration, although we did find increased percentages due to infection in some experimental groups. Regarding total T cells (CD3+), a decrement

can be observed in the percentage of these cells in the spleen of uninfected HPRL animals. On the other hand, Th cells (CD4+) were found increased in spleen, PLN and MLN due to infection. This goes in accord with the reported increment found not only in infections by this and many other parasites [9–11]. CTLs (CD8+) presented differences due to infection in spleen, MLN and PLN in HPRL animals. The increased percentage of this subpopulation during chronic infection, in addition to the role of PRL as a Th1 cytokine, correlates with the polarization of the Th1 response present during this stage in murine models to produce IFN- $\gamma$  and collaborate in the formation of eosinophilic granulomas [13]. BL (CD45RA+) are most important in the immune response against *T. canis* since they are responsible for producing specific antibodies targeting the parasite. Although there are no reports regarding BL quantity during infection, there is data showing an increased level of IgM, IgG and IgE antibodies [24]. Our results show that, indeed, the infection causes an increased percentage of BL in spleen, PLN and MLN in both untreated and HPRL groups.

Therefore, our interest was in evaluating these parameters under hyperprolactinemic conditions. No evaluation was performed on antibody levels in serum during the course of infection, performing said evaluation up until the moment of killing (70 days post-infection). In an experiment performed on gerbil, it was reported that TES-Ag targeting antibodies in serum were detected at day 10 post-infection and these levels were sustained until 130 days post-infection [21]. This increment and persistence of the antibody response is similar to that observed in humans afflicted by *visceral larva migrans* [25] due to the continuous antigenic stimuli during larvae migration and their localization in different tissues. In these results, are observed the production of specific antibodies in all the infected groups. Unlike expected, no differences were found in the remaining experimental groups. This may be due to the relatively short time of infection, which did not allow antibody level to diminish enough to be statistically different.

During toxocarasis, there is no clear evidence indicating that PRL or other hormones, are essential in the development of the infection, as it has been reported for other parasites. As previously mentioned, PRL has been broadly studied in infections caused by protozoa, where its capacity to elicit a protective Th1 response was observed, e.g. toxoplasmosis [26], leishmaniosis [27], and malaria [28], amongst others. Concerning sex steroids, it has been proved that they may have diverse effects on the advent of several parasitic diseases. Experiments performed by Larralde et al. [29] showed that 17 $\beta$ -estradiol favors the growth and reproduction of the parasite *Taenia crassiceps*. These results in increased parasite load in females, turning this parasitosis into a sex-linked disease. On the other hand, the effects exerted by sex steroids on the immune system become evident during gestation, impacting susceptibility, and/or resistance to parasitic infections in gestating females [30]. Along with these changes in sex steroids levels during gestation, it is important to include PRL since it is also a very important hormone during this stage. The effect of PRL and sex steroids could extend beyond an immune response into the parasite itself. In this sense, the existence is suggested of an exploiting mechanism by the parasite, enabling a faster establishment and effective reproduction, culminating in a progressive and successful infection. This transregulation phenomena have been little explored in parasites. However, there is evidence supporting the notion that a host-parasite regulation or transregulation is possible and, to date, eight parasitic species have been described in this regard including the interaction of steroid and protein hormones. It is known that the treatment *in vitro* of *Plasmodium falciparum* merozoites with cortisol increases the number and size of gametocytes [31]. Likewise, merozoites treated with insulin, estradiol, progesterone, and testosterone considerably increased the number of gametocytes produced *in vitro*, increasing also, same as cortisol, the growth and reproduction of the parasite at this stage. The opposite occurs when these parasites are treated with 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone analog (DHEA), which induces a lower growth rate of up to 25% [32]. On the other hand and as already mentioned, DHEA treatment in cercariae, schistosomula, and adult parasites of *Schistosoma mansoni* inhibit viability and oviposition [33], whereas amastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with epidermal growth factor increased their proliferation [34]. With the information provided by these examples in mind, it is important to highlight the potent transregulator effect that the host's hormones have over the parasite. Concerning *T. canis*, recently it has been demonstrated that PRL *in vitro* treatment, in larvae, accelerated their enlargement and increased their motility. Furthermore, a PRL-like receptor was identified in *T. canis* larvae, and the *in vitro* stimulation with PRL increased the number of these receptors, accelerated the growth and modified the activity of larvae [35].

Interestingly, we found an unexpected observation: PRL level raised after the infection. To our knowledge, this is the first report of PRL changes in rats infected with *T. canis*. A possible explanation is that, when infected by pathogens, including parasites, hosts display a series of responses known as acute phase reactions, which include immune, hormonal, physiological, metabolic, and behavioral changes. In a variety of host–parasite systems, hormonal changes, both in proteic and steroid hormones have been observed in the host [36]. These changes are considered to be adaptive for the parasite, since they facilitate the transmission of parasites between hosts, and/or enhance the probability that parasites are released in an appropriate location, or, the host responds to immunomodulate the response to eliminate the parasite [36]. The hormonal changes are also induced by the parasite to be able to change

behaviors on the host that will help to continue life cycle. In the case of helminth infections, it has been proven that parasites can induce alterations in hormone levels [37,29]. Also, as a result of hormonal changes, the behavior of some hosts is modified, as has been observed in the mouse model infected with *T. crassiceps* [38]. Thus, it has been proposed that helminths are able to induce modifications in the hormonal levels, and behavior of their hosts, in order to facilitate their transmission. In the case of infestation with *T. canis*, it is unknown whether there is an association between the observed PRL levels and possible behavioral changes and the synthesis of antibodies, or with the particular pro-inflammatory cytokine profile induced during chronic infestation.

## Conclusion

In conclusion, the results obtained concerning PRL involvement and infection effect on the immune system differed depending upon the surgical treatment to which the rats were subjected. PRL alone may not reactivate migration of *T. canis* somatic larvae in hyperprolactinemic male rats.

## Funding

This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), grant number IN-208715 to J.M.M.; VHRA is a Ph.D. student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and has a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) scholarship number 447277.

## Competing interests

The authors declare there are no competing interests associated with the manuscript.

## Author contribution

V.H.R.D.-A. performed the surgeries, infections, antibody titers, flow cytometry and histopathology, and drafted the present paper. K.E.N.-C. performed the flow cytometry analysis and drafted the present paper. F.A.-H. isolated eggs to infect and drafted the present paper. A.Q.-S. performed surgeries, measured levels of hormones, and drafted the present paper. H.A.-D. helped in all experiments performed and drafted the present paper. M.A.M.-G. isolated eggs, purified antigens to perform the ELISA for antibody-specific levels and drafted the present paper. P.O.-S. and M.D.P.-R. helped in experimental design, analysis of results, bought reagents, and drafted the present paper. J.M.-M. provided all facilities to perform the research, directed the same, and participated in the design, analysis and writing of the present paper. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## Abbreviations

BL, B lymphocyte; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DHEA, dehydroepiandrosterone analog; EE, embryonated egg; IL, interleukin; MLN, mesenteric lymphatic node; PLN, peripheral lymph node; PRL, prolactin; PSS, physiological saline solution; TES-Ag, targetting excretion and secretion antigen; Th, helper T lymphocyte; TL, T lymphocyte; UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

- 1 del Campillo, M.C. and Vázquez Rojo, F.A. (2001) Parasitología veterinaria. *Parasitología Veterinaria* 652–665
- 2 Despommier, D. (2003) Toxocaríasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Society* **16**, 265–272
- 3 Overgaaauw, P.A., Okkens, A.C., Bevers, M.M. and Kortbeek, L.M. (1998) Incidence of patent *Toxocara canis* infection in bitches during the oestrous cycle. *Vet. Q.* **20**, 104–107, <https://doi.org/10.1080/01652176.1998.9694850>
- 4 Jin, Z., Akao, N. and Ohta, N. (2008) Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitol. Int.* **57**, 495–498, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.06.006>
- 5 Reiterová, K., Tomašovicová, O. and Dubinský, P. (2003) Influence of maternal infection on offspring immune response in murine larval toxocaríasis. *Parasite Immunol.* **25**, 361–368, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00642.x>
- 6 Nagy, E. and Berkzi, I. (1978) Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol.* **89**, 530–537
- 7 Nagy, E., Berczi, I., Wren, G.E., Asa, S.L. and Kovacs, K. (1983) Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* **6**, 231–243, [https://doi.org/10.1016/0162-3109\(83\)90023-1](https://doi.org/10.1016/0162-3109(83)90023-1)
- 8 Spangelo, B.L. and MacLeod, R.M. (1990) The role of immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol. Metab.* **1**, 408–412, [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(90\)90101-8](https://doi.org/10.1016/1043-2760(90)90101-8)
- 9 Allen, J.E. and Maizels, R.M. (2011) Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 375–388, <https://doi.org/10.1038/nri2992>
- 10 Finkelman, F.D. (2004) Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol. Rev.* **201**, 139–155, <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00192.x>

- 11 Valli, J.L., Williamson, A., Sharif, S., Rice, J. and Shewen, P.E. (2010) In vitro cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, Malassezia and Toxocara. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **134**, 218–229, <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.09.023>
- 12 Yamaguchi, B.Y.Y., Suda, T., Suda, J., Tominaga, A. and Takatsu, K. (1988) Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J. Exp. Med.* **167**, 43–56, <https://doi.org/10.1084/jem.167.1.43>
- 13 Pecinali, N.R. (2005) Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet. Parasitol.* **134**, 121–130, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.06.022>
- 14 Meeusen, E. N.T. and Balic, A. (2000) Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today* **16**, 95–101, [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01607-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01607-5)
- 15 Nagy, D., Bede, O., Danka, J., Szénási, Z. and Sipka, S. (2012) Analysis of serum cytokine levels in children with chronic cough associated with *Toxocara canis* infection. *Parasite Immunol.* **34**, 581–588, <https://doi.org/10.1111/pim.12010>
- 16 Lombardero, M. (2006) Vascularization of rat pituitary autografts. *J. Anat.* **208**, 587–593, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00571.x>
- 17 de Savigny, D.H. (1975) In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J. Parasitol.* **61**, 781–782, <https://doi.org/10.2307/3279492>
- 18 Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- 19 Havasióvá-Reiterová, K., Tomašovicová, O. and Dubinský, P. (1995) Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol. Res.* **81**, 13–17, <https://doi.org/10.1007/BF00932411>
- 20 Lescano, S.Z., Queiroz, M.L. and Chieffi, P.P. (2004) Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **99**, 627–628, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000600016>
- 21 Alba-Hurtado, F., Muñoz-Guzmán, M.A., Valdivia-Anda, G., Tórtora, J.L. and Ortega-Pierres, M.G. (2009) *Toxocara canis*: larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol.* **122**, 1–5, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.01.010>
- 22 Parsons, J.C., Bowman, D.D. and Grieve, R.B. (1986) Tissue localization on excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocarosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 974–981, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.974>
- 23 Pablo, M.L.J. (2004) *Detección del depósito de antígenos de excreción- secreción de larvas somáticas de Toxocara canis en los tejidos de jerbos con infección inducida*, Universidad Nacional Autónoma de México
- 24 Kayes, S.G. (2006) *Toxocara: The Enigmatic Parasite* (Holland, C.V. and Smith, H.V., eds), pp. 158–173, CABI Publishing
- 25 Fenoy, S., Cuéllar, C., Aguila, C. and Guillén, J.L. (1992) Persistence of immune response in human toxocarosis as measured by ELISA. *Int. J. Parasitol.* **22**, 1037–1038, [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90067-U](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90067-U)
- 26 Dzitko, K., Malicki, S. and Komorowski, J. (2008) Effect of hyperprolactinaemia on *Toxoplasma gondii* prevalence in humans. *Parasitol. Res.* **102**, 723–729, <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0824-0>
- 27 Gomez-Ochoa, P., Gascon, F.M., Lucientes, J., Larraga, V. and Castillo, J.A. (2003) Lactating females Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) show protection against experimental *Leishmania infantum* infection. *Vet. Parasitol.* **116**, 61–64, [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00209-7)
- 28 Bayoumi, N.K., Elhassan, E.M., Elbashir, M.I. and Adam, I. (2009) Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **103**, 111–117, <https://doi.org/10.1179/136485909X385045>
- 29 Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T. and Romano, M.C. (1995) Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps cysticercosis*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**, 575–580, [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00062-5](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00062-5)
- 30 Krishnan, L. et al. (1996) Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.* **156**, 644–652
- 31 Maswoswe, S.M., Peters, W. and Warhurst, D.C. (1985) Corticosteroid stimulation of the growth of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **79**, 607–616, <https://doi.org/10.1080/00034983.1985.11811968>
- 32 Freilich, D. (2000) 16alpha-bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**, 280–283, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.63.280>
- 33 Morales-Montor, J. et al. (2001) In vitro effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* **87**, 1132–1139
- 34 Ghansah, T.J., Freeman-junior, P., Villalta, F. and Lima, M.F. (2002) Epidermal growth factor binds to a receptor on *Trypanosoma cruzi* Amastigotes inducing signal transduction events and cell proliferation. *Eukaryot. Microbiol.* **49**, 383–390, <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00216.x>
- 35 Chávez-Guitrón, L.E. et al. (2016) The in vitro effect of prolactin on the growth, motility and expression of prolactin receptors in larvae of *Toxocara canis*. *Vet. Parasitol.* **224**, 33–38, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.004>
- 36 Hallal-Calleros, C. et al. (2013) Hormonal and behavioral changes induced by acute and chronic experimental infestation with *Psoroptes cuniculi* in the domestic rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Parasit. Vectors* **6**, 361, <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-361>
- 37 Hernández-Bello, R. et al. (2011) Sex steroids effects on the molting process of the helminth human parasite *Trichinella spiralis*. *J. Biomed. Biotechnol.* **1–10**, <https://doi.org/10.1155/2011/625380>
- 38 Morales-Montor, J. et al. (1996) Inhibition of sexual selection in male mice infected with *Taenia crassiceps cysticerci*. *J. Parasitol.* **82**, 689–693, <https://doi.org/10.2307/3283875>

## **ANEXO II**


### **OTRAS PUBLICACIONES**

RESEARCH

Open Access



# A novel progesterone receptor membrane component (PGRMC) in the human and swine parasite *Taenia solium*: implications to the host-parasite relationship

Hugo Aguilar-Díaz<sup>1</sup>, Karen E. Nava-Castro<sup>2</sup>, Galileo Escobedo<sup>3</sup>, Lenin Domínguez-Ramírez<sup>4</sup>, Martín García-Varela<sup>5</sup>, Víctor H. del Río-Araiza<sup>6</sup>, Margarita I. Palacios-Arreola<sup>6</sup> and Jorge Morales-Montor<sup>6\*</sup> 

## Abstract

**Background:** We have previously reported that progesterone ( $P_4$ ) has a direct in vitro effect on the scolex evagination and growth of *Taenia solium* cysticerci. Here, we explored the hypothesis that the  $P_4$  direct effect on *T. solium* might be mediated by a novel steroid-binding parasite protein.

**Methods:** By way of using immunofluorescent confocal microscopy, flow cytometry analysis, double-dimension electrophoresis analysis, and sequencing the corresponding protein spot, we detected a novel PGRMC in *T. solium*. Molecular modeling studies accompanied by computer docking using the sequenced protein, together with phylogenetic analysis and sequence alignment clearly demonstrated that *T. solium* PGRMC is from parasite origin.

**Results:** Our results show that  $P_4$  in vitro increases parasite evagination and scolex size. Using immunofluorescent confocal microscopy, we detected that parasite cells showed expression of a  $P_4$ -binding like protein exclusively located at the cysticercus subtegumental tissue. Presence of the  $P_4$ -binding protein in cyst cells was also confirmed by flow cytometry. Double-dimension electrophoresis analysis, followed by sequencing the corresponding protein spot, revealed a protein that was previously reported in the *T. solium* genome belonging to a membrane-associated progesterone receptor component (PGRMC). Molecular modeling studies accompanied by computer docking using the sequenced protein showed that PGRMC is potentially able to bind steroid hormones such as progesterone, estradiol, testosterone and dihydrotestosterone with different affinities. Phylogenetic analysis and sequence alignment clearly demonstrated that *T. solium* PGRMC is related to a steroid-binding protein of *Echinococcus granulosus*, both of them being nested within a cluster including similar proteins present in platyhelminths such as *Schistocephalus solidus* and *Schistosoma haematobium*.

**Conclusion:** Progesterone may directly act upon *T. solium* cysticerci probably by binding to PGRMC. This research has implications in the field of host-parasite co-evolution as well as the sex-associated susceptibility to this infection. In a more practical matter, present results may contribute to the molecular design of new drugs with anti-parasite actions.

**Keywords:** *Taenia solium*, Cysticerci, Parasite, Helminth, PGRMC, Hormone receptors, Progesterone

\* Correspondence: [jmontor66@biomedicas.unam.mx](mailto:jmontor66@biomedicas.unam.mx);  
[jmontor66@hotmail.com](mailto:jmontor66@hotmail.com)

<sup>6</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, 04510 Ciudad de México, DF, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Human neurocysticercosis and porcine cysticercosis are caused by the metacestode stage of the cestode parasite *Taenia solium*. Neurocysticercosis is still a serious human health problem, whereas porcine cysticercosis is a veterinary problem in many developing countries and mainly in underdeveloped countries. Neurocysticercosis approximately affects 50 million people worldwide [1–4]. Human neurocysticercosis is considered as an emergent disease in the USA [4]. Swine cysticercosis leads to major economic losses and also promotes continuity of the infectious cycle in humans [5, 6].

One of the most important aspects during *T. solium* infection is the evagination process of *T. solium* cysticerci that takes place in the human gut. Evagination is the key step that will release the adult worm, which can produce thousands of eggs. Infective eggs released with human stools can contaminate the environment and infect pigs, where the eggs rapidly differentiate into cysticerci. Cysticerci are mainly located in the skeletal muscles in pigs or brain tissue in humans, where the most severe symptoms are observed in patients with neurocysticercosis [3, 7].

Some reports show that sex hormones are involved in favoring cysticercosis in female pigs, revealing that the frequency of *T. solium* cysticercosis in pigs is increased during pregnancy, which is characterized by a significant elevation in progesterone levels [8, 9]. As a consequence, the sex hormones might affect the course of *T. solium* parasite infection [10–14]. Furthermore, we have previously found that in vitro treatment with progesterone ( $P_4$  hereinafter) increases evagination and growth of *T. solium* cysticerci [15], thus demonstrating a direct effect of  $P_4$ .  $P_4$  effects could be mediated by the presence of a putative progesterone-binding protein in the parasite resembling either a nuclear classical progesterone receptor (PR), or a membrane receptor. In *T. crassiceps*, another related cestode, we have also demonstrated that  $P_4$  treatment increases parasite loads 2-fold in females and 3-fold in males, as compared to controls [16].  $P_4$  is also able to stimulate in vitro reproduction of *T. crassiceps* cysticerci, suggesting the existence of a progesterone-binding protein in *Taenia* spp. [16]. Likewise,  $P_4$  treatment increases cytoskeleton protein expression including actin, tubulin and myosin in *T. crassiceps*, all prominent components of flame cells belonging to the parasite excretory system [17].

Progesterone can exert its actions through non-genomic mechanisms mediated by the interaction with progesterone-binding membrane proteins including progesterone membrane receptors (mPRs) and the progesterone membrane components (PGRMC-1 and PGRMC-2) [18]. These progesterone membrane components were described to be putative progesterone

receptors HPR6.6 (PGRMC-1) and Dg6 (PGRMC-2) in humans [19].

PGRMC-2 is expressed in several tissues, particularly in the placenta and other tissues belonging to the reproductive system. However, it has been shown that PGRMC-2 can be also expressed in non-reproductive tissues such as liver and nervous tissue. Interestingly, PGRMC-2 has been found in other organisms. To this regard, *Caenorhabditis elegans* has been demonstrated to express Vem-1, an analogous protein to PGRMC-2 in mammals [20]. In the specific case of helminth parasites, there are a few studies reporting the presence of PGRMC receptors. In this regard, numerous sex hormone-receptor-related proteins, including PGRMC, small androgen receptor-interacting proteins, progesterone-receptor associated p48 protein and progestin-induced protein, have been found in *S. japonicum* EST data [21, 22]. Likewise, several nuclear receptors and thyroid-hormone-associated proteins were identified in *S. mansoni* EST data [21–23].

The study of this type of progesterone binding molecules might help to expand knowledge on *Taenia* spp. biology in terms of differentiation, reproduction and development, as well as generating possible pharmacological targets that could be used in anti-helminth drug therapy.

The aim of the present study was to explore the hypothesis that direct effects of  $P_4$  on *T. solium* cysticerci are mediated through a novel steroid-binding parasite protein resembling to PGRMC, by means of in vitro cell cultures, immunofluorescence, flow cytometry, two-dimension electrophoresis (2D-E), protein sequencing, molecular modeling, docking analysis and phylogenetical computational analysis.

## Methods

### Parasites

*Taenia solium* cysticerci were dissected from skeletal muscle of naturally infected pigs. The fibrous capsule that surrounds each parasite was carefully separated using a dissection microscope. Once dissected, cysticerci were placed in tubes containing sterile PBS (1×) supplemented with 100 U/ml antibiotics-fungizone (Gibco, St Louis Missouri, USA). Samples were centrifuged at 800× *g* at 4 °C for 10 min and supernatants were discarded. Pellets containing cysticerci were incubated in Dulbecco's Modified Medium (DMEM) without fetal calf serum supplementation (Gibco). Collected parasites were centrifuged three times at 800× *g* 10 min and washed with DMEM after each centrifugation. After the final wash, viable parasites (complete and translucent cystic structures) were counted using a binocular microscope. Ten viable cysticerci were then collected and dispensed into single 6-well culture plates (Falcon, BD Labware,) using 5 ml DMEM medium (Gibco) each and then incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.



### **In vitro treatment effects of P<sub>4</sub> on *T. solium* cysticerci**

Evaluation of P<sub>4</sub> effects on *T. solium* cysticerci was conducted as previously reported by Escobedo et al. [15]. In brief, for in vitro tests, water-soluble P<sub>4</sub> was obtained from Sigma (St Louis, Missouri) and dissolved in DMEM serum-free culture medium at a final stock concentration of 1 mg/ml and sterilized by filtration using a 0.2 µm Millipore filter. Parasites were cultured in the presence of pure cultured medium or culture medium supplemented with 0.3% ethanol as vehicle (control groups). Also, parasites were separately cultured with 40 nM of P<sub>4</sub>. Cysticerci from all treatments were cultured for 5 days in 5 ml DMEM-medium and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. We carried out daily inspections concerning the scolex evagination and worm length. P<sub>4</sub> reagent was prepared at 100 µl final volume and added to each well containing parasites. The culture media was replaced every 24 h for 5 days. Finally, scolex evagination and worm length were registered using an inverted microscope (Olympus, MO21, Tokyo, Japan). Worm length was considered as the millimetric sum of scolex, neck and strobila.

### **Progesterone-binding protein location in *T. solium* cysticerci by immunofluorescence**

Cultured *T. solium* cysticerci were washed with PBS 1× and embedded in Tissue Tek (Triangle Biomedical Science, Arizona, USA), and immediately frozen at -80 °C until use. Parasitic tissue sections (5 µm) were fixed with frozen acetone for 10 min, washed 3 times in PBS-Tween 0.3% and blocked for 1 h with PBS containing 1% bovine albumin. Cross-sections were then incubated with a 1:100 dilution of PGRMC polyclonal antibody obtained from *T. spiralis* PGRMC (cloned, sequenced, synthesized and produced by Dr. Romel Hernández-Bello, who kindly donated it to us) for 45 min at 37 °C, washed with PBS and then incubated with Alexa 488-conjugated rabbit anti-mouse antibody (Invitrogen, California, USA) at 1:300 dilution. Control experiments were assessed incubating the 5 µm thick tissue sections in the presence of Alexa 488-conjugated rabbit anti-mouse antibody alone at the same dilution. To eliminate background fluorescence, samples were contrasted with 0.025% Evans Blue for 10 min. After two single washings, samples were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc., Boston, USA) and examined with a Carl Zeiss epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Berlin, Germany).

### **Detection of the progesterone-binding protein in tegumental cells of *T. solium* cysticerci by flow cytometry**

*Taenia solium* cells were extracted by cysticerci tissue disruption with nylon mesh and syringe plunger from cultured treated and un-treated parasites as previously

described [24]. In brief, we first disrupted the entire cysticerci by passing them through a 3 ml syringe and then, the remaining “envelope” was macerated by using a nylon mesh “sandwich” (150 µm) and a syringe plunger. At each step we looked for cells at the microscope and found that this procedure was sufficient for having isolated parasite derived cells [24]. Cells were centrifuged at 1680×g for 10 min, and they were resuspended in 100 µl FACS buffer (phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, 2% SFB, 0.02% NaN<sub>2</sub>) and 100 µl paraformaldehyde 4% in PBS 1× (PF4) was added to fix the cells for 10 min at 37 °C. One millilitre of ice-cold MetOH was added immediately after and incubated for 30 min at 4 °C. Cells were centrifuged at 2240×g for 10 min, decanted and washed 3 times with FACS buffer. 30 µl of goat anti-mouse PGRMC polyclonal antibody (donated by Dr. Romel Hernández-Bello) was added and incubated for 10 min. Cells were washed with 1 ml FACS buffer and centrifuged as described above. Finally, cells were incubated with 30 µl of secondary antibody for 10 min. Cells were washed twice, resuspended in 200 µl FACS buffer and stored in dark conditions at 4 °C. Stained cells were registered using a FACSCalibur flow cytometer (Beckton Dickinson, California, USA), and data were analyzed with FlowJo® software.

### **PGRMC-like protein sequencing by 2-DE and mass spectrometry**

Total protein from cultured *T. solium* cysticerci was extracted and quantified as described before. Protein samples were placed in a buffer containing 8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, IPG pH 3–10 (Bio-Rad, California, USA) and bromophenol blue. Immediately after, protein samples were incubated overnight with the first-dimension gel (Amersham, Amsterdam, Netherlands). Once they were accurately hydrated, the first-dimension gel was isoelectrofocussed with a constant voltage on a lineal electric gradient. After this, gel was equilibrated in a buffer containing 6 M urea, 2% SDS, 375 mM Tris pH 8.8, 2% DTT and 20% glycerol for 15 min. Next, the same equilibration process was performed using iodoacetamide 25 mg/ml instead of DTT. Once equilibrated, the gel was separated according to the molecular size of each protein in a second-dimension gel (PAGE-SDS at 12.5%). A single protein spot corresponding to the expected molecular weight and predicted isoelectrical point was cut-out and sequenced by MALDITOF-TOF mass-spectrometry.

### **Modeling, docking and molecular dynamics of the putative progesterone receptor membrane component PGRMC**

Initial model generation was accomplished by using the hydrophilic segment of PGRMC sequence and submitting

it to Rosetta Homology modeling [25]. The sequence used was: SARGKHSNHEKLPNMRKRDFTIQELSQFNGNGP DGRILIAVNGNVFDVTNNGKEFYGKDG PYAIFAGRDA SRSLTMFTTDIPPCIEEYDDLSDLTSDQMKSLEWELQF RERYPLVGKLLSPSEPHHLYESADNEESSQIDALTGSAKP KTDXSNAIYDILCTHCSRPLSILSLFLDFPIVVESSSCAYF VSVCAPVYTSLIVLXVFCFNNAPXFID.

Resulting models clustered close together (RMSD 1.14 to 1.46); only the model ranked first exhibited a surface pocket that could permit a hydrophobic ligand to bind to PGRMC. Thus, after a round of energy minimization, we selected that model to perform ligand docking.

Blind docking was performed using Vina 1.1.2 [26] on a single node from the LNS (Laboratorio Nacional del Supercomputo del Sureste de México). All ligands were obtained from the ZINC database [27] and converted to PDBQT format using the GUI provided by Autodock Tools [28]. Ligands were checked manually against the known chemical structure and all their rotatable bonds were allowed to remain free from restraint during docking. The receptor, i.e. PGRMC, was kept rigid. Docking employed a grid of dimensions  $40 \times 40 \times 40$  with a 1 Å grid size. Exhaustiveness was always set to 5000. Analysis of the docking results was performed in PyMOL as well as Daniel Seelinger's Autodock/Vina plugin.

Molecular Dynamics were performed using AMBER14 [29] in a GPU powered supercomputer. The force field employed was amberff14SB, an all-atom force field, with SPC/E water molecules. The system was solvated in an octahedron and neutralized with sodium ions. Ligands charges were fitted using Gaussian03 and the rest of its parameters taken from GAFF [30]. Simulations were carried out at 300 K; each system was prepared by energy minimizing the water box, then the protein with the water box. The temperature was slowly raised from 0 °C to 300 °C and then a 1 atm pressure applied on the system. The production runs of 100 ns were started after these steps from the docking results. To allow for the equilibration of the ligand in its binding site, only the last 50 ns were employed in further calculations. MMGBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Solvent Accesible [31]) calculations were performed within AMBER. Visualization was done using VMD [32] and figures were prepared with UCSF Chimera [33].

#### Alignment and phylogenetic analysis

The sequence obtained in the present work for progesterone receptor component of *T. solium* was aligned separately with other 21 sequences downloaded from the GenBank database, including 4 sequences for Platyhelminthes, 2 for nematodes, 3 for arthropods and 12 for vertebrates including mammals, birds, reptiles and fish. The alignment included 133 characters (amino acids) and was constructed using Clustal W [34] with default

parameters and adjusted manually within Mesquite [35]. The genetic divergence among taxa was estimated using uncorrected "p-distance" with MEGA version 6 [36]. The tree was constructed with neighbor-joining method and the nodes of the tree were supported with 10,000 bootstrap replicates.

#### Videomicroscopy of live evaginated *T. solium* cysticerci

Live cysticerci were maintained for five days in DMEM medium supplemented with 25 mM HEPES buffer adjusted to pH 7.2 and 30 mM carbonate salts. Parasites were maintained in a humidified incubator at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> environment. Filming motion of live parasites was performed in a microscope (Olympus, MO21).

#### Experimental design and statistical analysis

The response variable used in statistical analyses was the number of evaginated scolices that showed growth and motility in all wells treated with P<sub>4</sub>, compared to untreated. Data of the four replicates of each treatment were expressed as the mean ± standard deviation (SD). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post-hoc* Tukey's test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

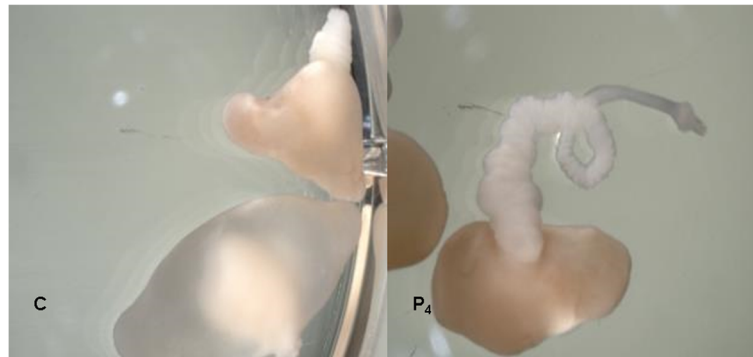
## Results

#### In vitro effects of P<sub>4</sub> on *T. solium* cysticerci

As previously reported, we confirm previous results that, when *T. solium* cysticerci were in vitro exposed to P<sub>4</sub>, an increase in the scolex evagination was observed in all treated parasites as compared to control groups, where only 40% of them spontaneously evaginated (Fig. 1). Evaluation of viability in evaginated cysticerci was carried out daily to determinate worm motility in culture conditions. Clearly, progesterone-treated parasites look much better than control ones (Additional file 1: Movie 1). A close up of a *T. solium* cysticerci treated with progesterone, showed a complete differentiation of the scolex, with rostellum, ventosas, and proglottids. The *T. solium* worm is alive and moving, looking for anchorage to the host. Motility of evaginated cysticerci was constant through all days of in vitro culture, as previously reported (Additional file 2: Movie 2).

#### Detection of the putative progesterone binding protein in *T. solium* cysticerci by flow cytometry

In Fig. 2a, a dot plot showing the *T. solium* cell size and complexity is shown. In fact, parasite cells were approximately 3-fold smaller and exhibited less complexity than other cell types previously analyzed (Fig. 2a). We found *T. solium* cells expressing the PGRMC in basal conditions (Fig. 2b). Interestingly, the expression pattern of the PGRMC was not altered when parasites were stimulated with progesterone (Fig. 2c).

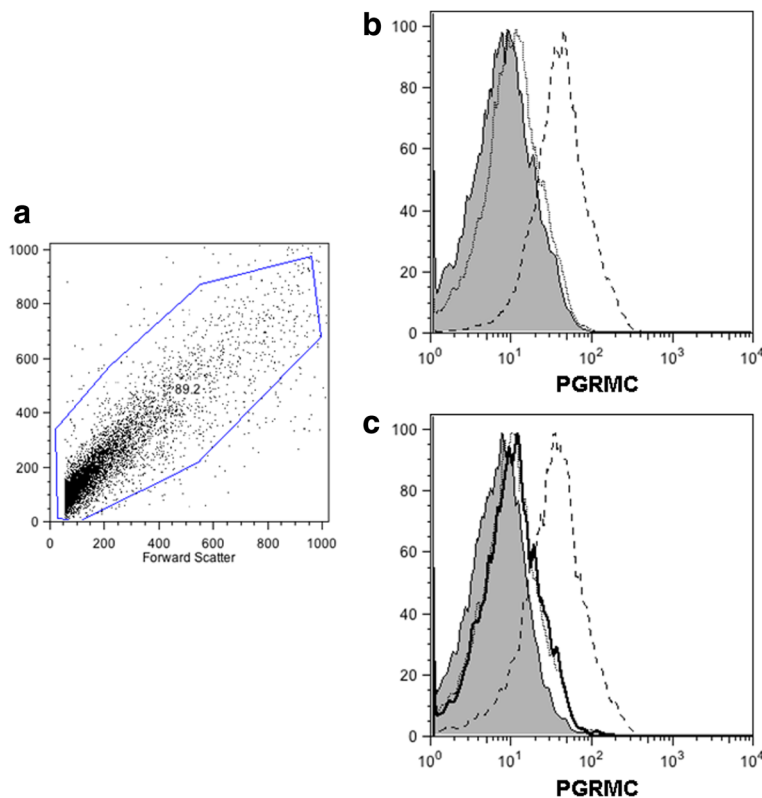


**Fig. 1** Photographs of *Taenia solium* cysticerci in culture. Control cysticerci evaginated after 5 days in culture (C) and cysticerci evaginated after 5 days in culture in the presence of 40 ng of progesterone (P<sub>4</sub>)

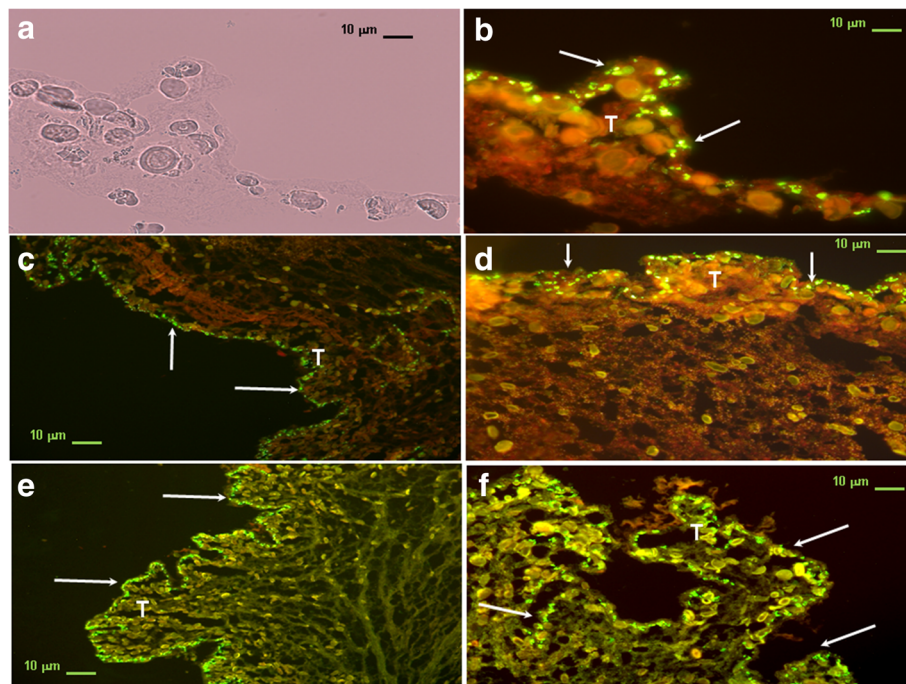
### Immunolocalization of a putative PR-binding protein in *T. solium* cysticerci

Immunofluorescence assays were performed to determine the presence of the progesterone binding membrane protein in the *T. solium* cysticerci. Cysticerci incubated only in the presence of the isotype antibody

and secondary antibody that were used as control, did not give any positive signal related to the progesterone binding membrane protein (Fig. 3a). Our result showed intense fluorescence detected in cysticercus subtegumental cells, revealing that progesterone-binding membrane protein is expressed in parasite cells (Fig. 3b). The



**Fig. 2** Specific detection of the progesterone-binding protein in *Taenia solium* cysticerci by flow cytometry. FACS analysis in *T. solium* cysticercus cells showed the PGRMC expression. In untreated cysticerci used as controls, very few cells presented a low immuno-fluorescent signal, whereas P<sub>4</sub>-treated cysticerci showed few cells with high immunofluorescent signal related to the receptor expressed in the parasite. **a** Size and complexity of *T. solium* cells. **b** PGRMC expression on *T. solium* cells. **c** PGRMC expression on *T. solium* cells after P<sub>4</sub> stimulation. Solid lines show un-stained cells in all cases. Dotted lines correspond to un-specific staining of the secondary antibody and long-dashed lines correspond to the specific staining of PGRMC



**Fig. 3** Progesterone-binding membrane protein location in *Taenia solium* cysticerci by immunofluorescence. **a** Representative transversal sections of *T. solium* cysticerci where tegument, sub-tegument and cells are observed with optical microscopy illumination (Nomarski microscopy). **b** Negative control of immunofluorescence using the secondary antibody. **c** Specific detection of progesterone binding membrane protein in parasite cells mainly located all along subtegumental tissue (magnification of 100x). **d** Detail of **c** showing *T. solium* cells expressing PGRMC exclusively on subtegument cells (arrows) at higher magnification (400x) from shows in. **Abbreviations:** T, tegumental cells; GL, germinal layer. **Scale-bars:** **a**, 10  $\mu$ m; **b**, 10  $\mu$ m; **c**, 10  $\mu$ m; **d**, 10  $\mu$ m; **e**, 10  $\mu$ m; **f**, 10  $\mu$ m

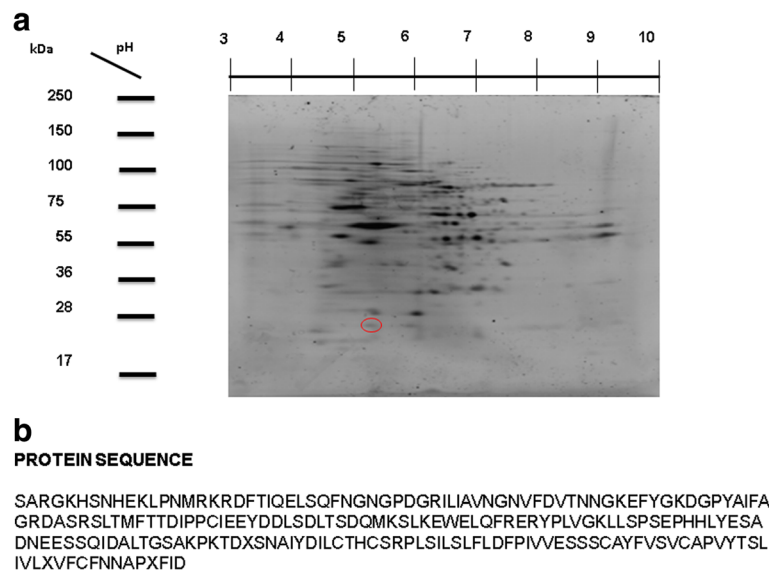
distribution of the expression of the positive cells for PGRMC, is surrounding all the tegumental tissue (Fig. 3c). This finding confirmed that experimental conditions were optimal for detecting exclusively tegumental parasite cells expressing progesterone-binding membrane molecules and not false positive signals (Fig. 3d-f).

#### 2D-E and localization of PGRMC

Total proteins from *T. solium* cysticerci were separated in a pH range of 3–10, according to their isoelectrical point (IP) and molecular weight (Fig. 4a). Moreover, a well-defined protein spot around pH 5 and 25 kDa was recognized, corresponding to the IP of most of the sequenced PGRMC (Fig. 4a). Sequence of the corresponding protein spot of PGRMC is shown in Fig. 4b. Interestingly, this sequence showed high homology (90%) to those sequences included in the *T. spiralis* genome (GenBank: EFV58821.1) [37]; *S. japonicum* genome (GenBank: CAX73419.1) [38]; *S. haematobium* genome (GenBank: KGB35529.1) [39]; and *E. granulosus* genome (GenBank: CDS20257.1) [40]; and 100% homology to the sequence annotated in the *T. solium* genome (PRJNA170813, Worm Base Parasite) [40].

#### Modeling PGRMC and docking to progesterone

Homology modeling of the first 136 residues of PGRMC (sequence detailed in Methods) yielded a globular protein containing 19.1% alpha-helix, 14.7% beta-sheet and 25% without any predictive secondary structure (Fig. 5). This domain was found to be similar to a cytochrome b5, member of a family of steroid-binding proteins. Residues 137 to 217 were not modeled since no homology was found to any known protein and were excluded from docking analysis. Results from blind docking are shown in Table 1. Binding of steroids to our model is about 1 kcal/mol higher than to the control molecules, i.e. fatty acids. While steroids consistently found the same binding site (Fig. 5), fatty acids preferentially located either to an unstructured region of the model or to the same binding site as steroids. The binding site identified by docking contains a set of hydrophobic residues: F55, Y62, F77, W105 and T78 and R112 (numbering according to Methods). Since docking allows for the rotation of bonds within the ligand but not for the protein, we performed molecular dynamics simulations starting from the docking results for progesterone and stearic acid (Fig. 5a). The latter was selected as reference for MMGBSA, a method to estimate the relative binding



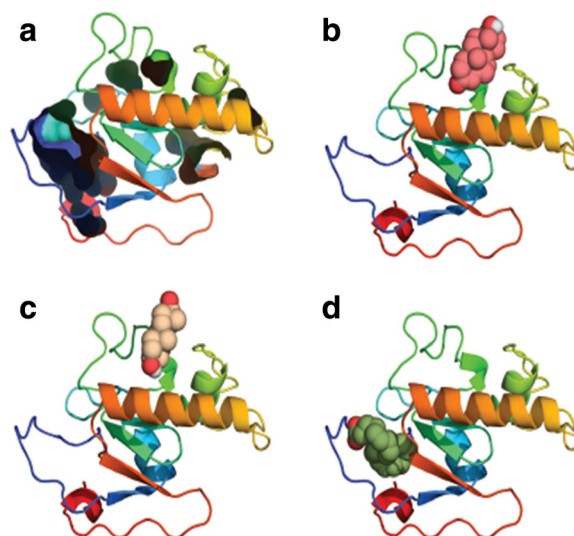
**Fig. 4** *Taenia solium* PGRMC characterization by 2D-E. **a** A representative 2D-E gel showing the location of the protein spot selected for sequencing (red ellipse). **b** Sequence obtained from protein spot by MALDI-TOF and used in further molecular analysis

energies ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ). Our simulations show that the binding site located by docking is indeed stable for 100 ns for both ligands,  $P_4$  and stearic acid. For the actual calculations, only the last 50 ns were used.  $\Delta G_{\text{bind}}$  for  $P_4$  and stearic acid were estimated as  $-26.9 \pm 2.9$  and  $-25.7 \pm 3.8$ , respectively. Their  $\Delta G_{\text{bind}}$  is  $-1.2$  in line with the  $-1.4$  obtained through docking. It is noteworthy that while their estimated binding energies are similar, the structure of our model experiences a conformational change in the

presence of  $P_4$  but not stearic acid (Fig. 5a), suggesting a conformational change consistent with ligand-induced signaling by  $P_4$  but not stearic acid (Fig. 5).

#### Phylogenetic analysis and sequence alignment

The neighbor-joining tree obtained in the present study, brought to light that the progesterone receptor component of *T. solium* is related to a protein present in *E. granulosus* and both are nested within a cluster including



**Fig. 5** The hydrophilic segment model of PGRMC. The structure is represented as cartoons with N-terminus in blue and the C-terminus in red. In **a** the cavities are represented as surfaces in the progesterone docking, **b** shows docking of testosterone, **c** dehydroepiandrosterone, and **d** arachidonic acid, all of them in a CPK representation. Note that both dehydroepiandrosterone and arachidonic acid bind to a similar site whereas progesterone binds closer to the C-terminus

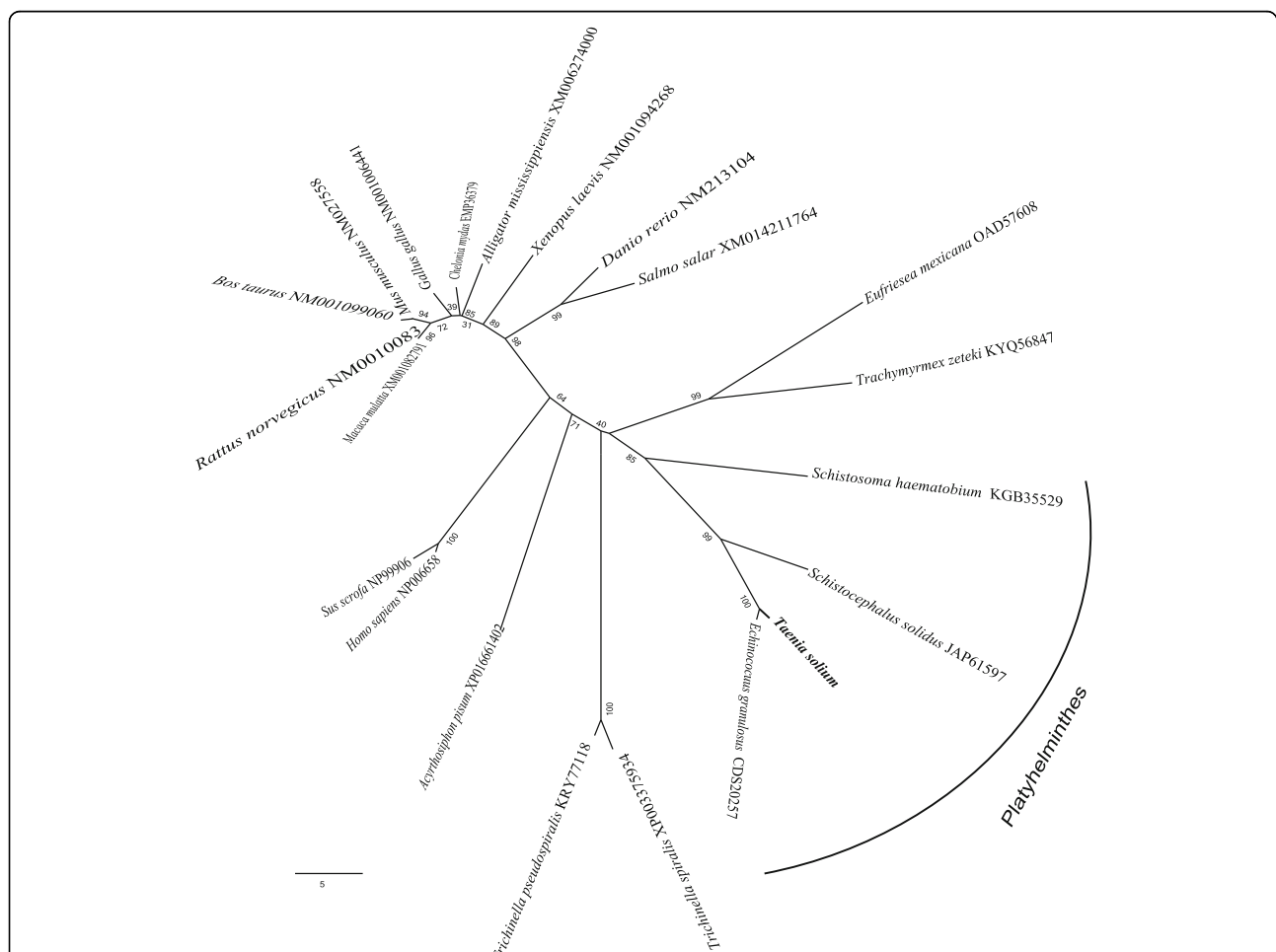
**Table 1** Docking of several hydrophobic compounds to PGRC2. The data presented show the best result for each compound. Score is in kcal/mol, as calculated by Autodock Vina

Rank	Ligand	Score
1	Dehydroepiandrosterone	-7.3
2	Testosterone	-7.2
3	4-Dihydrotestosterone	-7.2
4	Estradiol	-7.1
5	Progesterone	-7
6	β-estradiol	-6.9
7	β-arachidonic	-5
8	Linoleic	-4.9
9	Oleic	-4.7
10	Palmitic	-4.4
11	Stearic	-4.3

other Platyhelminthes such as *Schistocephalus solidus* and *Schistosoma haematobium* with a strong bootstrap support of 85%. The neighbor-joining tree also placed together the two sequences of the progesterone receptor described for nematodes, whereas the three sequences for arthropods and the 12 sequences for vertebrates were spread out in different clusters (Fig. 6). Finally, sequences of the progesterone receptor component in the swine (*Sus scrofa*) and humans conformed a cluster in the tree with 100% bootstrap support. This cluster was very divergent to that progesterone receptor component found in *T. solium* (Fig. 6).

**Discussion**

As previously shown, the effects of P<sub>4</sub> upon scolex evagination and adult worm growth were repeated and confirmed. To this regard, we demonstrated that the possible action mechanism through which P<sub>4</sub> exerts its actions upon *T. solium* differentiation might involve the



**Fig. 6** Neighbor-joining tree (NJT) inferred from a dataset composed of 133 characters and with 21 taxa. PGRMCs from several species of fish, amphibians, reptilians, birds and mammals were analyzed through a NJT for searching probable relationship with the *T. solium* PGRMC identified and sequenced. Numbers near internal nodes show bootstrap replicates

binding to a membrane protein as is the case of PGRMC. Our results show the presence of the progesterone binding membrane protein located at the cysticercus cell surface. This result suggests that helminths seem to have developed a molecule able to recognize progesterone (and possible other steroid hormones) with the aim of mediating its hormonal effects.

Interestingly, our results also suggest that the possible mechanism by which  $P_4$  exerts its actions upon cysticercus differentiation may primarily involve progesterone membrane receptors as well as nuclear PR-like proteins in a second plane. In order to examine the localization of the progesterone binding membrane protein in the *T. solium* cysticercus, immunofluorescence staining was performed. Interestingly, adjacent cells in the cysticercus tegument and subtegument showed intense fluorescent signal suggesting a mechanism where progesterone might be captured from the external environment. The idea is supported by the fact of having found PGRMC expression in cysticercus cells by flow cytometry. We found that *T. solium*-derived cells expressed some protein resembling the PGRMC. This finding may suggest that a putative steroid-binding protein present in the parasite might mediate  $P_4$  effect in the differentiation process of *T. solium*. Results also showed a slight increase in the amount of PGRMC on cysticercus cells treated with  $P_4$  as compared to cells derived from parasites cultured under control conditions. This finding suggests that  $P_4$  is able to increase the PGRMC expression, thus promoting scolex evagination.

Tsai et al. [40] sequenced the *T. solium* genome in 2013 by using the strategy of “shotgun genome sequencing”. From these fragments, construction of genes present in the *T. solium* genome was carried out. These gene constructions opened the possibility of using hardware analysis to detect the presence of different coding sequences contained in the *T. solium* genome. These analyses were performed with bio-computer hardware like EAnnot, SNAP and FgenesH, which in turn are based on algorithms able to find preserved regions including exon-intron junction sites, and polyadenylated sequences. Notably, transcription of both exon-intron junction sites and polyadenylated sequences are partially regulated by the predicted form of the PGRMC [41]. As mentioned in the result section, this sequence 5' and 3' seems to have lost the non-coding regions (UTR's) at the end as well polyadenylation sites [41].

In silico analysis regarding the predicted protein sequence of this transcript, gives place to an open reading frame corresponding to the whole sequence of RNA. The corresponding amino acid sequence was accurately translated using this sequence, by carrying out in silico analysis on the protein topology. Also, 2D-E coupled to mass-spectroscopy sequencing revealed the PGRMC sequence that was used to estimate its binding ability and possible evolutionary origin. As shown in Fig. 5, PGRMC

has two domains corresponding to extra and intracellular compartments. This is consistent with previous works reporting PGRMC-1 and PGRMC-2 found in other species [41–43].

In parallel, using the BLAST platform to find conserve domains in this protein sequence, we determined that PGRMC has a binding domain to steroids in the C-terminal tail (118-to-168 aa sequence). To some extent, present finding disagrees with a previous study where authors claimed the binding domain to steroids is a transmembrane domain [44]. Interestingly, the free-living nematode *C. elegans* presents DAF, which have a nuclear location, and different alleles of the gene that codifies for the receptor, and express those genes depending of the larvae stage of the nematode [20].

Furthermore, we determined that molecular weight of PGRMC in *T. solium* is 24.2 kDa, with isoelectric point around 4.9. In general, the known progesterone receptor membrane components range from 18 to 25 kDa. The *T. solium* PGRMC was detected in the parasite tegument that is the tissue in close contact to the host microenvironment. PGRMC-2 has been mainly detected on reproductive tissues of mammals, including ovary, endometrium, and placenta, where it has been associated with multiple cellular events such as maturation, differentiation and proliferation [42].

Escobedo et al. [15] demonstrated that progesterone, estradiol and testosterone have a direct effect on the *T. solium* cysticercus evagination. Specifically, progesterone increases evagination and parasite growth, whereas androgens induces parasite death [45]. Such different actions might be partially explained due to the fact that PGRMC appears to bind all these steroids with different affinity, which in turn is able to modify its cellular functions, as can be seen in Table 1.

The neighbor-joining tree supported that PGRMC of *T. solium* is closely related to that of *E. granulosus*; both in turn are nested within a cluster, comprising other plathelminths such as *S. solidus* and *S. haematobium*. On the other hand, PGRMC sequences of the natural hosts (pigs and humans) were nested in a different cluster showing significant divergence with respect to *T. solium*.

## Conclusions

A possibly functional PGRMC was found in *T. solium* and is described here. Whether the gene was acquired by *T. solium* through horizontal gene transfer or evolved by mimicry, or simply from common ancestral genes, remains to be elucidated. Our findings provide evidence on the crosstalk between host and parasite at molecular and evolutionary levels, providing new information which may be useful in designing anti-helminthic drugs, with the aim of specifically recognizing parasite cells with minimal secondary effects to the host.

## Additional files

**Additional file 1: Movie 1.** *T. solium* cysticerci control (right cyst) and treated with progesterone (left cyst). Progesterone treated one is evaginated and larger, and it is translucent and completely motile, looking for an anchor to a tissue. The control one, though evaginated, is smaller and it is opaque. (mov 10000 kb)

**Additional file 2: Movie 2.** Close up of a *T. solium* cysticerci treated with progesterone, in which the complete differentiation of the scolex, showing rostellum, ventosas, and proglottids is shown. The *T. solium* worm is alive and moving, looking for anchorage to the host. (mov 10300 kb)

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support of NVIDIA Corporation with the donation of the Tesla K20 GPU used for this research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Funding

Grant # IN-208715 to JMM, was obtained from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), and Grant 176803 from Programa de Fondos Sectoriales CB-SEP, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) also to JMM. HA-D had a postdoctoral fellowship from the Programa de Becas Postdoctorales, DGAPA-UNAM.

## Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Authors' contributions

HAD performed the isolation and culture experiments of the cysts in response to progesterone and drafting of the present paper. KENC made the "detection of the putative progesterone binding protein in *T. solium* cysticerci by flow cytometry" and drafting of the paper. GE made the "detection of the putative progesterone binding protein in *T. solium* cysticerci by immunofluorescence" and drafting of the paper. LDR made the "modeling of the PGRMC and the docking analysis to progesterone" and drafting of the paper. MGv made the phylogenetic analysis and sequence alignment. VHDA made the isolation of *T. solium* cysts from the pig tissues and participated in the cultures and drafting of the paper. MIPA performed the 2D experiments and isolation of the spot to sequencing and drafting of the paper. JMM participated in the design, analysis and writing of the paper. All authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval

Animal care and experimentation practices at the School of Veterinary, UNAM, Cuautitlán, were evaluated and approved by the Institute's Animal Care and Use Committee, and by governmental agencies, in strict accordance with the recommendations set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health of the USA, to ensure compliance with established international regulations and guidelines. Pigs were euthanized to obtain parasites by expert veterinary surgeons that used sodium pentobarbital anesthesia according to previously approved protocols in an effort to reduce animal suffering.

## Consent for publication

Not applicable

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias INIFAP, CP 62550 Jiutepec, Morelos, Mexico. <sup>2</sup>Laboratorio de Genotoxicología y Medicina Ambientales. Departamento de Ciencias Ambientales. Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico. <sup>3</sup>Unidad de Medicina Experimental, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", 06726 México DF, Mexico. <sup>4</sup>Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de las Américas Puebla, Sta. Catarina Mártir, Cholula, C.P 72810 Puebla, Mexico. <sup>5</sup>Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 Ciudad de México, DF, Mexico. <sup>6</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, 04510 Ciudad de México, DF, Mexico.

Received: 2 October 2017 Accepted: 7 February 2018

Published online: 09 March 2018

## References

- Sciutto E, Cárdenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Larralde C, Fleury A. Human neurocysticercosis: immunological features involved in the host's susceptibility to become infected and to develop disease. *Microbes Infect*. 2013;6(7):524–30.
- García HH, Del Brutto OH. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol*. 2005;4(10):653–61.
- Nash TE, Singh G, White AC, Rajshkekar V, Loeb JA, Proano JV, et al. Treatment of neurocysticercosis: current status and future research needs. *Neurology*. 2006;67(7):1120–7.
- White AC Jr. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin Infect Dis*. 1997;24(2):101–13.
- Fan PC, Chung WC. Sociocultural factors and local customs related to taeniasis in east Asia. *Kaohsiung J Med Sci*. 1997;165:647–52.
- Gonzalez AE, Gavidia C, Falcon N, Bernal T, Verastegui M, Garcia HH, et al. Protection of pigs with cysticercosis from further infections after treatment with oxfendazole. *Amer J Trop Med Hyg*. 2001;65(1):15–8.
- Pawlowski Z, Allan J, Sarti E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. *Int J Parasitol*. 2005;35(11–12):1221–32.
- Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reprod Biol*. 2008;8(3):179–211.
- Morales J, Velasco T, Tovar V, Fragoso G, Fleury A, Beltran C, et al. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet Parasitol*. 2002;108(1):41–8.
- Bottasso O, Morales-Montor J. Neuroimmunomodulation during infectious diseases: mechanisms, causes and consequences for the host. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(2):65–7.
- Escobedo G, Lopez-Griego L, Morales-Montor J. Neuroimmunoendocrine modulation in the host by helminth parasites: a novel form of host-parasite coevolution? *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(2):78–87.
- Osorio Y, Bonilla DL, Peniche AG, Melby PC, Travi BL. Pregnancy enhances the innate immune response in experimental cutaneous leishmaniasis through hormone-modulated nitric oxide production. *J Leukoc Biol*. 2008; 83(6):1413–22.
- Santos CD, Toldo MP, Santello FH, Filipin Mdel V, Brazao V, do Prado Junior JC. Dehydroepiandrosterone increases resistance to experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Vet Parasitol*. 2008;153(3–4):238–43.
- Thabet HS, Thabet SS, Ali NM, Ahmed NS. Effects of ovariectomy and thyroidectomy on course and outcome of *Trichinella spiralis* infection in rat. *J Egypt Soc Parasitol*. 2008;38(1):29–46.
- Escobedo G, Camacho-Arroyo I, Hernandez-Hernandez OT, Ostoa-Saloma P, Garcia-Varela M, Morales-Montor J. Progesterone induces scolex evagination of the human parasite *Taenia solium*: evolutionary implications to the host-parasite relationship. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:591079.
- Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, Morales-Montor J. Gonadectomy and progesterone treatment induce protection in murine cysticercosis. *Parasite Immunol*. 2006;28(12):667–74.
- Ambrosio JR, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Ruiz-Rosado A, Sanchez-Orellana PL, Reynoso-Ducoing O, et al. Oestradiol and progesterone differentially alter cytoskeletal protein expression and flame cell morphology in *Taenia crassiceps*. *Int J Parasitol*. 2014;44(10): 687–96.



18. Kowalik MK, Rekawiec R, Kotwica J. The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract. *Reprod Biol.* 2013;13(4):279–89.
19. Gerdes D, Wehling M, Leube B, Falkenstein E. Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors. *Biol Chem.* 1998;379(7):907–11.
20. Runko E, Kaprielian Z. *Caenorhabditis elegans* VEM-1, a novel membrane protein, regulates the guidance of ventral nerve cord-associated axons. *J Neurosci.* 2004;24(41):9015–26.
21. Hu W, Yan Q, Shen DK, Liu F, Zhu ZD, Song HD, et al. Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. *Nat Genet.* 2003;35(2):139–47.
22. Oliveira G, Johnston DA. Mining the schistosome DNA sequence database. *Trends Parasitol.* 2001;17(10):501–3.
23. Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimaraes PE, Ojopi EP, Paquola AC, et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet.* 2003;35(2):148–57.
24. Nava-Castro K, Hernandez-Bello R, Muniz-Hernandez S, Escobedo G, Morales-Montor J. New method to disaggregate and analyze single isolated helminthes cells using flow cytometry: proof of concept. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:257060.
25. Raman S, Vernon R, Thompson J, Tyka M, Sadreyev R, Pei J, et al. Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins.* 2009;77(Suppl. 9):89–99.
26. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455–61.
27. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J Chem Inf Model.* 2012;52(7):1757–68.
28. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30(16):2785–91.
29. Case DA, Darden TA, Cheatham TE III, Simmerling C, Wang J, Duke RE, et al. Amber 9, San Francisco: University of California; 2006.
30. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general Amber force field. *J Comput Chem.* 2004;25(9):1157–74.
31. Miller BR 3rd, TD MG Jr, Swails JM, Homeyer N, Gohlke H, Roitberg AE. MMPBSA.py: an efficient program for end-state free energy calculations. *J Chem Theory Comput.* 2012;8(9):3314–21.
32. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33–8. 27-8
33. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605–12.
34. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(24):4876–82.
35. Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.40 <http://mesquiteproject.org>.
36. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725–9.
37. Mitreva M, Jasmer DP, Zarlenga DS, Wang Z, Abubucker S, Martin J, et al. The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Nat Genet.* 2011;43:228–35.
38. Zhou Y, Zheng H, Chen X, Zhang L, Wang K, Guo J, et al. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature.* 2009;470(7253):345–51.
39. Young ND, Jex AR, Li B, Liu S, Yang L, Xiong Z, et al. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat Genet.* 2012;44(2):221–5.
40. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature.* 2013;496(7443):57–63.
41. Chen C, Sargent C, Quilter C, Yang Z, Ren J, Affara N, et al. Cloning, mapping and molecular characterization of porcine progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) gene. *Genet Mol Biol.* 2010;33(3):471–4.
42. Cahill MA. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;105(1–5):16–36.
43. Wendler A, Wehling M. PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity. *Steroids.* 2013;78(6):555–8.
44. Petersen SL, Intlekofer KA, Moura-Conlon PJ, Brewer DN, Del Pino Sans J, Lopez JA. Novel progesterone receptors: neural localization and possible functions. *Front Neurosci.* 2013;7:164.
45. Ambrosio JR, Valverde-Islas L, Nava-Castro KE, Palacios-Arreola MI, Ostoa-Saloma P, Reynoso-Duicoing O, et al. Androgens exert a cysticidal effect upon *Taenia crassiceps* by disrupting flame cell morphology and function. *PLoS One.* 2015;10(6):e0127928.


Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## A single neonatal administration of Bisphenol A induces higher tumour weight associated to changes in tumour microenvironment in the adulthood

Margarita Isabel Palacios-Arreola<sup>1</sup>, Karen Elizabeth Nava-Castro<sup>1,2</sup>, Víctor Hugo Del Río-Araiza<sup>1</sup>, Nashla Yazmín Pérez-Sánchez<sup>1</sup> & Jorge Morales-Montor<sup>1</sup>

BPA is an oestrogenic endocrine disrupting chemical compound. Exposure to BPA in as early as pregnancy leads to lifelong effects. Since endocrine and immune systems interact in a bidirectional manner, endocrine disruption may cause permanent alterations of the immune system, affecting a future anti-tumoral response. Neonate (PND 3) female syngeneic BALB/c mice were exposed to a single dose of 250 µg/kg BPA. Once sexual maturity was reached, a mammary tumour was induced injecting 4T1 cells *in situ*, these cells are derived from a spontaneous adenocarcinoma in a BALB/c mouse and therefore allows for an immunocompetent recipient. After 25 days of injection, showing no major endocrine alterations, BPA-exposed mice developed larger tumours. Tumour leukocytic infiltrate analysis revealed a higher proportion of regulatory T lymphocytes in the BPA-exposed group. RT-PCR analysis of tumour samples showed a decreased expression of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , as well as the M2 macrophage marker Fizz-1 in the BPA-exposed group. Flow cytometry analysis revealed differences in ER $\alpha$  expression by T lymphocytes, macrophages and NK cells, both associated to BPA exposure and tumour development. These findings show a new aspect whereby early life BPA exposure can contribute to breast cancer development and progression by modulating the anti-tumoral immune response.

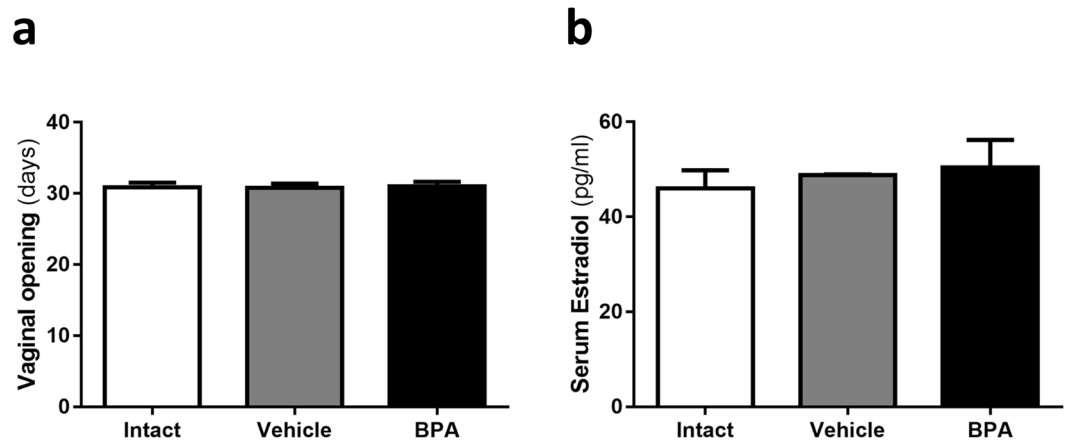
Human activity has led to an increased amount of environmental contaminants, including endocrine disrupting chemicals (EDCs). EDCs are defined as exogenous compounds interfering with the synthesis, secretion, metabolism, transport, mechanism of action, and elimination of endogenous steroid hormones<sup>1</sup>. Bisphenol A (BPA), an oestrogenic EDC, is characterized by its high affinity to nuclear oestrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ )<sup>2,3</sup>. Moreover, BPA is widely used in the production of polycarbonate plastics, epoxy resins (used in food containers and can linings, respectively), as well as dental sealants; all of them used daily by people. BPA can leak from these materials when exposed to high temperatures, acidic conditions, or saliva, thus leading to human exposure<sup>4-6</sup>.

BPA causes several endocrine alterations, not only in the reproductive organs<sup>7-11</sup> but also in mammary gland development<sup>12-17</sup>, and brain sexual differentiation<sup>18-20</sup>. The nature and magnitude of these effects depends on the dose, exposure course, and the developmental stage at which the exposure occurs. Regarding the latter, endocrine disruption during critical developmental stages could lead to lifelong effects.

It is well known that BPA exposure can occur as early as during gestation, as evidenced by reports of BPA presence in amniotic fluid, foetal serum, and breast milk<sup>21,22</sup>. In this regard, there is an existing concern about the effects that BPA could exert in a developing organism, including the immune system.

Concerning the immune system in mice, the critical developmental stages encompass both the gestational and neonatal periods. Beyond the immune organ formation and hematopoiesis, the maturation of the immune

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, Ciudad de México, CP, 04510, México. <sup>2</sup>Laboratorio de Genotoxicología y Mutagénesis Ambientales, Departamento de Ciencias Ambientales, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, Ciudad de México, México. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.M.-M. (email: [jmontor66@biomedicas.unam.mx](mailto:jmontor66@biomedicas.unam.mx))



**Figure 1.** Endocrine parameters assessment. **(a)** Vaginal opening as puberty onset indicator. **(b)** Serum 17 $\beta$ -Oestradiol levels at diestrus phase at 12 weeks of age measured by EIA. Data from 2 independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD;  $n = 14$  in **(a)** and 8 in **(b)**.

system occurs between birth and post natal day 30 (PND 30)<sup>23</sup>. Moreover, it has been demonstrated that PND 2–4 are critical for T lymphocyte development, since thymectomy or cyclosporine treatment at this age, but not later, results in multi-organ autoimmunity<sup>24–26</sup>.

On the other hand, cancer is the second cause of death worldwide; according to the WHO<sup>27</sup>, it accounted for 8.8 million deaths in 2015. Breast cancer is among the most prevalent types of cancer, and several environmental factors have been linked to an increased incidence of this ailment. When talking about cancer, there are multiple factors that should be taken into account, not only those contributing to cellular stress, DNA damage, and emergence of transformed cells, but also the mechanisms responsible for the detection and elimination of cancer cells. In this context, the immune system, particularly cell populations such as NK cells, T lymphocytes, regulatory T lymphocytes (Treg), and Tumour Associated Macrophages (TAMs), as well as their secreted cytokines, play a major role in preventing cancer development or controlling its progression<sup>28,29</sup>.

The endocrine and immune systems are not independent physiological entities, but parts of a net of bidirectional interactions mediated by hormones, cytokines and even neurotransmitters which have been widely documented in recent years<sup>30,31</sup>. Regarding sexual steroid hormones, they regulate the distribution and functionality of several immune cell populations, modulating the immune response, maturation and selection of thymocytes, lymphoid proliferation, and cytokine production<sup>31</sup>. The modulatory effects of sex steroids are mediated by specific receptors present in immune cells, namely oestrogen receptors (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), progesterone receptor (PR), and androgen receptor (AR), as well as membrane oestrogen and progesterone receptors, among others<sup>31</sup>.

Since sexual steroids modulate the immune system, exogenous agents such as EDCs could also influence it.

Therefore, we decided to assess the potential alteration of the anti-tumoral immune response caused by BPA exposure at a critical developmental stage, specifically during the neonatal period. Our results clearly demonstrate that BPA administered during the neonatal period has an impact on tumour size, weight, and immune-endocrine microenvironment during adult life.

## Results

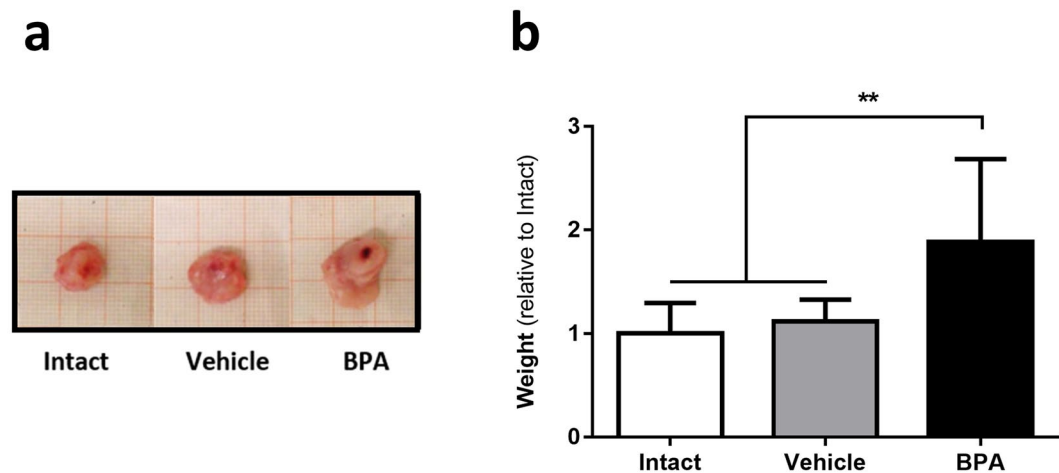
**Endocrine Parameters.** The experimental strategy involves the development of a tumour within hormone-sensitive tissue; therefore, it was important to discriminate whether the observed effects could be attributed to the direct or indirect effect of neonatal endocrine disruption on the immune system or caused by a persistent hormonal alteration.

In order to assess the potential reproductive effects of a single 250  $\mu$ g/kg bw BPA dose, puberty onset was determined by the age of vaginal opening. Contrary to what has been reported with higher or more prolonged exposures, neonatal BPA exposure did not alter puberty onset (Fig. 1a)<sup>8,9</sup>.

In addition, the oestrous cycle was also monitored once sexual maturity was fully established (8 weeks old), finding no difference between the experimental groups (data not shown). Furthermore, BPA exposure had no effect on baseline levels of serum oestradiol during the diestrus phase (Fig. 1b).

**Tumour size and weight.** A significant promotion of tumour development was observed in the BPA-exposed group. At 25 days after the inoculation of tumour cells, it was evident that the mice subjected to neonatal BPA exposure developed larger tumours (Fig. 2a). Indeed, after measuring tumour weight, those found in BPA-exposed mice showed an 88% increase in weight when compared to unexposed groups (Fig. 2b), *i.e.* in the BPA group, the mean relative weight was 1.88 (CI 1.48, 2.28) compared to a mean relative weight of 1 (CI 0.8, 1.19) for the Intact group and a mean relative weight of 1.12 (CI 0.98, 1.25) for the Vehicle group.

**Tumour infiltrate.** The flow cytometry analysis of leukocytic infiltrate in tumours revealed that the cellular composition was mostly similar between the groups (Fig. 3a–c); however, Treg were increased in the BPA-exposed



**Figure 2.** Tumour growth. (a) Representative images of tumours of the three experimental groups; millimetric grid as background. (b) Evaluation of final weight after 25 days of tumour development; data from 3 independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD;  $n = 12$ ;  $**p = 0.007$  vs Intact,  $p = 0.0025$  vs Vehicle.

group (Fig. 3d,e), comprising a 13.93% (CI 10.06, 17.79) of CD4+ lymphocytes when compared to 7.82% (CI 5.77, 9.87) and 7.33% (CI 3.81, 10.85) in intact and vehicle groups, respectively.

Further, immunofluorescence analysis of tumour sections confirmed the greater proportion of regulatory T lymphocytes within the tumours of BPA-exposed mice (Fig. 4), comprised by an average of 42.8% (CI 30.27, 55.33) of CD4+ cells, compared to 21.54% (CI 14.14, 28.94) in the intact group and 21.88% (CI 11.52, 30.64) in the vehicle group.

Tumour associated macrophages (TAMs) represent an important subset of leukocytic infiltrate in many kinds of tumours, where they may display a classical (M1) or an alternative (M2) activation phenotype. By means of RT-PCR, the relative expression of classical (iNOS) and alternative (Arginase, Fizz-1 and Ym-1) activation markers was assessed. TAMs of all groups were clearly activated in an alternative manner, as evidenced by a higher arginase expression when compared to iNOS (Fig. 5a,c). However, TAMs from the BPA-exposed group showed a lower Fizz-1 relative expression mean (0.307; CI 0.09, 0.51) when compared to the intact (0.834; CI 0.52, 1.27) and vehicle groups (0.821; CI 0.47, 1.26) (Fig. 5b). Ym-1, on the other hand, was not expressed in any of the tumour samples.

In contrast to the tumour infiltrate, which usually shows Treg enrichment, the spleen of tumour-bearing mice appeared nearly devoid of these cells. Further, a major finding involved the virtual absence of NK cells from the tumour infiltrate and were drastically diminished in the periphery of all tumour-bearing mice, in contrast to healthy ones.

**Intra-tumoral cytokine expression.** As part of the tumour immunological microenvironment analysis, we determined the relative expression of pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ ), as well as regulatory (IL-10 and TGF- $\beta$ ) cytokines in tumour tissue. The cytokine milieu in all groups is clearly skewed towards a regulatory phenotype, as denoted by the predominance of TGF- $\beta$  relative expression (Fig. 6e).

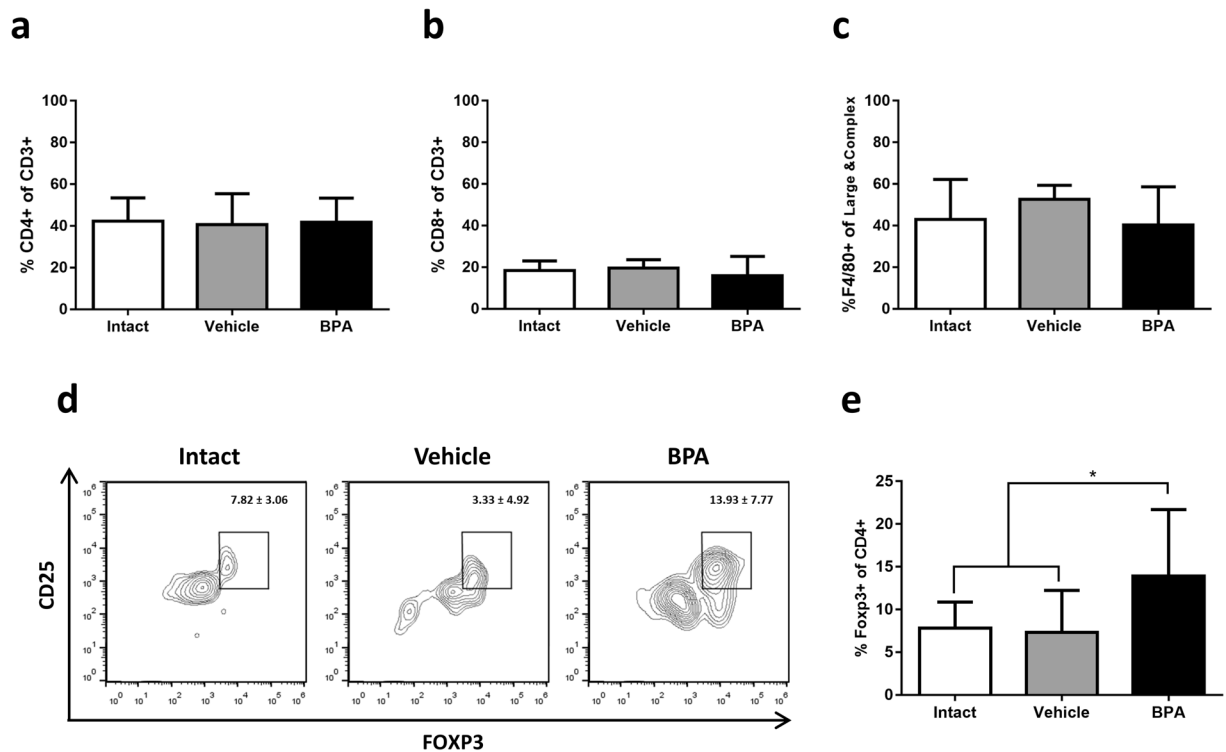
However, it drew our attention that, whilst having a greater regulatory T proportion, the tumour samples of the BPA-exposed group did not exhibit a greater expression of TGF- $\beta$ , nor IL-10 (Fig. 6d,e). Moreover, both TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  expression was decreased in the BPA-exposed group (Fig. 6b,c), suggesting that the overall tumour microenvironment in this group displays a lesser pro-inflammatory character.

**ER- $\alpha$  expression.** The cells of the immune system are modulated by sex steroids, mediated by receptors present in these cells. Given the oestrogenic character of the endocrine disruption caused by BPA, we analysed ER- $\alpha$  expression in the main immune subpopulations at both local and systemic levels.

We observed a greater proportion of ER- $\alpha$ -positive T lymphocytes in the tumour microenvironment of BPA-exposed mice, accompanied by an elevated expression level of the receptor (Fig. 7a).

The macrophage infiltrate of the BPA-exposed group also showed a larger percentage of ER- $\alpha$ -positive cells; however, ER- $\alpha$  expression in this group was significantly lower (Fig. 7b). This is a noteworthy finding, as it could account for the decreased Fizz-1 expression found in the same tissue, considering that oestrogen signalling promotes the expression of this protein<sup>32</sup>.

At systemic level, we found that the T lymphocytes of tumour-bearing mice had lower ER- $\alpha$  expression compared to their healthy counterparts (Fig. 7c). Though this phenomenon was observed in all groups, the deviation in ER- $\alpha$  expression between healthy and tumour-bearing mice was greater in the Vehicle and BPA groups than in the Intact group. A similar behaviour was noted in splenic macrophages, where the proportion of ER- $\alpha$ -positive cells was decreased in tumour-bearing mice of the Vehicle and BPA-exposed groups (Fig. 7d). As ER- $\alpha$  expression remained constant in healthy mice regardless of the neonatal treatment, these findings suggest that neonatal stress, but not BPA exposure could play a role in the modulation of ER- $\alpha$  expression in response to tumour development.



**Figure 3.** Analysis of tumour leucocytic infiltrate. Determination of immune subpopulations by flow cytometry, (a) T helper lymphocytes, (b) cytotoxic T lymphocytes, (c) macrophages and (e) Treg; \* $p = 0.0335$  vs Intact,  $p = 0.0247$  vs Vehicle. Data from 3 independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD;  $n = 12$ . (d) Representative contour representations of cytometric analysis of Treg percentage; gate: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> from 10,000 lymphocytes collected.

The analysis of ER $\alpha$  expression in NK cells was only possible at systemic level, since this population was absent from the tumour microenvironment at this time point. Moreover, the spleens of tumour-bearing mice was depleted of NK cells. Nevertheless, the analysis on ER $\alpha$  expression in NK cells of healthy mice revealed that neonatal BPA-exposure not only increased the percentage of ER $\alpha$  positive cells, but also increased its expression level (Fig. 7e).

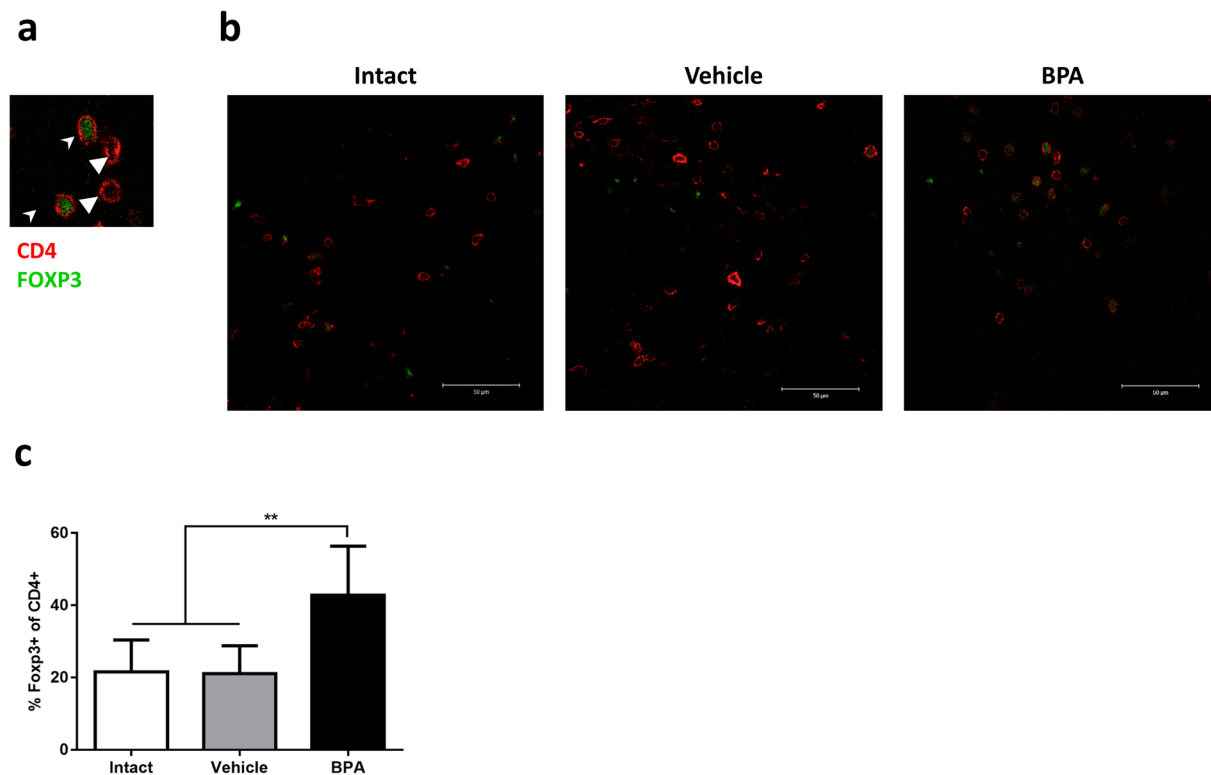
## Discussion

Our experimental model involves the growth of a mammary adenocarcinoma tumour embedded within the mammary gland of a mouse<sup>33</sup>, resulting in a hormone-sensitive system. Originally, the use of 4T1 cells was contemplated as a strategy excluding the use of oestradiol as a growth factor, given that this cell line does not express the oestrogen receptor ER $\alpha$ <sup>34–36</sup>; however, we detected the presence of this receptor in the 4T1 cell line. This posed the possibility that the observed changes in tumour growth could be attributed to either endocrine (e.g. higher serum oestradiol levels) or immunological factors, or both. Whilst it has been well documented that BPA administered in rodents exerts several effects on the endocrine system, particularly on the reproductive axis, such as early puberty onset, oestrous cycle alterations, and even altered development of the mammary gland<sup>8, 9, 12, 37</sup>, the majority of these effects occur after a prolonged perinatal or pre-pubertal exposure to higher doses<sup>38</sup>.

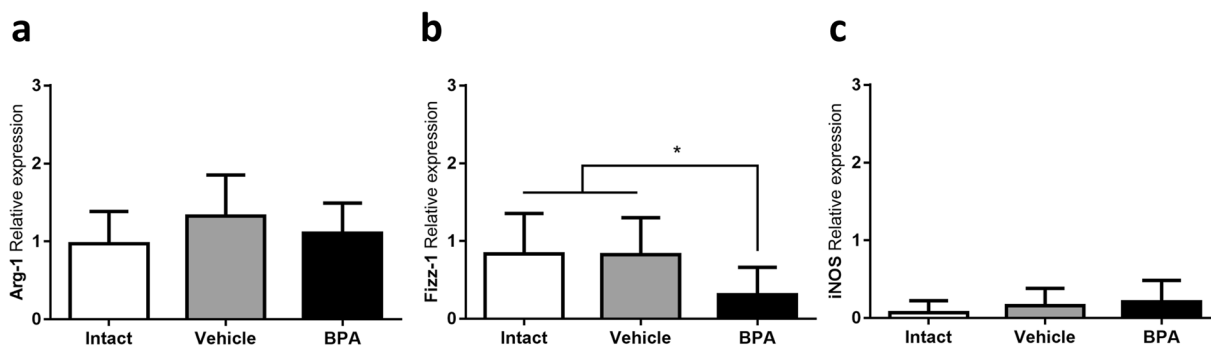
Therefore, we evaluated the potential endocrine alterations produced by the tested exposure scheme, i.e. a single dose of 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw at postnatal day 3. As a result, we did not observe any alterations regarding puberty onset, regularity of the oestrous cycle, or basal oestradiol levels in serum. The latter suggests that the observed effects, regarding tumour progression, are mainly due to immunological factors.

Remarkably, tumour growth was promoted as a result of a single neonatal BPA exposure. Previous studies have associated BPA with breast cancer risk, mainly as a consequence of mammary gland alterations and carcinogenesis susceptibility<sup>14–17, 39, 40</sup>. Nevertheless, our results show a new aspect whereby BPA can contribute to breast cancer development and progression by modifying the anti-tumoral immune response.

The analysis of the tumour leucocytic infiltrate showed that the BPA-exposed group had a larger proportion of Treg lymphocytes, in accordance with a greater tumour growth. It is known that Tregs express the immunomodulatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  while at the same time limiting the production of pro-inflammatory cytokines by other cells<sup>41–43</sup>. It appeared odd that we did not observe any changes in the expression of immunomodulatory cytokines in the BPA group; instead, this group showed a lower expression of the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ; therefore, the tumour microenvironment of this group was indeed modified in general terms. In any case, the expression level was assessed at mRNA level, which is limiting when considering the post-transcriptional regulations that may be affecting final protein synthesis. Regardless, the immunomodulatory



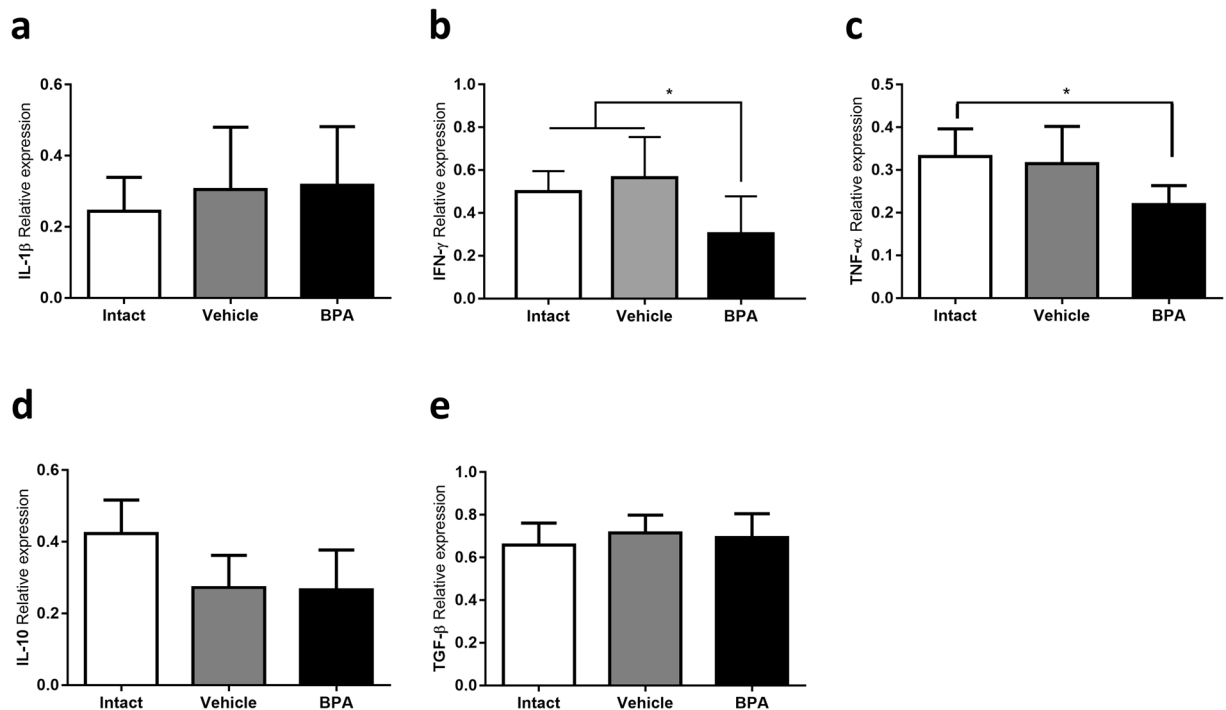
**Figure 4.** Evaluation of tumour Treg abundance by immunofluorescence. (a) Representative identification of T helper lymphocytes (white triangles  $\triangle$ ) and Treg (white arrowheads  $\blacktriangle$ ) by immunofluorescence staining of membranar CD4 (red) and nuclear Foxp3 (green); scale bar, 50  $\mu$ m; original magnification,  $\times$ 40. (b) Representative images of immunofluorescence staining of tumour samples. (c) Treg proportion expressed as the percentage of Foxp3<sup>+</sup> cells of CD4<sup>+</sup> cells; \*\* $p = 0.0031$  vs Intact,  $p = 0.0070$  vs Vehicle; data from 2 independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD;  $n = 8$ .



**Figure 5.** TAMs activation profile. Relative expression of alternative activation markers (a) Arginase and (b) Fizz-1 and classical activation marker (c) iNOs determined by RT-PCR. Expression relative to 18S ribosomal subunit as constitutive expression reference. \* $p = 0.0326$  vs Intact,  $p = 0.0476$  vs Vehicle; data from 2 independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD;  $n = 10$ .

role of Treg lymphocytes is complex, as their effector mechanisms are not limited to the cytokine expression, and also mediate contact-dependent immunosuppression and IL-2 depletion.

Moreover, tumour microenvironment is not only defined by adaptive immunity cells; in fact, TAMs comprise a very important population. It is known that TAMs acquire a particular phenotype while in the tumour microenvironment, more similar to alternative (M2) than classical (M1) activation<sup>44–46</sup>. TAMs found in the analysed tumour samples did show a greater expression of arginase (M2 marker) compared to iNOS (M1 marker); however, it results interesting that the samples from BPA-exposed mice showed lower Fizz-1 expression. Although Fizz-1 is considered a M2 marker, the role of this protein is still not clear, and while it has been postulated that it can act as a modulator of type 2 inflammation in the lungs, there is no information concerning its role in the context of tumour microenvironment.



**Figure 6.** Intratumoural cytokine expression. Relative expression of proinflammatory (a) IL-1 $\beta$ , (b) IFN- $\gamma$ , (c) TNF- $\alpha$ , and immunomodulatory cytokines (d) IL-10 and (e) TGF- $\beta$ , determined by RT-PCR. Expression relative to 18 S ribosomal subunit as constitutive expression reference. In (b) \* $p = 0.0216$  vs Intact,  $p = 0.0034$  vs Vehicle; in (c) \* $p = 0.0244$  vs Intact; data from 2 independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD;  $n = 10$ .

One of the most relevant aspects of this study was the evaluation of the major oestrogen receptor in immune cells (ER $\alpha$ ). As previously stated, sexual steroid hormones modulate the response of immune cells *via* its receptors; the effects that these hormones exert are diverse and greatly dependent on cell type, hormone concentration and combination, and even the expressed isoforms of the receptors<sup>47–49</sup>. Even in the context of an invariable hormone concentration, a change in the expression of a receptor may modify the sensibility of a cell to this hormone; in other words, it is not only a matter of how much hormone is present, but also how much the cell is sensing.

Considering that immune cells express a plethora of hormonal receptors, it is not possible to draw definitive conclusions based only on the evaluation of ER $\alpha$ . Nevertheless, it is possible to associate the changes in the expression of this receptor in immune cells to the changes observed in the modulation of these cells. For example, it has been reported that oestrogen promotes Treg differentiation *via* ER $\alpha$ <sup>50–52</sup>, which could account in part for the increased Treg ratio in the tumour microenvironment, as T lymphocytes in this tissue showed a higher ER $\alpha$  expression level. Furthermore, oestrogen has also been shown to influence macrophage polarization, promoting an alternative activation during skin repair<sup>32</sup>. In this manner, the modulation of ER $\alpha$  in TAMs could also relate to the observed changes in their activation profile.

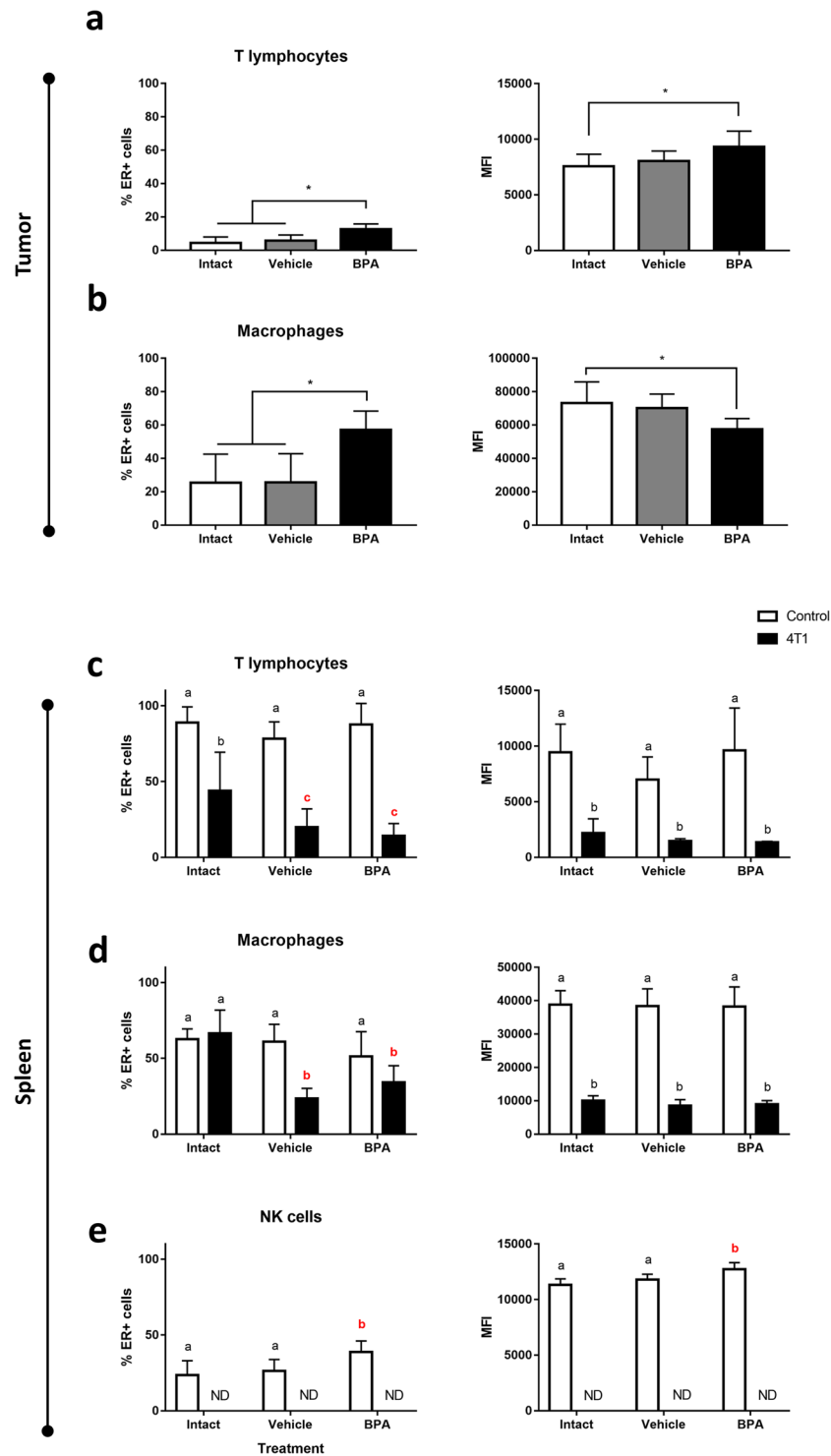
As for what caused the changes in ER $\alpha$  expression, it has been reported that BPA exposure during critical developmental stages is able to modify the epigenetic patterns, affecting the expression of oestrogen receptors in reproductive tissues and in the brain<sup>20, 53, 54</sup>. Considering the latter, it is a plausible possibility that immune cells are also subjected to epigenetic modulation due to developmental BPA exposure. However, such hypothesis needs to be confirmed.

## Conclusion

The present work demonstrates that exposure to a single dose of BPA during the neonatal period induces changes in the immune system, leading to a differential anti-tumoral immune response during adulthood, causing greater tumour growth. This disparity is characterized by a greater intra-tumoral Treg proportion, decreased expression of pro-inflammatory cytokines, and a slightly different TAM activation profile. Because BPA exposure modified the expression pattern of ER $\alpha$  in immune cells, it is a plausible mechanism underlying the altered immune response caused by BPA exposure.

## Methods

**Ethics statement.** Animal care and experimental practice were conducted at the Unidad de Modelos Biológicos (UMB) in the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de México. All experimental procedures in the animals were approved by the Institutional Care and Animal Use Committee (CICUAL), permit number 155, adhering to Mexican regulation (NOM-062-ZOO-1999), and in accordance with the recommendations from the National Institute of Health (NIH) of the United States of



**Figure 7.** Flow cytometry evaluation of ER $\alpha$  expression in immune cells. Percentage of ER $\alpha$  positive cells (left panel) and ER $\alpha$  expression level (right panel) of immune cells in the tumour microenvironment (**a,b**) and in the spleen (**c–e**). (**a,c**) T lymphocytes, (**b,d**) macrophages, (**e**) NK cells. Data from 2 independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD;  $n = 10$ . \* $p < 0.05$  compared with unexposed controls. In (**c–e**) white bars, control = no tumour induction; black bars, 4T1 = tumour induction; letters above each column indicate statistical differences among groups: a, no significant difference; b,  $p < 0.05$  compared to a; c,  $p < 0.05$  compared to b; ND, no data available since this subpopulation was absent from the tissue.



America (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Euthanasia of experimental animals was performed humanely by cervical dislocation after anaesthesia with 5% sevoflurane (Abbot, México).

**Animals.** Mice of the syngeneic strain BALB/c AnN (H2-d) were purchased from Harlan México (Facultad de Química, UNAM, México). The animals were housed at UMB with controlled temperature (22 °C) and 12-hrs light-dark cycles, with water and Purina LabDiet 5015 (Purina, St. Louis MO) chow *ad libitum*. After neonatal treatment, only female mice were used for experimentation.

**Neonatal BPA exposure.** To resemble the human final gestational stage and aiming at the murine critical T lymphocytes developmental window, mice were exposed at PND3.

Briefly, 72 hours after birth female pups were identified by ano-genital distance. Only female pups received treatment, though whole litters were assigned to experimental groups to avoid pup reallocation stress. The Intact group received no neonatal treatment. The vehicle group received a dorsal subcutaneous injection of 20 µl corn oil vehicle (Sigma, St. Louis MO). The BPA group received 250 µg/kg bw of BPA. Given that neonate rodents have minimal glucuronidation activity, which is the major metabolic mechanism for BPA clearance<sup>55, 56</sup>, this dose approximates to a brief, 5 day exposure to the FDA reference dose of 50 µg/kg bw/day, but performed in a single administration, thus avoiding excessive manipulation stress.

Though the main exposure route is commonly oral, subcutaneous injection was selected instead as no difference between oral and subcutaneous routes are observed in neonate mice in this case<sup>57</sup>.

Pups were weaned at 21 days of age and placed in standard cages, 5 mice per cage.

**Assessment of endocrine parameters.** Vaginal opening. From 25 days old forth, the vaginal opening was examined by holding the mice in a dorsal restraint and using a light extension of the peri-vaginal skin.

Estrous cycle. At 8 weeks old, the oestrous cycle was assessed using a vaginal smear wash of 50 µl saline solution (PiSA, Guadalajara México), followed by Giemsa stain and light microscope observation.

Serum Oestradiol. Serum samples obtained at sacrifice, corresponding to the diestrus phase, were used to determine oestradiol levels, using EIA DetectX<sup>®</sup> Serum 17βOestradiol kit (Arbor Assays, Ann Arbor MI), according to manufacturer's protocol.

**Cell culture.** The 4T1 cell line (ATCC<sup>®</sup> CRL-2539) was kindly donated by Dr. Pedro Ostoa-Saloma and cultivated in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis MO) supplemented with 10% FBS (ByProducts, Guadalajara México). Subculture was performed at 70–80% confluency. After a second subculture, the cells were harvested and resuspended in 0.9% saline to a concentration of 250,000 cells/ml for inoculation.

**Mammary tumour induction.** Upon sexual maturity (8 weeks old), mice of every exposure group were randomized into secondary experimental groups, *i.e.* Control (without tumour induction) and 4T1 (tumour induction) groups. Mice assigned to 4T1 groups were treated as follows:

Mice were anesthetized by inhalation of a mixture of air and 5% sevoflurane. After low abdomen asepsis, 4<sup>th</sup> nipple was located and 10<sup>4</sup> 4T1 cells were introduced by a single injection into the mammary fat pad. Tumour growth was monitored for 25 days.

**Flow cytometry.** The spleen was mechanically disaggregated using a 50 µm nylon mesh and washed with PBS. Spleen erythrocytes were lysed with ACK buffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.3) for 10 minutes and washed with PBS. Tumour samples were finely cut and incubated 20 minutes in digestion medium (RPMI 1640, 10 U/ml DNase (Roche, Mannheim Germany), 0.5 mg/ml type IV Collagenase (Sigma, St. Louis MO)). Digestion was stopped by adding 50 µl FBS and mesh disaggregation was performed, followed by PBS wash. Cells from all tissues were resuspended in FACS buffer (PBS, 2% FBS, 0.02% NaN<sub>3</sub>).

Approximately 1 × 10<sup>6</sup> cells were incubated with anti-CD16/CD23 (TruStain<sup>®</sup>, BioLegend, San Diego CA) for 30 minutes at 4 °C, washed and stained. For the characterization of cellular subpopulations, the following antibodies were used: APCcy7-conjugated anti-CD3ε (145-2C11), PE-conjugated anti-CD4 (GK1.5), AlexaFluor<sup>®</sup> 647-conjugated anti-Foxp3 (150D), PerCP-conjugated anti-CD8 (53-6.7), AlexaFluor<sup>®</sup> 647-conjugated anti-F4/80 (BM8), PE-conjugated anti-NKp46 (29A1.4) (all from BioLegend, San Diego CA), and VioletFluor<sup>®</sup> 450-conjugated anti-CD25 (PC61.5) (Tonbo biosciences, San Diego CA). For intra-nuclear staining, Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer kit (Tonbo biosciences, San Diego CA) was used according to manufacturer's protocol. For oestrogen receptor alpha detection, a rabbit polyclonal anti-ERα (H-184) (Santa Cruz bt., Dallas TX) was used, followed by DyLight<sup>®</sup> 488-conjugated Donkey anti-Rabbit IgG (BioLegend, San Diego CA). Using an Attune cytometer (Life Technologies) with blue and red laser, the obtained data was analysed with the FlowJo software (Treestar Inc.).

**Immunofluorescence.** Tumour tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde (in PBS pH 7.1) for 20 minutes, cryoprotected in 30% sucrose (in PBS, pH 7.1) overnight, embedded in O.C.T. compound (Sakura Finetek, Torrance CA) and frozen at −70 °C. 10 µm thick sections were washed with PBS, permeabilised with 0.1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis MO) in PBS for 10 min and blocked with 1% Bovine Serum Albumin (Sigma, St. Louis MO) for 2 hours. The sections were then incubated overnight at 4 °C with PE-conjugated anti-CD4 (GK1.5) and AlexaFluor<sup>®</sup> 647-conjugated anti-Foxp3 (150D) (BioLegend, San Diego CA). After thoroughly washing with PBS, the sections were mounted in fluorescence mounting medium Fluoroshield<sup>®</sup> (Sigma, St. Louis MO) and stored at 4 °C until examination with confocal microscope (LSM5 Pascal, Carl Zeiss).

Oligonucleotide	Sequence	MT (°C)	Product (bp)
IL-1 $\beta$ Sense	TCATGGGATGATGATGATAACCTGCT	62	502
IL-1 $\beta$ Antisense	CCCATACTTTAGGAAGACACGGATT		
IL-10 Sense	AACTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA	63	237
IL-10 Antisense	CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA		
TNF- $\alpha$ Sense	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	63	300
TNF- $\alpha$ Antisense	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG		
IFN- $\gamma$ Sense	AGCGGCTGACTGAAGTCAAGTGTAG	60	247
IFN- $\gamma$ Antisense	GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG		
TGF- $\beta$ Sense	CTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGA	61	298
TGF- $\beta$ Antisense	CACAATCATGTTGGACAAGTCTCC		
18S Sense	CGCGGTTCTATTTTGTGGT	60	219
18S Antisense	AGTCGGCATCGTTTATGGTC		
Arg-1 Sense	CTGCGAGACGTAGACCCTG	64	387
Arg-1 Antisense	TGAGTTCCGAAGCAAGCCAA		
Fizz-1 Sense	GGTCCCAGTGCATATGGATGAGAC	58	296
Fizz-1 Antisense	CACCTTTCCTCGAGGGACAGTT		
YM-1 Sense	TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG	60	437
YM-1 Antisense	TTTGTCTTAGGAGGGCTTCCTC		
iNOS Sense	CAGCTCCACAAGCTGGCTCG	63	657
iNOS Antisense	CAGGATGTCCTGAACGTAGACCTT		

**Table 1.** Oligonucleotide sequences used for RT-PCR.

**RT-PCR.** Tumour tissue samples were frozen in TRIzol<sup>®</sup> reagent (Ambion, Carlsbad CA) immediately after recollection. Total RNA was extracted with same reagent, following manufacturer's protocol. Briefly, the tissue was disrupted in TRIzol<sup>®</sup> reagent (1 ml/0.1 g tissue) and 0.2 ml of chloroform was added per each ml of reagent. After centrifugation at 13,000 rpm for 15 minutes, the aqueous phase was recovered. RNA was precipitated with isopropyl alcohol, washed with 75% ethanol, and dissolved in RNase-free water. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm, and its integrity was verified following electrophoresis on 1.0% agarose gel.

Total RNA samples were immediately reverse-transcribed, using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison WI) and dT12–18 primers (Invitrogen, USA). Then, cDNA was specifically amplified by semi-quantitative PCR, using TaqDNA polymerase (Biotecnologías Universitarias, UNAM, México) and *Mus musculus*-specific primers (see Table 1). The relative expression of each amplified gene was obtained by densitometric analysis, using the 18S-ribosomal RNA amplicon as a constitutive control.

**Statistical analysis.** The general experimental design considers 2 independent variables: neonatal exposure (Intact, Vehicle of BPA) and mammary tumour induction (Control or 4T1). The data regarding tumour development and tumour microenvironment only considers the exposure variable, as all animals belong to 4T1 group. Data from 2–3 independent experiments are charted as mean  $\pm$  standard deviation and analysed with Prism 6<sup>®</sup> software (GraphPad Software Inc.). Data distribution normality was assessed via Shapiro-Wilk test. Thereafter, a one-way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) was performed, followed by a Tukey *post-hoc* test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ , with the actual  $p$  value being stated in each figure legend. The data regarding oestrogen receptor expression considers both independent variables and therefore, a two-way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) was performed, followed by a Holm-Šidák *post-hoc* test, with the same significant difference criterion.

**Data availability.** The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## References

- Diamanti-Kandarakis, E. *et al.* Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.* **30**, 293–342 (2009).
- Wetherill, Y. B. *et al.* *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. Toxicol.* **24**, 178–198 (2007).
- Matthews, J. B., Twomey, K. & Zacharewski, T. R. *In Vitro* and *In Vivo* Interactions of Bisphenol A and Its Metabolite, Bisphenol A Glucuronide, with Estrogen Receptors a and b. *Chem. Res. Toxicol.* **14** (2001).
- Le, H. H., Carlson, E. M., Chua, J. P. & Belcher, S. M. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol. Lett.* **176**, 149–156 (2008).
- Goodson, A., Robin, H., Summerfield, W. & Cooper, I. Migration of Bisphenol A from can coatings — effects of damage, storage conditions and heating. *Food Addit. Contam.* **21**, 1015–1026 (2004).
- Fleisch, A. F., Sheffield, P. E., Chinn, C., Edelstein, B. L. & Philip, J. Bisphenol A and Related Compounds in Dental Materials. *Pediatrics* **126**, 760–768 (2010).
- Honma, S. *et al.* Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod. Toxicol. Elmsford NY* **16**, 117–122 (2002).
- Nah, W. H., Park, M. J. & Gye, M. C. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **38**, 75–81 (2011).

9. Rasier, G. & Toppari, J. Parent, a-S. & Bourguignon, J.-P. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data. *Mol. Cell. Endocrinol.* **254–255**, 187–201 (2006).
10. Timms, B. G. *et al.* Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 7014–7019 (2005).
11. Flick, B., Mayr, E., Talsness, C., Paul, M. & Chahoud, I. In Utero Exposure to Low Doses of Bisphenol A Lead to Long-term Deleterious Effects in the Vagina 1. **4**, 98–102 (2002).
12. Dhimolea, E. *et al.* Prenatal exposure to BPA alters the epigenome of the rat mammary gland and increases the propensity to neoplastic development. *PLoS One* **9**, e99800 (2014).
13. Fenton, S. E. Endocrine-disrupting compounds and mammary gland development: early exposure and later life consequences. *Endocrinology* **147**, S18–24 (2006).
14. Yang, L. *et al.* Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells. *Toxicol. Lett.* **218**, 187–93 (2013).
15. Tharp, A. P. *et al.* Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 8190–5 (2012).
16. Vandenberg, L. N. *et al.* Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* **148**, 116–27 (2007).
17. Muñoz-de-Toro, M. *et al.* Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* **146**, 4138–47 (2005).
18. Rubin, B. S. *et al.* Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* **147**, 3681–91 (2006).
19. Itoh, K., Yaoi, T. & Fushiki, S. Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development. 447–457, doi:10.1111/j.1440-1789.2011.01287.x (2012).
20. Kundakovic, M. *et al.* Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 9956–61 (2013).
21. Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y. & Taketani, Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum. Reprod.* **17**, 2839–41 (2002).
22. Vandenberg, L. N. *et al.* Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1055–70 (2010).
23. Landreth, K. S. Critical windows in development of the rodent immune system. *Hum. Exp. Toxicol.* **21**, 493–498 (2002).
24. Sakaguchi, S., Takahashi, T. & Nishizuka, Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J. Exp. Med.* **156** (1982).
25. Bonomo, A., Kehn, P. J. & Shevach, E. M. Post-thymectomy autoimmunity: abnormal T-cell homeostasis. *Immunol. Today* **16**, 61–67 (1995).
26. Classen, J. B. Cyclosporine Induced Autoimmunity in Newborns Prevented by Early Immunization. *Autoimmunity* **27**, 135–139 (1998).
27. WHO. Cancer Fact Sheet. *Cancer Fact Sheet* (2017). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (Accessed: 25th February 2017).
28. Dunn, G. P. *et al.* The immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
29. Smyth, M. J., Dunn, G. P. & Schreiber, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* **90**, 1–50 (2006).
30. Da Silva, J. A. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences* **876**, 102–17–8 (1999).
31. Muñoz-Cruz, S., Togno-Pierce, C. & Morales-Montor, J. Non-Reproductive Effects of Sex Steroids: Their Immunoregulatory Role. Or The Regulatory Role of Sex Steroids on Innate and Adaptive Immunity. *Curr. Top. Med. Chem.* **11** (2011).
32. Campbell, L. *et al.* Estrogen Receptor-Alpha Promotes Alternative Macrophage Activation during Cutaneous Repair. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2447–2457 (2014).
33. Pulaski, B. A. & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 20, Unit 20.2 (2001).
34. Zhang, Y. *et al.* A novel role of hematopoietic CCL5 in promoting triple-negative mammary tumor progression by regulating generation of myeloid-derived suppressor cells. *Cell Res.* **23**, 394–408 (2013).
35. Singh, M. *et al.* Curcumin improves the therapeutic efficacy of Listeria<sup>at</sup> -Mage-b vaccine in correlation with improved T-cell responses in blood of a triple-negative breast cancer model 4T1. *Cancer Med.* **2**, 571–582 (2013).
36. Yang, X. *et al.* Estradiol increases ER-negative breast cancer metastasis in an experimental model. *Clin. Exp. Metastasis* **30**, 711–21 (2013).
37. Howdeshell, K. L., Hotchkiss, A. K., Thayer, K. A., Vandenberg, J. G. & Vom Saal, F. S. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* **401**, 763–764 (1999).
38. Richter, C. A. *et al.* In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies. *Reprod. Toxicol.* **24**, 199–224 (2008).
39. Murray, T. J., Maffini, M. V., Ucci, A. A., Sonnenschein, C. & Soto, A. M. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma *in situ* following fetal bisphenol A exposure. *Reprod. Toxicol.* **23**, 383–90 (2007).
40. Durando, M. *et al.* Prenatal Bisphenol A Exposure Induces Preneoplastic Lesions in the Mammary Gland in Wistar Rats. *Environ. Health Perspect.* **115**, 80–86 (2006).
41. Wang, H. Y. & Wang, R.-F. Regulatory T cells and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 217–23 (2007).
42. Shevach, E. M. *et al.* The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **212**, 60–73 (2006).
43. Ghiringhelli, F., Ménard, C., Martin, F. & Zitvogel, L. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol. Rev.* **214**, 229–38 (2006).
44. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–37 (2011).
45. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
46. Mantovani, A., Sica, A., Allavena, P., Garlanda, C. & Locati, M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum. Immunol.* **70**, 325–30 (2009).
47. Nilsson, S., Ma, S., Treuter, E., Tujague, M. & Thomsen, J. Mechanisms of Estrogen Action **81** (2001).
48. Diel, P. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol. Lett.* **127**, 217–24 (2002).
49. Filardo, E. J. & Thomas, P. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology* **153**, 2953–62 (2012).
50. Polanczyk, M. J. *et al.* Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+ CD25+ regulatory T cell compartment. *J. Immunol.* **173**, 2227–2230 (2004).
51. Ohkura, N., Hamaguchi, M. & Sakaguchi, S. FOXP3+ regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**, 158–66 (2011).
52. Tai, P. *et al.* Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J. Cell. Physiol.* **214**, 456–464 (2008).
53. Doshi, T., Mehta, S. S., Dighe, V., Balasinar, N. & Vanage, G. Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology* **289**, 74–82 (2011).
54. Santangeli, S. *et al.* BPA-Induced Dereglulation Of Epigenetic Patterns: Effects On Female Zebrafish Reproduction. *Sci. Rep.* **6**, 21982 (2016).

55. Matsumoto, J., Yokota, H. & Yuasa, A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* **110**, 193–6 (2002).
56. Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Woodling, K. A. & Fisher, J. W. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **248**, 1–11 (2010).
57. Taylor, J. A., Welshons, W. V. & Vom Saal, F. S. No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24h after administration in neonatal female mice. *Reprod. Toxicol.* **25**, 169–76 (2008).

### Acknowledgements

Financial support: Grant #176803 was obtained from Programa de Fondos Sectoriales CB-SEP, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and Grant IN208715 from Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México both to J. Morales-Montor. Margarita Isabel Palacios-Arreola is a PhD student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (408016221) and received a fellowship from CONACyT (468654).

### Author Contributions

M.I.P.A. wrote the main manuscript text and was responsible for the experimental procedures. V.H.R.A. and N.Y.P.S. contributed to the experimental work. K.E.N.C. and J.M.M. supervised the work. All authors reviewed the manuscript.

### Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

# EDAD A LA PUBERTAD EN CORDERAS PELIBUEY, HIJAS DE OVEJAS CON ACTIVIDAD REPRODUCTIVA ESTACIONAL O CONTINUA, NACIDAS FUERA DE TEMPORADA

## PUBERTY AGE IN PELIBUEY EWES LAMBS, DAUGHTERS OF EWES WITH SEASONAL OR CONTINUOUS REPRODUCTIVE ACTIVITY, BORN OUT OF SEASON

Antonio Roldán-Roldán<sup>1</sup>, Eduardo García-Martínez<sup>1</sup>, Víctor Del Río-Araiza<sup>1</sup>, José M. Berruecos-Villalobos<sup>2</sup>, Luis A. Zarco-Quintero<sup>1</sup>, Javier Valencia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamentos de Reproducción; <sup>2</sup>Genética y Estadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510. Avenida Universidad 3000. Colonia Universidad Nacional Autónoma de México, C. U. (jjvm@unam.mx).

### RESUMEN

Algunas ovejas Pelibuey no presentan la estacionalidad reproductiva común en la especie. El objetivo de este estudio fue determinar si las corderas Pelibuey, hijas de ovejas con actividad reproductiva continua (C), inician la pubertad antes que las hijas de ovejas estacionales (E), cuando los partos ocurrieron fuera de temporada (otoño o invierno). Las corderas hijas de hembras continuas no se basan en el fotoperiodo e inician su pubertad durante el anestrus. Para probar esto, 16 corderas Pelibuey (8C y 8E) nacidas en otoño (noviembre) y 21 corderas (11C y 10E) nacidas en invierno (diciembre-enero) fueron estudiadas. Todas fueron mantenidas con sus madres y destetadas a los 90 d de edad, permanecieron en un sistema intensivo y fueron aisladas del contacto de machos. Desde los cuatro meses de edad, cada semana se registró el peso y la condición corporal y se tomaron muestras sanguíneas para determinar las concentraciones plasmáticas de progesterona e identificar el inicio de la actividad ovárica. Mediante análisis de varianza se estudiaron las diferencias en la presentación de la pubertad entre hijas de hembras continuas y estacionales, en cada época de parición, mediante edad, peso, condición corporal a la primera ovulación y el diferencial del peso al destete-peso a la primera ovulación. La edad y el peso a la pubertad fue  $239.25 \pm 10.96$  d y  $29.78 \pm 4.39$  kg en las corderas nacidas en otoño y  $230.28 \pm 42.71$  d y  $25 \pm 4.42$  kg en las corderas nacidas en invierno. Ninguna variable de las hijas de ovejas continuas fue diferente al de las hijas de estacionales en ninguna de las temporadas de parición ( $p > 0.05$ ). La edad a la pubertad en corderas Pelibuey es independiente del patrón reproductivo estacional o continuo de sus madres. Algunas

### ABSTRACT

Some Pelibuey sheep do not present a reproductive seasonality that is common in the species. The objective of this study was to determine whether the Pelibuey ewe lambs, daughters of ewes with continuous (C) reproductive activity, begin puberty before the daughters of seasonal ewes (S), when the births occurred outside of season (autumn or winter). The ewe lambs daughters of continuous ewes do not rely on the photoperiod and begin their puberty during the anestrus. To test this, 16 Pelibuey ewe lambs (8C and 8S) born in autumn (November) and 21 ewe lambs (11C and 10S) born in the winter (December-January) were studied. All of them were kept with their mothers and weaned at 90 d of age; they remained in an intensive system and were isolated from contact with males. Starting at four months of age, the weight and body condition were recorded weekly, and blood samples were taken to determine the plasma concentrations of progesterone and to identify the beginning of the ovary activity. Through a variance analysis, the differences in the presentation of puberty between daughters of continuous and seasonal ewes were studied, in each birthing season, through age, weight, body condition at first ovulation, and differential of weight at weaning-weight at first ovulation. The age and weight at puberty was  $239.25 \pm 10.96$  d and  $29.78 \pm 4.39$  kg in the ewe lambs born in autumn, and  $230.28 \pm 42.71$  d and  $25 \pm 4.42$  kg in ewe lambs born in winter. None of the variables of the daughters of continuous ewes were different from those of seasonal daughters in any of the lambing seasons ( $p > 0.05$ ). The age at puberty in Pelibuey lambs is independent of the reproductive pattern, seasonal or continuous, of their mothers. Some ewe lambs only need to be exposed to long days for puberty to take place.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2015. Aprobado: noviembre, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 441-448. 2016.

**Key words:** Puberty, lambs, Pelibuey, photoperiod, continuous reproductive activity, *Ovis aries*.

**corderas sólo necesitan exponerse a días largos para que la pubertad ocurra.**

**Palabras clave:** Pubertad, corderas, Pelibuey, fotoperiodo, actividad reproductiva continua, *Ovis aries*.

## INTRODUCCIÓN

Para obtener el número mayor de partos en una oveja es conveniente que inicie su vida reproductiva en edad temprana (Valencia y Gonzalez-Padilla, 1983). La pubertad se define como el momento en el que la hembra tiene su primer celo, pero en ovejas se considera la primera ovulación, ya que ésta antecede dos o tres semanas al primer celo (Foster y Jackson, 2006).

En las razas de origen templado, la pubertad se presenta entre 6 y 18 meses de edad cuando las ovejas tienen 50 a 70 % de su peso adulto y se encuentran en la época reproductiva (Hafez, 1952; Dýrmundson, 1981). Las razas de origen tropical como la Pelibuey, alcanzan la pubertad entre los 6 y 8 meses de edad cuando se manejan en condiciones intensivas (Cambellas, 1993). En la Pelibuey, las corderas nacidas en la primavera y que reciben suplementos, pueden comenzar a ciclar a los seis meses de edad, con pesos de alrededor de 21 kg. En cambio, las ovejas nacidas en la misma unidad de producción durante el otoño comienzan a ciclar a los nueve o más meses de edad, aunque su alimentación haya sido adecuada y hubieran alcanzado 21 kg desde meses antes. Esto se debe a que las ovejas nacidas en otoño y que reciben suplementos alcanzan la edad (6 meses) y peso (21 kg) compatibles con la pubertad, durante febrero a abril. La disminución de la actividad reproductiva fue descrita para estos meses (Valencia y Gonzalez-Padilla, 1983), por lo cual las ovejas tienen que esperar la época del año adecuada para comenzar a ciclar.

A diferencia de razas ovinas como la Suffolk, originarias de países nórdicos, en las que la estacionalidad reproductiva se mantiene en latitudes medias (19° N) (De Lucas *et al.*, 1997), en Pelibuey existen hembras que pueden ciclar todo el año, por lo que se consideran continuas (Valencia *et al.*, 2006; Arroyo *et al.*, 2007). Estas ovejas se identificaron (Valencia *et al.*, 2010; Roldán *et al.*, 2014) mediante el protocolo descrito por Hanocq *et al.* (1999): una oveja se considera continua cuando presenta

## INTRODUCTION

In order to obtain the higher number of births in a ewe, it is convenient for it to begin its reproductive life at an early age (Valencia and Gonzalez-Padilla, 1983). Puberty is defined as the moment when the female has its first heat, but in ewes the first ovulation is considered, since it precedes two or three weeks to the first heat (Foster and Jackson, 2006).

In breeds of temperate origin, puberty is presented between 6 and 18 months of age, when ewes have 50 to 70 % of their adult weights and are in the reproductive season (Hafez, 1952; Dýrmundson, 1981). The breeds of tropical origin like Pelibuey reach puberty at between 6 and 8 months of age, when they are managed in intensive conditions (Cambellas, 1993). In Pelibuey, the lambs born in spring and which are supplemented, can begin to cycle at six months of age, with weights of around 21 kg. But the ewe lambs born in the same production unit during autumn begin to cycle at nine months of age or more, even when their diet has been adequate and they have reached 21 kg since months back. This is because ewes born in autumn and which are supplemented reach the age (6 months) and weight (21 kg) compatible with puberty during February to April. The decrease in reproductive activity was described for these months (Valencia and Gonzalez-Padilla, 1983), so that the ewes have to wait for the adequate season of the year to begin cycling.

In comparison to sheep breeds such as Suffolk, originally from Nordic countries, in which the reproductive seasonality is maintained in medium latitudes (19 °N) (De Lucas *et al.*, 1997), in Pelibuey there are females that are capable of cycling throughout the year, so they are considered continuous (Valencia *et al.*, 2006; Arroyo *et al.*, 2007). These sheep were identified (Valencia *et al.*, 2010; Roldán *et al.*, 2014) through the protocol described by Hanocq *et al.* (1999): a ewe is considered continuous when it presents ovulation in April for three consecutive years, which correspond to deep anestrus, recently weaned and isolated from the male.

Given that there are ewes with continuous reproductive activity where the adverse photoperiod does not have an effect, the hypothesis of this study

ovulación en abril durante tres años consecutivos, que corresponde al anestro profundo, recién destetada y aislada del macho.

Dado que hay ovejas con actividad reproductiva continua en las que el fotoperiodo adverso no ejerce efecto, la hipótesis del presente estudio fue que las hijas de ovejas continuas no se basan en el fotoperiodo e inician su pubertad durante el anestro, antes que las hijas de estacionales, cuando los nacimientos ocurren fuera de temporada. El objetivo fue determinar el inicio de la actividad ovárica en corderas Pelibuey nacidas en otoño e invierno para comprobar si las hijas de ovejas con actividad reproductiva continua, inician la pubertad antes que las hijas de ovejas estacionales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Localización

El estudio se realizó en un centro de investigación en el altiplano mexicano, a 19° N, con clima c(w)b(ij), semifrío, semihúmedo, lluvias en verano, precipitación pluvial de 800 a 1200 mm anuales y 19 °C temperatura promedio (García, 1987).

### Animales

Las corderas Pelibuey fueron ocho hijas de ovejas continuas (C) y ocho hijas de ovejas estacionales (E) nacidas en otoño (noviembre) y 21 corderas (11 C y 10 E) nacidas en invierno (diciembre-enero). Las crías se mantuvieron todo el tiempo con sus madres y fueron destetadas a los 90 d de edad. Las corderas fueron mantenidas en un sistema intensivo, alimentadas con heno de avena, ensilado de maíz, heno de alfalfa, alimento comercial y sales minerales, de acuerdo con sus requerimientos nutricionales. Las corderas permanecieron aisladas totalmente del contacto con los machos. Cada semana se registró el peso y la condición corporal asignando cuartos de punto de la escala del 1 al 5 (1 para emaciada y 5 para obesa), de acuerdo con Russel *et al.* (1984).

### Toma y procesamiento de las muestras sanguíneas

Para identificar la edad a la pubertad de las corderas, el inicio de la actividad reproductiva se determinó mediante mediciones de progesterona en plasma, semanalmente en 3 mL de sangre, extraída por punción yugular, en tubos vacutainer con heparina

was that the daughters of continuous ewes are not based on the photoperiod and begin their puberty during the anestrus, before the daughters of the seasonal ones, when the births occur out of season. The objective was to determine the beginning of the ovary activity in Pelibuey ewes born in autumn and winter to prove whether the daughters of ewes with continuous reproductive activity begin puberty before the daughters of seasonal ewes.

## MATERIAL AND METHODS

### Localization

The study was carried out in a research center located in the Mexican highlands, at 19 °N, with climate c(w)b(ij), semi-cold, semi-humid, summer rains, with rainfall of 800 to 1200 mm annually and average temperature of 19 °C (García, 1987).

### Animals

The Pelibuey ewe lambs were eight daughters of continuous ewes (C) and eight daughters of seasonal ewes (S) born in autumn (November) and 21 ewe lambs (11C and 10S) born in winter (December-January). The ewe lambs were kept all the time with their mothers and were weaned at 90 d of age. The ewe lambs were maintained in an intensive system, fed with oats hay, maize silage, alfalfa hay, and commercial feed and mineral salts, according to their nutritional requirements. The ewe lambs remained totally isolated from contact with the males. Each week the weight and body condition was recorded, assigning point fourths in the scale from 1 to 5 (1 for emaciated and 5 for obese), based on Russel *et al.* (1984).

### Blood sample drawing and processing

To identify the age at puberty of the ewe lambs, the beginning of the reproductive activity was determined through progesterone measurements in plasma, weekly in 3 mL of blood, extracted by jugular puncture, in vacutainer tubes that contained heparin as anticoagulant. Before 1 h of having drawn them, the samples were centrifuged at 1000 x g for 10 min. The separated plasma was deposited in vials and kept at 20 °C until their analysis.

Progesterone was quantified in the blood plasma with the technique of radioimmunoassay in solid phase, validated in sheep (Padmanabhan *et al.*, 1995), with a commercial kit (Coat-A-Count®, Siemens). The coefficients of intra-assay and inter-assay variation were 5.5 and 4.81 %. The analytical sensitivity

como anticoagulante. Antes de 1 h de haberlas tomado, las muestras se centrifugaron 10 min a 1000 x g. El plasma separado se depositó en viales y se mantuvo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

La progesterona se cuantificó en el plasma sanguíneo con la técnica de radioinmunoensayo en fase sólida, validado en el ovino (Padmanabhan *et al.*, 1995), con un kit comercial (Coat-A-Count<sup>®</sup>, Siemens). Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 5.5 y 4.81 %. La sensibilidad analítica fue  $0.2\text{ ng mL}^{-1}$  ( $0.06\text{ nmol L}^{-1}$ ). El muestreo se inició cuando la edad de las corderas era cercana a 4 meses. La primera ovulación se consideró cuando la concentración de progesterona fue igual o mayor a  $1\text{ ng mL}^{-1}$  en cada muestra (Light *et al.*, 1994).

### Análisis estadístico

En el estudio se evaluaron las diferencias en la presentación de la pubertad entre hijas de hembras continuas y de hembras estacionales en cada época de parición (otoño o invierno), en las variables edad, peso, condición corporal a la primera ovulación y el diferencial del peso al destete-peso a la primera ovulación (DPDP1aov), que fue el peso ganado desde el destete de las corderas hasta la primera ovulación (peso a la primera ovulación, menos peso al destete). SAS (2002) se utilizó para análisis de varianza de acuerdo con el siguiente modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + E_j + \varepsilon_{ijk}$$

donde  $y_{ijk}$  es la variable en estudio (edad, peso, condición corporal y el diferencial del peso al destete-peso a la primera ovulación),  $\mu$  es la media general,  $\tau_i$  es la actividad (continua o estacional),  $E_j$  es la época del año (otoño o invierno, con diferente número de observaciones), y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error experimental.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre las corderas, hijas de ovejas continuas e hijas de ovejas estacionales, no existió diferencia en la edad a la pubertad, en ninguna de las temporadas de parición ( $p > 0.05$ ; Cuadro 1).

Todas las corderas del estudio nacieron fuera de temporada, por lo que se suponía que las hijas de ovejas con actividad reproductiva continua alcanzarían la pubertad antes que las hijas de ovejas estacionales, ya que estas no responderían a las señales fotoperiódicas. Además, el anestro, que normalmente ocurre en la primavera, y es época en

was  $0.2\text{ ng mL}^{-1}$  ( $0.06\text{ nmol L}^{-1}$ ). The sampling began when the ewe lambs were approximately 4 months of age. The first ovulation was considered when the progesterone concentration was equal or higher than  $1\text{ ng mL}^{-1}$  in each sample (Light *et al.*, 1994).

### Statistical analysis

In the study the differences in the presentation of puberty between daughters of continuous ewes and seasonal ewes in each birthing season (autumn or winter) were evaluated, in the variables age, weight, body condition at first ovulation, and differential of weight at weaning-weight at first ovulation (DPDP1aov), understood as the weight gained since the weaning of ewe lambs until the first ovulation (weight at first ovulation, minus weight at weaning). SAS (2002) was used for the analysis of variance according to the following model:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + E_j + \varepsilon_{ijk}$$

where  $y_{ijk}$  is the study variable (age, weight, body condition and differential of weight at weaning-weight at first ovulation),  $\mu$  is the general mean,  $\tau_i$  is the activity (continuous or seasonal),  $E_j$  is the time of year (autumn or winter, with different number of observations), and  $\varepsilon_{ijk}$  is the experimental error.

## RESULTS AND DISCUSSION

Among the ewe lambs, daughters of continuous ewes and seasonal ewes, there was no difference in the age at puberty, in any of the birthing seasons ( $p > 0.05$ ; Table 1).

All the ewe lambs in the study were born out of season, so it was assumed that the daughters of ewes with continuous reproductive activity would reach puberty before the daughters of seasonal ewes, since these would not respond to the photoperiodical signals. Besides, the anestrus, which normally happens in the spring, and the season when they would be reaching puberty would not affect them. The results indicated that the age at which the Pelibuey ewe lambs would reach puberty, is independent of the capacity of their mothers to present seasonal or continuous reproductive activity, since there was no difference in this variable in the lamb groups or among those born in autumn and in winter. This is possibly because in both groups they responded similarly to the photoperiod. The characteristic of reproductive continuity is



**Cuadro 1. Edad, peso, condición corporal y diferencial del peso al destete menos el peso a la primera ovulación (DPDP1aOV), en corderas Pelibuey nacidas en otoño o invierno, de madres con reproducción estacional o continua.**
**Table 1. Age, weight, body condition and differential of weight at weaning minus weight at first ovulation (DPDP1aOV), in Pelibuey ewe lambs born in autumn or winter, from mothers with seasonal or continuous reproduction.**

Variable	General		Actividad continua <sup>†</sup>		Actividad estacional <sup>†</sup>	
	Otoño	Invierno	Otoño	Invierno	Otoño	Invierno
Época de nacimiento						
Edad a la pubertad (días)						
Promedio ± d.e.	239 ± 10	230 ± 42	236 ± 14	215 ± 52	242 ± 6	244 ± 26
Mínimo-Máximo	218-258	138-314	218-258	138-314	234-249	212-302
Peso (kg)						
Promedio ± d.e.	29 ± 4.0	25 ± 4.0	28 ± 5.0	24 ± 5.0	30 ± 3.0	25 ± 3.6
Mínimo-Máximo	19-36	13-31.5	19-35	13-31.5	26-36	19-30
Condición corporal <sup>‡</sup>						
Promedio ± d.e.	3 ± 0.9	2 ± 0.7	3 ± 0.8	2.4 ± 1.0	3 ± 1.1	2 ± 0.6
Mínimo-Máximo	2.2-3.5	2-3	2.2-3.5	2-2.8	2.7-3.3	2.3-3
DPDP1 <sup>a</sup> OV (kg)						
Promedio ± d.e.	11.5 ± 2.0	10.6 ± 3.0	10.7 ± 2.4	9.8 ± 3.4	12.1 ± 1.6	11.3 ± 2.6
Mínimo-Máximo	7-15	4-15	7-15	4-14.5	10.5-14.5	6-15

<sup>†</sup> Patrón reproductivo de la madre. <sup>‡</sup> Escala (1-5) <sup>¶</sup> Reproductive pattern of the mother. <sup>§</sup> Scale (1-5).

la que estarían alcanzando la pubertad no les afectaría. Los resultados indicaron que la edad a la que alcanzan la pubertad, las corderas Pelibuey es independiente de la capacidad de sus madres para presentar actividad reproductiva estacional o continua, ya que no existió diferencia en esta variable en los grupos de corderas ni entre las nacidas en otoño y las nacidas en invierno. Esto, posiblemente porque ambos grupos respondieron de manera similar al fotoperiodo. La característica de continuidad reproductiva se expresa más en la oveja adulta que en la primípara (núlípara) (Valencia *et al.*, 2006) y aparentemente no se expresa en la prepúber.

Fue relevante que en este estudio la pubertad se presentara entre 230 y 239 d, similar a lo documentado en estudios fuera de temporada reproductiva (239 d, Álvarez y Andrade, 2008; 231 d, Zavala *et al.*, 2008), en los que el inicio de la pubertad se determinó con la manifestación de celos y la ayuda de machos, que estimulan a las hembras que adelantan la pubertad (Álvarez y Andrade, 2008).

Las ovejas de razas originarias de países templados (Suffolk) alcanzan la pubertad en el otoño del mismo año cuando las corderas nacen en la primavera (temporada normal de nacimientos), siempre y cuando tengan el desarrollo somático adecuado; las nacidas

expressed mostly in adult ewes than in pre-lambing ewes (Valencia *et al.*, 2006) and apparently is not expressed in the prepubescent.

It was relevant that in this study puberty came about at between 230 and 239 d, similar to what was documented in studies outside the reproductive season (239 days, Álvarez and Andrade, 2008; 231 days, Zavala *et al.*, 2008), where the beginning of puberty was determined with the manifestation of heats and the help of males, which stimulate the females that have puberty ahead of time (Álvarez and Andrade, 2008).

Sheep of native breeds from temperate countries (Suffolk) reach puberty in the autumn of the same year when the ewe lambs are born in the spring (normal season of births), insofar as they have the adequate somatic development; those born in autumn wait for the short days in the following autumn for this to happen, even when they have reached the age and the adequate weight during the spring (Karsch *et al.*, 1984). That is, ewe lambs have to be exposed first to long days (spring-summer) and then to short days for puberty to take place (Foster *et al.*, 1985).

In this study, the ewes were exposed at 6 months to an increase in the natural photoperiod (December

en el otoño esperan los días cortos del siguiente otoño para que esto ocurra, aunque hayan alcanzado la edad y el peso adecuado durante la primavera (Karsch *et al.*, 1984). Es decir, que las corderas tienen que exponerse primero a días largos (primavera-verano) y luego a días cortos para que la pubertad se presente (Foster *et al.*, 1985).

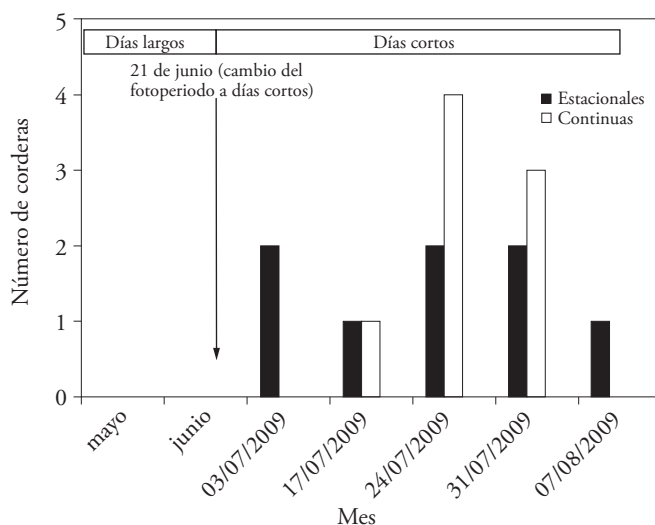
En este estudio, las ovejas estuvieron expuestas a los 6 meses de aumento del fotoperiodo natural (21 de diciembre al 21 de junio). Un hallazgo interesante es la rapidez con la que la pubertad se presentó desde el 21 de junio, cuando los días se acortan, ya que la mayoría de las corderas nacidas en otoño (94 %) ovuló en julio (Figura 1). Así, entre 12 y 48 d, desde el cambio en la dirección del fotoperiodo, fueron suficientes para que la pubertad ocurriera y en forma notablemente sincrónica. Inclusive, tres de las corderas nacidas en invierno ovularon antes del solsticio de verano, por lo que necesitaron solo exposición a días largos (Figura 2). Algo semejante a lo que ocurre en las corderas Pelibuey se presenta en las ovejas D'man (raza subtropical de Marruecos), que no requieren el cambio de fotoperiodo de días largos a cortos para iniciar la pubertad (Lahlou-Kassi' *et al.*, 1989).

Los resultados indicaron que algunas corderas Pelibuey, como las ovejas D'man, no requirieron días largos seguidos de días cortos para presentar la pubertad o reaccionaron rápido al cambio de fotoperiodo, de días largos a días cortos, como las corderas nacidas en otoño (Figura 1). Álvarez y Andrade (2008) observaron que corderas Pelibuey alcanzaron la pubertad en abril y mayo, a edad semejante a la observada en

21 to June 21). An interesting finding is that the speed at which puberty presented itself starting in June 21, which is when the days become shorter, since most of the ewe lambs born in autumn (94 %) ovulated in July (Figure 1). Therefore, between 12 and 48 d, since the change in the photoperiod's direction, were enough for puberty to happen and in a notably synchronic manner. In fact, three of the ewe lambs born in winter ovulated before the summer solstice, so they only need exposure to long days (Figure 2). Something similar to what happens in Pelibuey lambs were present in D'man sheep (subtropical breed from Morocco), which do not require the change in the photoperiod of long days to short days for puberty to begin (Lahlou-Kassi' *et al.*, 1989).

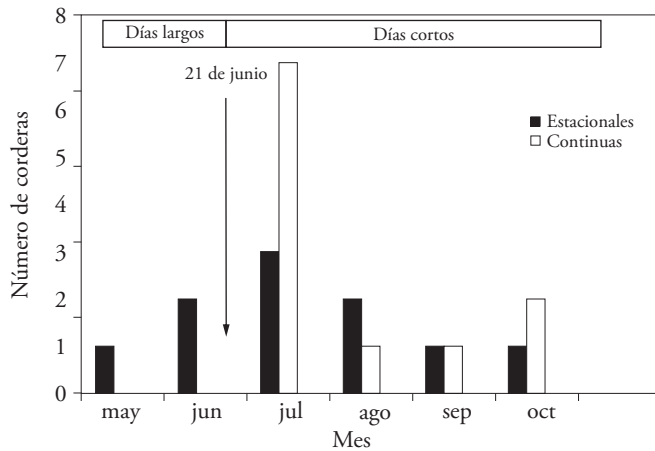
The results indicated that some Pelibuey lambs, such as the D'man sheep, did not require long days followed by short days to present puberty or react rapidly to the change in the photoperiod, from long days to short days, such as ewe lambs born in autumn (Figure 1). Álvarez and Andrade (2008) observed that Pelibuey ewe lambs reached the puberty in April and May, at an age similar to the one observed in our study, and they also didn't need to be exposed to short days.

It is possible for Pelibuey ewe lambs that do not respond to the change in photoperiod of the body weight to be the most important signal for puberty to begin. In contrast, other seasonal breeds require the stimuli of changes in the photoperiod and the body weight to attain puberty (Foster *et al.*, 1985).



**Figura 1. Relación del número de corderas con la fecha de la primera ovulación (fecha a la pubertad), en corderas hijas de ovejas con actividad reproductiva continua y estacional, nacidas en otoño.**

**Figure 1. Relation of the number of ewe lambs with the date of the first ovulation (date at puberty), in ewe lambs that are daughters of ewes with continuous and seasonal reproductive activity, born in autumn.**



**Figura 2.** Mes de inicio de la ovulación en corderas nacidas en invierno, hijas de ovejas Pelibuey con actividad reproductiva continua y estacional. Tres corderas ciclaron antes que los días comenzaran a acortarse (21 de junio).

**Figure 2.** Month from beginning of ovulation in ewe lambs born in winter, daughters of Pelibuey ewes with continuous and seasonal reproductive activity. Three ewe lambs cycled before the days began to shorten (June 21).

nuestro estudio, y tampoco necesitaron exponerse a días cortos.

Es posible que en las corderas Pelibuey que no responden al cambio de fotoperiodo el peso corporal sea la señal más importante para iniciar la pubertad. En contraste, otras razas estacionales necesitan los estímulos de cambios del fotoperiodo y del peso corporal para logra la pubertad (Foster *et al.*, 1985).

### CONCLUSIONES

La edad para la pubertad de las corderas Pelibuey es independiente del patrón reproductivo (estacional o continuo) de sus madres. Ambos grupos probablemente responden igual al estímulo fotoperiódico y el comportamiento reproductivo estacional es la característica que se expresa en la vida de la oveja adulta. Hay corderas Pelibuey capaces de expresar la pubertad sin el estímulo del cambio de días largos a cortos.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), proyecto PAPIIT IN219412-3 por haber proporcionado el financiamiento.

### LITERATURA CITADA

- Álvarez L., y S. Andrade. 2008. El efecto macho reduce la edad al primer estro y ovulación en corderas Pelibuey. *Arch. Zootec.* 57: 91-94.
- Arroyo L., J., J. Gallegos S., A. Villa-Godoy, J. M. Berrucos, G. Perera, and J. Valencia. 2007. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19° north latitude. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 24-30.

### CONCLUSIONS

The age for puberty in Pelibuey ewe lambs is independent of the reproductive pattern (seasonal or continuous) of their mothers, both groups probably respond equally to the photoperiodic stimulus and the seasonal reproductive behavior is the characteristic that is expressed in the life of the adult sheep. There are Pelibuey ewe lambs capable of expressing puberty without the stimulus of a change from long days to short days being necessary for this.

—End of the English version—



- Cambellas J., B. 1993. Comportamiento reproductivo en ovinos tropicales. *Rev. Cient. Luz.* 3: 135-141.
- De Lucas J., E. González-Padilla, y L. Martínez. 1997. Estacionalidad reproductiva de ovejas de cinco razas en el altiplano central mexicano. *Téc. Pecu. Méx.* 35: 25-31.
- Dýrmundsson O., R. 1981. Natural factors affecting puberty and reproductive performance in ewe lambs: a review. *Livest. Prod. Sci.* 8: 55-65.
- Foster D., L., and L. Jackson. 2006. Puberty in the sheep. *In: Knobil, E., and J. D. Neill. (eds). The Physiology of Reproduction.* 3rd Ed. Academic Press, New York. U.S.A. pp: 2127-2176.
- Foster D., L., D. H. Olster, and S. M. Yellon. 1985. Neuroendocrine regulation of puberty by nutrition and photoperiod. *In: Flamigni C., S. Venturoli, and J. R. Givens. (eds). Adolescence in females. Year Book Medical Publ. Chicago, III. U.S.A.* pp: 1-21.
- García E. 1987. Modificaciones al Sistema de Clasificación climática de Köppen. 4ª ed. Instituto de Geografía, UNAM, México. 217 p.
- Hafez E., S. E. 1952. Studies on the breeding season and reproduction on the ewe. *J. Agric. Sci.* 42: 189-265.

- Hanocq E., L. Bodyn, J. Thimonier, J. Teyssier, B. Malpaux, and P. Chemineau. 1999. Genetic parameters of spontaneous spring ovulatory activity in Mérinos d'Arles sheep. *Genet. Sel. Evol.* 31: 77-90.
- Karsch F. J., E. L. Bittman, D. L. Foster, R. L. Goodman, S. J. Legan, and J. E. Robinson. 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec. Prog. Hormone. Res.* 40: 185-231.
- Lahlou-Kassi' A., Y. M. Berger, G. E. Bradford, R. Boukhliq, A. Tibary, L. Derqaoup, and I. Boujenane. 1989. Performance of D'Man and Sardi sheep on accelerated lambing I. Fertility, litter size, postpartum anoestrus and puberty. *Small Rumin. Res.* 2: 225-239.
- Light J., E., W. Silvia, and R. Reid. 1994. Luteolytic effect of prostaglandin F2 alpha and two metabolites in ewes. *J. Anim. Sci.* 72: 2718-2721.
- Padmanabhan V., N. P. Evans, G. E. Dahl, K. L. McFadden, D. T. Mauger, and F. J. Karsch. 1995. Evidence for short or ultrashort loop negative feedback of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 62: 248-58.
- Roldán R., A., L. Zarco, J. M. Berruecos, y J. Valencia. 2014. Identificación de ovejas Pelibuey con actividad reproductiva continua. *In: Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias.* 6-9 de octubre. La Habana, Cuba. Archivo digital sin páginas.
- Russel A. 1984. Body condition scoring of sheep. In *Practice* 6: 91-93.
- SAS. Costumers support (computer program) versión 9.0 NC (USA): SAS Institute Inc., 2002.
- Valencia J., J. M. Berruecos V., L. Zarco, H. Pérez R., y A. Roldán R. 2010. Métodos de selección de ovejas Pelibuey con actividad reproductiva continua. *In: Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Buiatría.* Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos. 6 de agosto. Monterrey, Nuevo León. pp: 220.
- Valencia J., A. Porras, O. Mejía, J. M. Berruecos, y L. Zarco. 2006. Actividad reproductiva de ovejas Pelibuey durante los meses del anestro: influencia de la presencia del macho. *Rev. Cient. Luz.* 16: 136-141.
- Valencia Z., M., and E. Gonzalez-Padilla. Pelibuey sheep in Mexico. 1983. *In: Fitzhugh H., A., and G. E. Bradford (eds). Hair Sheep of Western Africa and the Americas.* Westview Press, Boulder Colorado. pp. 55-73.
- Zavala E., R., J. R. Ortiz O., J. P. Ugalde R., P. Montalvo M., A. Sierra V., y J. R. Sanginés G. 2008. Pubertad en hembras de cinco razas ovinas de pelo en condiciones de trópico seco. *Zootecnia. Trop.* 26: 465-473.

## **ANEXO III**

### **CAPÍTULOS DE LIBROS**

## ***TOXOCARIOSIS POR *Toxocara canis*: Factores biológicos de la enfermedad.***

---

---

Víctor Hugo Del Río Araiza  
Jorge Morales Montor

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.

---

### **INTRODUCCIÓN**

#### ***Toxocara canis***

*Toxocara canis* (Werner, 1782) es el helminto nematodo causante de la toxocariosis, enfermedad parasitaria de importancia médico-veterinaria. Este parásito tiene como hospederos definitivos a los perros, zorros, coyotes y lobos (principalmente los cachorros), en México y en muchas otras partes del mundo es el helminto más comúnmente encontrado en perros (Cordero *et al.*, 1999). También posee hospederos paraténicos, dentro de los cuales podemos encontrar a la mayoría de los mamíferos (hombre, cerdos, ovejas, rata, ratón, etc.), aves y además algunos invertebrados como las lombrices de tierra y artrópodos como las pulgas (Alba, 2011). Esta helmintiasis es considerada una de las zoonosis con mayor distribución en el mundo debido a la amplia convivencia que ha generado el hombre con perros y gatos domésticos (Despommier, 2003).

#### **Clasificación taxonómica**

Los miembros del género *Toxocara* son gusanos que presentan dimorfismo sexual, son de color blanquecino con forma cilíndrica y extremos puntiagudos, presentan tres labios y dos aletas cervicales en la parte posterior. Las especies pertenecientes a este género pueden ser distinguidas entre sí teniendo como base la morfología de los labios, las aletas cervicales, la longitud de las espículas y las características del aparato reproductor femenino.

**Reino:** Animalia

**Phylum:** Nematoda

**Orden:** Ascaridida

**Superfamilia:** Ascaridoidea

**Familia:** Toxocaridae

**Género:** *Toxocara*

**Especie:** *canis*

Cuadro 1. Otras especies del género *Toxocara*

Nombre científico	Autor
<i>Toxocara alienata</i>	Rudolphi, 1819
<i>Toxocara anacumae</i>	Noda, 1966
<i>Toxocara apodemi</i>	Olsen, 1957
<i>Toxocara canarisi</i>	Puylaert, 1967
<i>Toxocara canis</i>	Werner, 1782
<i>Toxocara cati</i>	Schrank, 1788
<i>Toxocara cynonycteridis</i>	Parona, 1889
<i>Toxocara elephantis</i>	Rudolphi, 1819
<i>Toxocara genettae</i>	Warren, 1972
<i>Toxocara hippopotami</i>	Canavan, 1931
<i>Toxocara indica</i>	Naidu, 1981
<i>Toxocara lyncis</i>	Macchioni, 1999
<i>Toxocara mackerrasae</i>	Sprent, 1957
<i>Toxocara malaysiensis</i>	Gibbons, Jacobs & Sani, 2001
<i>Toxocara manzadiensis</i>	Vuylsteke, 1956
<i>Toxocara mystax</i>	Zeder, 1800
<i>Toxocara paradoxura</i>	Kou, 1958
<i>Toxocara pearsei</i>	Chitwood, 1935
<i>Toxocara pteropodis</i>	Baylis, 1936
<i>Toxocara sprenti</i>	Warren, 1972
<i>Toxocara suricattae</i>	Ortlepp, 1940
<i>Toxocara tanuki</i>	Yamaguti, 1941
<i>Toxocara vajrasthira</i>	Sprent, 1972
<i>Toxocara vincenti</i>	Puylaert, 1967
<i>Toxocara vitulorum</i>	Goeze, 1782
<i>Toxocara warreni</i>	Durette-Desset & Chabaud, 1974

Fuente: <http://insects.tamu.edu/research/collection/hallan/Nematoda/Family/Ascarididae.txt>

## **MORFOLOGÍA**

### **Huevos**

Son de forma oval, miden de 70 a 90  $\mu\text{m}$  aproximadamente y son de color blanquecino. Presentan tres capas dispuestas en forma concéntrica formando una cubierta gruesa con presencia de fasetas (Alba *et al.*, 1994). Esta característica les confiere una gran resistencia a agentes físicos, químicos y mecánicos presentes en el ambiente. La primera capa es de origen albuminoso, enseguida y por debajo viene la capa quitinosa y finalmente una capa lipóide formada por gránulos refringentes

provenientes del citoplasma. Existe una cuarta cubierta formada por la adherencia de las secreciones uterinas del parásito al huevo. Al ser expulsado, el huevo entra en contacto con la bilis del tracto intestinal y esta última capa se endurece confiriéndole un color marrón.

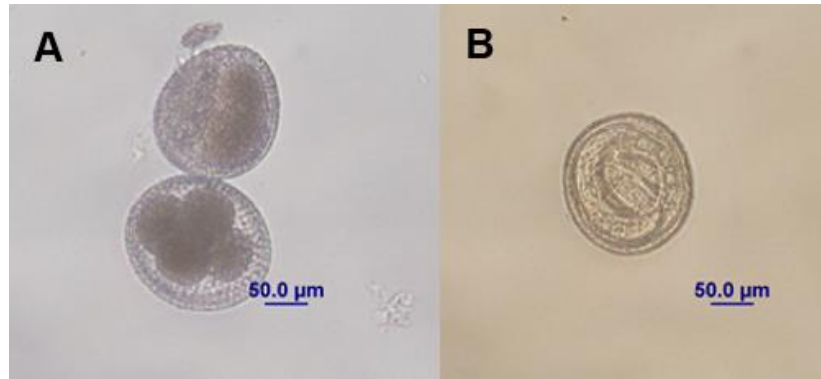


Figura 1. Microscopía óptica 10x, huevos de *T. canis*:  
A) Huevo sin larva y blastomerado B) Huevo larvado.

### **Larvas**

Las larvas de segundo estadio (L2) que se forman dentro del huevo son la fase infectante del parásito. No obstante, algunos autores mencionan que la fase infectante es la larva de tercer estadio, esto debido a la observación de que la larva sufre dos mudas dentro del huevo antes de volverse infectante (Brunaska *et al.*, 1995). Son de color transparente, tienen una longitud aproximada de 400 μm y un diámetro a nivel del esófago de 18 a 21 μm (Nichols, 1956).



Figura 2. Microscopía óptica 10x, larva infectante de *T. canis*.  
La flecha negra indica la porción anterior de la larva.



## **Adultos**

Son nematodos dimórficos de color blanquecino; los machos miden de 4 a 10 cm de longitud y las hembras llegan a medir hasta 18 cm. En la parte anterior presentan tres labios que no sobresalen del cuerpo. La superficie interna de los labios presenta una cresta dentada o pequeños dientes. Presenta aletas cervicales que le confieren la forma de “punta de flecha”. Los machos terminan en forma enroscada y en la porción ventral presentan dos espículas. En las hembras la vulva se encuentra en el primer tercio del cuerpo y pueden producir hasta 200,000 huevos al día por hembra grávida pero, estos huevos no están embrionados al momento de salir (Alba, 2011).

## **Ciclo de vida**

La relación existente entre este parásito y sus hospederos es extremadamente compleja. El ciclo de vida comienza con la eliminación de huevos no larvados en las heces de perros infectados y va a variar dependiendo del tipo de hospedero (definitivo o paraténico), de la edad del hospedero definitivo (cachorro o adulto) y del estado fisiológico (gestante o no gestante). En condiciones normales el desarrollo de la larva infectante requiere de 9 a 11 días a 24 °C y de 3 a 5 días a 30 °C en presencia de oxígeno y humedad relativa del 75% (Cordero *et al.*, 1999; Alba, 2011) (Figura 4).



Figura 3. Adultos de *T. canis*. Tomado de;  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/larva-migrans-visceral.html>

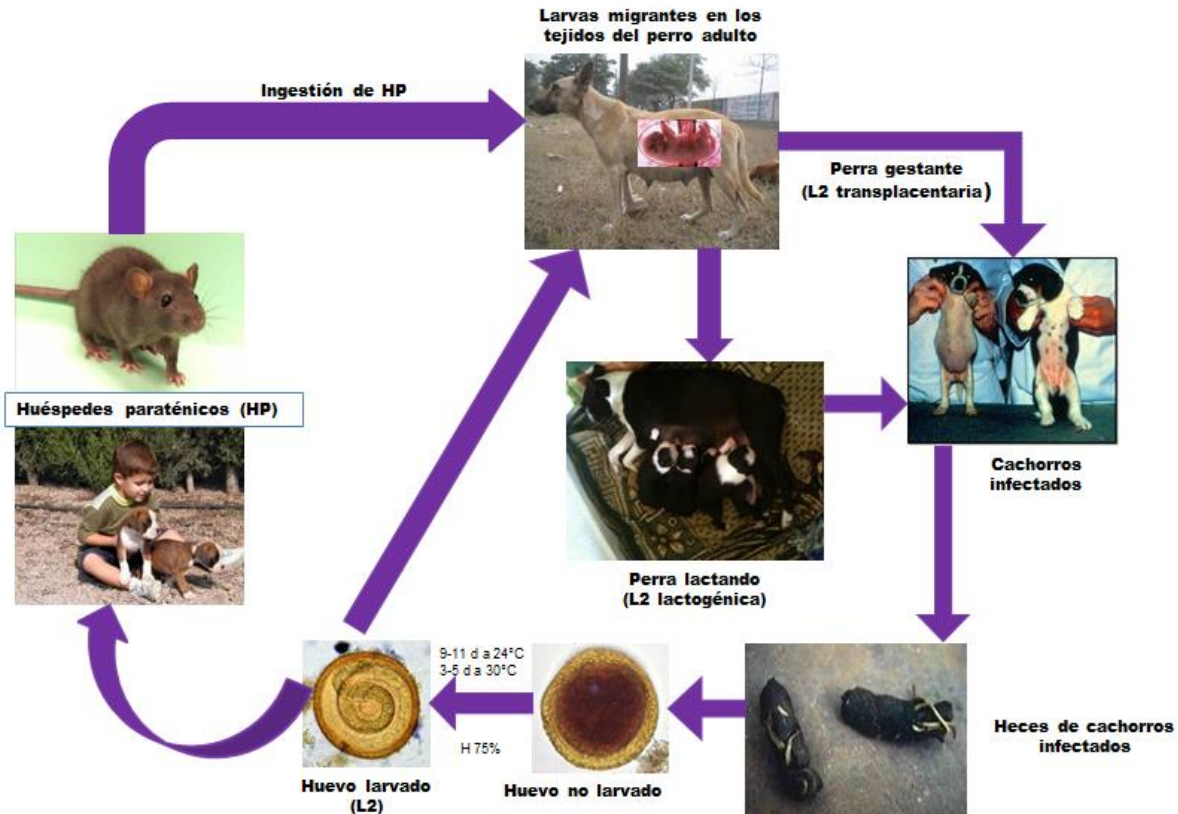


Figura 4. Ciclo biológico de *T. canis*. Desarrollo del huevo larvado infectante (L2), ingestión de huevos por parte de hospederos paraténicos (HP) (rata, humano, etc.) o definitivos (perros), ingestión de HP con larvas somáticas, transmisión de las L2 transplacentaria en hembras gestantes y lactogénica en hembras lactantes.

### En hospederos definitivos

#### En cachorros

Los cachorros menores de tres meses de edad son los principales portadores de las fases adultas del parásito. El contagio en ellos puede ser por distintas vías; transmisión materna (transplacentaria o lactogénica), o por la ingesta de huevos larvados. La forma de infección más frecuentemente observada en los cachorros es la vía transplacentaria y se ha observado que las hembras con larvas somáticas pueden infectar a sus cachorros durante varias gestaciones consecutivas (Soulsby, 1983). Cuando los cachorros ingieren huevos larvados o larvas presentes en el calostro y la leche, estas atraviesan la pared intestinal entrando al flujo linfático y por vena aorta llegan al hígado dos días después. Posteriormente viajan por vena cava al corazón derecho y por medio de la arteria pulmonar penetran a los pulmones (migración hepato-cardio-pulmonar). Después de permanecer un tiempo en los capilares pulmonares las larvas pasan a los alveolos, migran hacia la faringe en donde son redeglutidas (migración

traqueal) y se establecen en el estómago. Durante esta migración la larva sufre una muda y se transforma en larva de tercer estadio (L3). Ya en el estómago, las larvas permanecen ahí un tiempo (aproximadamente hasta el día 10 post-infección) y pasan al duodeno donde ocurre la muda al cuarto y quinto estadio para convertirse en parásitos adultos entre los 19 y 27 días post-infección. Si los cachorros fueron infectados por vía transplacentaria las larvas llegan al hígado fetal y se transforman en L3. Cuando se da el nacimiento, las larvas se encuentran en los pulmones y permanecerán ahí durante la primera semana de vida. La muda hacia el cuarto estadio se puede dar durante la primera o segunda semana de edad y hacia el final de esta semana, mudan al quinto estadio para después convertirse en adultos (Figura 5). En este tipo de transmisión, la eliminación de huevos en heces da inicio a partir de los 15 días de edad. Por otra parte, si la transmisión fue por vía lactogénica o por ingesta de huevos larvados la eliminación de huevos sucede de 4 a 5 semanas post-infección (Quiroz, 2003; Alba, 2011).

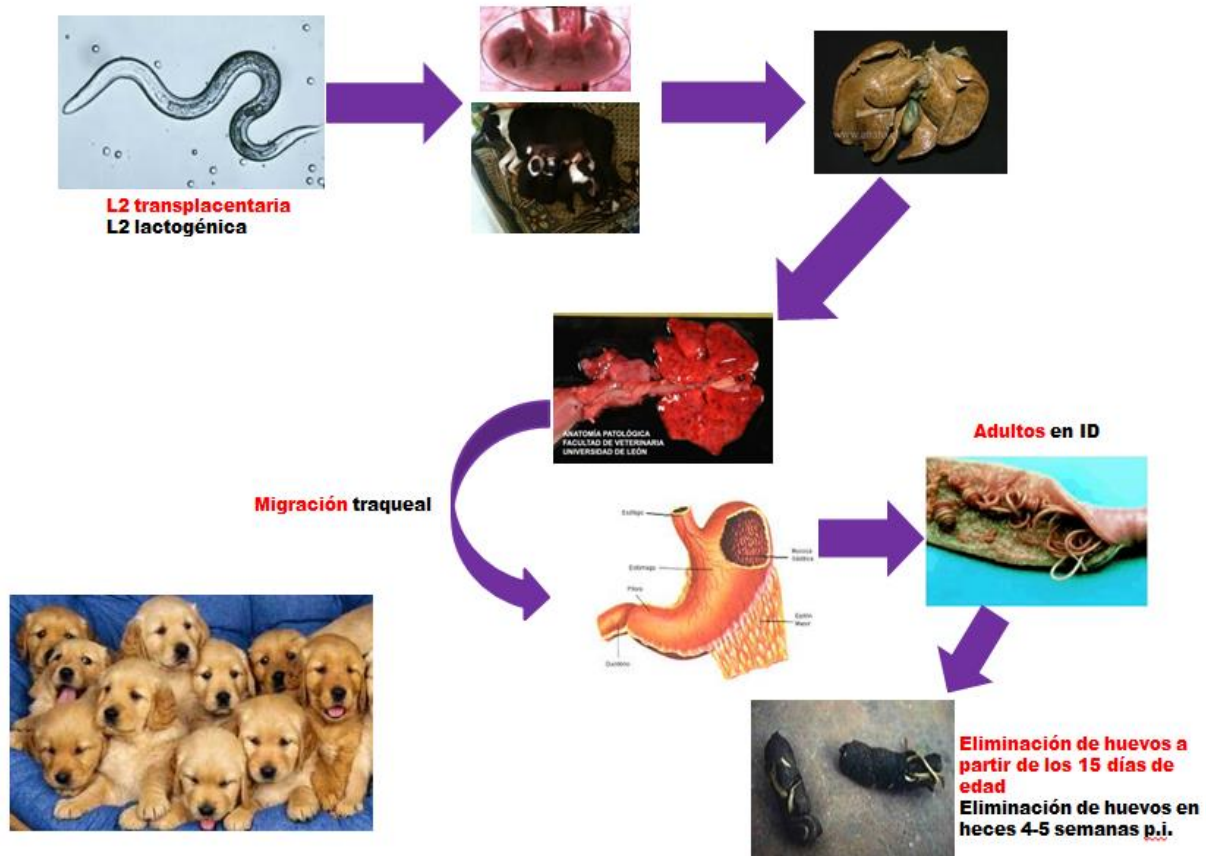


Figura 5. Ciclo biológico en cachorros (transmisión transplacentaria y lactogénica).

### **En perros adultos, gestación y lactancia**

La infección puede darse por dos vías; Por la depredación de hospederos paraténicos con larvas somáticas enquistadas y/o por la ingesta de huevos larvados. Cuando hay ingesta de hospederos paraténicos las larvas se transforman en adultos sin la necesidad de realizar una migración somática y estos perros tienen la capacidad de eliminar huevos por un corto periodo de tiempo. Por otra parte, si la infección se da por medio de huevos larvados, las larvas eclosionan a nivel intestinal y atraviesan esta pared. Posteriormente realizan una migración hepato-cardio-pulmonar y regresan al corazón para distribuirse a los distintos órganos y tejidos (principalmente hígado, cerebro, pulmones, riñón y músculo) donde permanecerán como L2 enquistadas (Figura 6). En hembras gestantes las larvas somáticas sufren un proceso de reactivación el cual, al parecer es desencadenado por el aumento en la concentración de PRL (Overgaauw *et al.*, 1998). Actualmente existen escasos reportes del papel de la PRL en la infección por *T. canis*, no obstante, un estudio realizado en un modelo murino sugiere que la reactivación y migración de las larvas somáticas hacia el útero y la glándula mamaria podrían estar desencadenados por un aumento en la concentración de esta hormona, favoreciendo la transmisión transplacentaria y lactogénica a la descendencia (Jin *et al.*, 2008). Debido a lo anterior se podría estar dando un patrón de reactivación similar en los canidos, donde, el aumento en la concentración de PRL se presenta a partir del último tercio de gestación (Día 40-42).

### **En hospederos paraténicos**

Sucede algo muy similar que en los perros adultos pero sin que exista desarrollo de parásitos adultos. Las larvas se van a establecer en los distintos órganos y tejidos donde entran en un estado de latencia y permanecerán viables por largos periodos de tiempo esperando a ser ingeridas por un hospedero definitivo (Figura 6), de no ser ingeridas las larvas mueren y se calcifican (Quiroz, 2003; Alba, 2011).

## **TOXOCARIOSIS**

La toxocariosis es una infección zoonótica cosmopolita producida por *T. canis* y en menor grado por *Toxocara cati* (*T. cati*). En los cachorros esta enfermedad puede ocasionar manifestaciones clínicas digestivas o nerviosas y ocasionalmente la muerte. La enfermedad en el hombre se produce por la ingesta accidental de huevos larvados acumulados en el agua y alimentos contaminados. Es más común en niños que juegan en áreas verdes altamente contaminadas y que por deficiencias minerales tienen hábitos como la geofagia (Holland *et al.*, 1991; Overgaauw, 1997). Para una mejor comprensión de la enfermedad se clasifica en base a las formas clínicas que presenta, las cuales son: *Larva Migrans Visceral (LMV)* (Beaver *et al.*, 1952), *Toxocariosis Ocular (TO)* (Wilder, 1950), *Toxocariosis Neurológica (TN)* (Glickman *et al.*, 1981), *Toxocariosis Encubierta (TE)* y *Toxocariosis Asintomática (TA)*.



## **Signos clínicos en perros**

Los animales con infecciones leves no presentan manifestaciones clínicas aparentes. En infecciones severas, los cachorros son los que principalmente muestran signos clínicos debido a la migración de las larvas por los distintos órganos y tejidos. A su paso por los pulmones pueden generar signos respiratorios como tos, taquipnea y flujo nasal. También se pueden observar signos nerviosos como incoordinación y convulsiones generados por el paso de las larvas por el sistema nervioso central. Los gusanos adultos en el intestino producen pérdida de peso, distensión abdominal, diarrea, vómito (que puede contener parásitos) y en cuadros masivos puede haber peritonitis causada por la ruptura del intestino (Cordero *et al.*, 1999).

## **Cuadro clínico en humanos**

### **Larva Migrans Visceral (LMV)**

Este síndrome fue descrito por primera vez en la década de los 50's, es ocasionado por la migración de las larvas a través de los distintos órganos y tejidos. Se caracteriza por presentar eosinofilia crónica (50-90%), hepatomegalia e hipergamaglobulinemia además de otros signos como dolor abdominal, fiebre y tos crónica. La gravedad de la enfermedad va a variar dependiendo del número de huevos larvados ingeridos así como de la localización de las larvas (Beaver *et al.*, 1952). Los principales órganos afectados son el hígado, el pulmón y los riñones pudiendo presentar lesiones inflamatorias de tipo agudo o crónico. En las lesiones agudas podemos encontrar neutrófilos y una pequeña cantidad de eosinófilos, por otra parte, en los procesos crónicos la lesión característica es el granuloma eosinofílico con infiltración de células mononucleares y fibroblastos (Pearson *et al.*, 1986).

### **Toxocariosis Ocular (TO)**

Este síndrome fue descrito por Wilder (1950) cuando al hacer la revisión de ojos enucleados por sospecha de retinoblastoma encontró presencia de larvas de *T. canis*. Es también conocido como síndrome *Larva Migrans Ocular* (LMO) y es causado por las migraciones esporádicas de una o varias larvas del parásito al ojo del paciente. Las lesiones son de tipo granulomatoso principalmente en la retina y se asocian con corioretinitis, panuveitis, deformación o desprendimiento de la retina y pérdida de la visión (Glickman *et al.*, 1987). La LMO por lo general se observa en ausencia de otros signos y síntomas de LMV. Las manifestaciones clínicas que pueden estar presentes son; estrabismo, falta de agudeza visual, leucorrea, irritación ocular y endoftalmitis (Alba, 2011).

### **Toxocariosis Neurológica (TN)**

La frecuencia con la que se presenta la TN es desconocida y afecta a hospederos de cualquier género y edad. Estas afecciones en el sistema nervioso central (SNC) son raras y, el sitio de invasión va a depender de varios factores como son; el número de huevos larvados o larvas ingeridas, el trasfondo genético del hospedero y la existencia

de una exposición previa con el parásito (Xinou *et al.*, 2003). Entre las manifestaciones neurológicas podemos encontrar meningoencefalitis eosinofílica (Moreira-Silva *et al.*, 2004) y mielitis eosinofílica (Goffette *et al.*, 2000) entre otros. Los síntomas dependerán de la cantidad de larvas que lleguen al cerebro, su localización, la gravedad de las lesiones y los procesos inflamatorios (Xinou *et al.*, 2003). En los humanos se puede llegar a presentar dolor de cabeza, sensibilidad a la luz, confusión, debilidad, cansancio y trastornos visuales. En ratones se han reportado cambios en el comportamiento y aprendizaje en relación al número de larvas acumuladas en el cerebro (Hamilton *et al.*, 2006).

### ***Toxocariosis Encubierta (TE)***

Se caracteriza por signos y síntomas no específicos que además no están incluidos dentro de los anteriores cuadros clínicos (LMV, TO y TN). Este tipo de afectación permanece sin diagnosticar generalmente y los órganos afectados son aquellos por los cuales las larvas realizan su migración. En el caso de daño a los pulmones puede haber compromiso del sistema respiratorio con manifestaciones como bronquitis, pulmonitis y asma. Cabe señalar que no se ha encontrado una relación significativa entre la infección con *T. canis* y el padecimiento de asma (Kincekova *et al.*, 1999), no obstante, el asma puede ser un síntoma incluido en la patogenia de la toxocariosis (Buijs *et al.*, 1995). Los pacientes con asma y con presencia de anticuerpos IgG e IgE específicos contra *Toxocara* son considerados como casos de toxocariosis (Buijs *et al.*, 1997). Otras de las manifestaciones de la TE pueden ser afecciones dérmicas (urticaria y prurigo) (Humbert *et al.*, 2000), articulares (artritis eosinofílica y linfocítica) (Reyes *et al.*, 2001), síndrome del intestino irritado y vasculitis sistémica (Hamidou *et al.*, 2002).

### ***Toxocariosis Asintomática (TA)***

Generalmente la infección por *T. canis* cursa de forma asintomática y es diagnosticada por medio de inmunoserología positiva sin que haya la necesidad de dar algún tratamiento. En algunos casos puede haber una ligera eosinofilia que no constituye peligro alguno para el paciente, sin embargo, es importante tener en cuenta esta condición, sobre todo para los estudios epidemiológicos de esta zoonosis que cada vez resulta ser más frecuente en nuestro medio (Bass *et al.*, 1983; Huapaya *et al.*, 2009).

## **DIAGNÓSTICO**

### ***Diagnóstico en hospederos definitivos***

Para el diagnóstico se debe tomar en cuenta la edad de los cánidos, ya que los cachorros son los más afectados. La presencia de signos clínicos sugerentes de daño pulmonar, el grado de dilatación abdominal, la presencia de signos nerviosos y en algunas ocasiones la presencia de gusanos adultos en el vómito o las heces nos sirven como métodos de diagnóstico (Figura 7).



Figura 7. Presencia de parásitos adultos de *T. canis* en las heces de un cachorro infectado naturalmente.

Técnicas coproparasitoscópicas como Faust o McMaster se utilizan para la detección de huevos en las heces, son técnicas fáciles de realizar y de bajo costo sin embargo, esto solo se puede realizar cuando existe presencia de gusanos adultos en el intestino y la ausencia de los huevos en las heces no excluye de la presencia de larvas somáticas (Overgaauw, 1997; Alba, 2011). Para diagnosticar la presencia de larvas somáticas se utilizan técnicas inmunológicas como ELISA y Western Blot.

### **Diagnóstico en el suelo**

Para determinar la presencia de huevos de *T. canis* en el suelo se emplean técnicas que se basan en la filtración y en una combinación de procesos de sedimentación y flotación en soluciones sobresaturadas. La recuperación de huevos del suelo va a depender de factores ambientales (humedad, temperatura), de la textura del suelo, del sitio de muestreo, de la técnica de diagnóstico empleada, etc. (Oge *et al.*, 2000). También se han utilizado técnicas moleculares como el PCR para el diagnóstico de estadios o fracciones de ADN contenidos en el suelo (Kramer *et al.*, 2002). El conocimiento del grado de infestación del suelo nos da una idea del riesgo potencial para la transmisión de la toxocariosis en una población establecida.

### **Diagnóstico en hospederos paraténicos**

El diagnóstico en hospederos paraténicos se puede realizar por medio de distintas técnicas como pueden ser;

a) **Histopatología:** Por medio de tinciones con Hematoxilina – Eosina (H-E) se puede observar la presencia de los parásitos adultos en aquellos órganos y tejidos por los cuales realiza su migración (Kolbeková *et al.*, 2011). Otra opción consiste en la



detección de los antígenos de excreción-secreción de *T. canis* (AgESTc) por inmunohistoquímica en los casos en los que no existen larvas identificables en los tejidos.

b) **Serología:** La prueba de elección para realizar el diagnóstico serológico es la ELISA con la cual se ha reportado una sensibilidad del 78% y una especificidad del 93%. Adicionalmente se han utilizado otras pruebas como el Western Blot (Magnaval *et al.*, 2002) y el ensayo de unión múltiple de antígenos (MABA) (Noya *et al.*, 1998) incluyendo AgESTc. Recientemente se investigan nuevas técnicas inmunodiagnósticas que incluyen la clonación de antígenos recombinantes para uso serológico, particularmente ELISA y Western-blot con el fin de mejorar su sensibilidad y especificidad (Norhaida *et al.*, 2008).

## **EPIDEMIOLOGÍA**

*T. canis* es uno de los parásitos más frecuentemente encontrado en los perros domésticos, principalmente en los cachorros. Debido a la alta convivencia que se ha generado entre el perro y el ser humano, la toxocariosis es una de las zoonosis helmínticas con mayor difusión a nivel mundial (Despommier, 2003). La prevalencia en los hospederos definitivos es alta, esto debido a la transmisión prenatal con la cual la mayoría de los cachorros nacen infestados. Distintos estudios a lo largo de todo el mundo arrojan frecuencias muy variables que van desde un 2.9% hasta un 86.6% (Cuadro 2).

Esta variación es debida al lugar de procedencia de los animales, la edad de los mismos, las condiciones sanitarias y los métodos de diagnóstico empleados. En el caso de la República Mexicana se muestra la misma variación en estudios realizados en distintos estados (Cuadro 3).

El suelo donde defecan animales infectados, aunado al efecto de la lluvia que puede arrastrar los huevos grandes distancias contaminando alimentos y agua son factores determinantes para la diseminación de la enfermedad sobre todo en hospederos paraténicos. En diferentes estudios se ha mostrado presencia de huevos en áreas verdes (Holland *et al.*, 1991; Martínez-Barbosa *et al.*, 1998), esto, en conjunto con el hábito de algunos niños a la geofagia, los vuelven la población más susceptible a padecer la enfermedad. Alrededor del 40% de la población con complicaciones oculares relacionadas con este parásito revelaron una historia clínica de geofagia (Overgaauw, 1997). Otro riesgo potencial no se encuentra solo en las heces y en la tierra contaminada, sino también en los huevos que se adhieren al pelo de los perros (Roddie *et al.*, 2008). Esta fuente de infección no debe ser subestimada, ya que muchos animales comparten casa y cama con sus dueños.

Cuadro 2. Prevalencia de parásitos adultos de *T. canis* en distintas partes del mundo.

Año	Lugar	No. Casos	Metodo diagnóstico	Prevalencia (%)	Autor
1975	Canadá	239	Coproparasitoscópico	43.5	Seah <i>et al.</i> , 1975
1975	Accra, Ghana	100	Necropsia	40	Anteson y Corkish, 1975
1976	Canadá	332	Coproparasitoscópico	34	Ghadirian <i>et al.</i> , 1976
1976	Brasil	158	Coproparasitoscópico	44.3	Chieffi y Müller, 1976
1977	Egipto	ND	Coproparasitoscópico	80.6	Khalil, 1977
1977	Londres, Inglaterra	1000	Coproparasitoscópico	7.2	Turner y Pegg, 1977
1978	Iowa, EUA	33594	Coproparasitoscópico	3	Lightner <i>et al.</i> , 1978
1978	LA, EUA	158	Coproparasitoscópico	49.5	Marron y Schroeder, 1978
1979	Pretoria, Sudafrica	253	Necropsia	32	Verster, 1979
1980	Bangkok, Tailandia	107	Coproparasitoscópico	6.5	Hinz, 1980
1980	Nueva Zelanda	147	Coproparasitoscópico	2.8	Dodge, 1980
1981	Nigeria	ND	Coproparasitoscópico	18.55	Fashuyi, 1981
1982	Japón	15	Coproparasitoscópico	86.6	Matsumura y Endo, 1982
1982	Praga, Checoslovaquia	500	Coproparasitoscópico	3.2	Valkounová, 1982
1984	Sabah, Malasia	175	Coproparasitoscópico	81	MacAdam <i>et al.</i> , 1984
1984	Freetown, Sierra Leona	2938	Coproparasitoscópico	9	Hassan, 1984
1985	Hessia Neckar, Alemania	155	Coproparasitoscópico	5.8	Hinz y Blatz, 1985
1985	Calabar, Nigeria	254	Coproparasitoscópico	26.7	Uguchukwu y Ejimadu, 1985
1986	Bagdad, Irak	20	Necropsia	40	Tarish <i>et al.</i> , 1986
1988	La Plata, Argentina	2895	Coproparasitoscópico	14.2	Venturini y Radman, 1988
1988	Curazao	133	Coproparasitoscópico	7.5	Saleh <i>et al.</i> , 1988
1988	Grecia	232	Coproparasitoscópico	22.4	Haralabidis <i>et al.</i> , 1988
1991	Bélgica	212	Necropsia	38.9	Vanparijs <i>et al.</i> , 1991
1993	Nairobi, Kenia	156	Necropsia	3	Wachira <i>et al.</i> , 1993
1993	Oklahoma St. USA	21583	Coproparasitoscópico	4	Jordan <i>et al.</i> , 1993
1993	Hannover, Alemania	3329	Coproparasitoscópico	6.9	Epe <i>et al.</i> , 1993
1993	Melboun, Australia	493	Coproparasitoscópico	17.4	Johnston y Gasser, 1993
1994	Dublin, Irlanda	350	Coproparasitoscópico	82.6	O'Lorcain, 1994
1997	Ibaraki, Japón	916	Necropsia	79.9	Saeki <i>et al.</i> , 1997
1997	Holanda	272	Coproparasitoscópico	2.9	Overgaauw, 1997 (b)
2002	St Paulo, Brasil	271	Coproparasitoscópico	5.5	Oliveira-Sequeira <i>et al.</i> , 2002
2003	Italia	295	Coproparasitoscópico	33.6	Hablutzetel <i>et al.</i> , 2003
2004	Venezuela	614	Coproparasitoscópico	11.4	Ramírez-Barrios <i>et al.</i> , 2004
2006	Finlandia	541	Coproparasitoscópico	3.1	Pullola <i>et al.</i> , 2006
2006	China	178	Necropsia	36.5	Wang <i>et al.</i> , 2006
2007	Córdoba, España	1800	Coproparasitoscópico	17.72	Martínez-Moreno <i>et al.</i> , 2007
2007	Etiopía	100	Coproparasitoscópico	21	Yacob <i>et al.</i> , 2007
2009	Nigeria	269	Coproparasitoscópico	33.8	Sowemimo, 2009
2010	Islas Galápagos	97	Coproparasitoscópico	16.5	Gingrich <i>et al.</i> , 2010
2010	Polonia	763	Coproparasitoscópico	20.6	Tylkowska <i>et al.</i> , 2010
2010	Sudáfrica	240	Coproparasitoscópico	7.9	Mukaratirwa y Singh, 2010
2011	Tirana, Albania	111	Necropsia	75.7	Xhiaxhiu <i>et al.</i> , 2011
2011	Zambia	452	Coproparasitoscópico	11.3	Bwalya <i>et al.</i> , 2011
2011	Palestina	132	Coproparasitoscópico	36.4	Othman, 2011
2012	Kerman, Iran	70	Coproparasitoscópico	4.3	Mirzaei y Foolandi, 2012
2012	Alemania	445	Coproparasitoscópico	4	Becker <i>et al.</i> , 2012

**Cuadro 3. Prevalencia de parásitos adultos de *T. canis* en distintas partes de México.**

Año	Lugar	No. Casos	Metodo diagnóstico	Prevalencia (%)	Autor
1955	México D.F.	100	Necropsia	30	Flores, 1955
1967	México D.F.	120	Coproparasitoscópico	93	Quiroz, 1982
1970	Veracruz, Ver.	300	Coproparasitoscópico	9.6	Franyutti, 1970
1971	Córdova, Ver.	200	Coproparasitoscópico	13.5	Sosa, 1971
1972	Monterrey, N.L.	100	Necropsia	5	Garza, 1972
1973	Guadalajara, Jal.	450	Coproparasitoscópico	16.2	Mora, 1973
1973	Cd Victoria, Tmps	50	Coproparasitoscópico	30	Hinojosa, 1973
1973	México D.F.	979	Coproparasitoscópico	28	Mejía, 1973
1974	Cuernavaca, Mor.	719	Coproparasitoscópico	15	Vargas, 1974
1983	Aguascalientes	294	Coproparasitoscópico	47.6	Valdivia <i>et al.</i> , 1983
1986	México D.F.	200	Coproparasitoscópico	21	Cruz y col, 1986
1987	México D.F.	176	Necropsia	58.6	Cruz y col, 1987
1989	Veracruz, Ver.	447	Coproparasitoscópico	74	Zarmeño y col., 1989
1992	México D.F.	240	Coproparasitoscópico	3.6	Penagos y col., 1992
1996	Culiacan, Sin.	100	Coproparasitoscópico	7	Gaxiola y col., 1996
1998	México D.F.	100	Necropsia	15	Martínez y col., 1998
1998	México D.F.	470	Coproparasitoscópico	19.8	Eguia-Aguilar, 1998
2005	México D.F.	120	Necropsia	13.3	Eguia-Aguilar, 2005
2011	Querétaro	378	Necropsia	15.1	Canto <i>et al.</i> , 2011
2011	Yucatán, Méx.	130	Coproparasitoscópico	6.2	Rodriguez-Vivas <i>et al.</i> , 2011

La alta incidencia de personas con anticuerpos anti-*Toxocara*, en diferentes partes del mundo varía entre 2.6% a 81.5% lo que indica el alto grado de infestación por esta parasitosis. Sin embargo, la mayoría de las personas no muestran manifestaciones clínicas y estas sólo aparecen cuando son ingeridas grandes cantidades de huevos, o cuando las larvas se encuentran en lugares críticos, como son el cerebro (TN) o los ojos (TO) (Smith, 2006).

### **ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN Y SECRECIÓN DE *T. canis* (AgESTc)**

Muchas de las moléculas que forman el cuerpo de *T. canis* son similares a las de su hospedero por lo que no son reconocidas como extraños. Sin embargo, hay otras moléculas que son reconocidas como extrañas y que son capaces de provocar una respuesta inmune. Este parásito tiene dos tipos de antígenos: los antígenos somáticos y los AgESTc.

Los antígenos somáticos son aquellas moléculas que forman parte del cuerpo del parásito. Estos antígenos carecen de importancia diagnóstica ya que han demostrado tener reacciones cruzadas con los antígenos de otros helmintos (Smith *et al.*, 1982; Peixoto *et al.*, 2011). Por otra parte, los AgESTc son moléculas producidas y eliminadas por el parásito, los más estudiados son los producidos por las L2. La naturaleza química revela que son complejos de glicoproteínas y entre las más frecuentemente unidas se encuentran la N-acetilgalactosamina y la galactosa mientras que otras tales como el arabinol, la manosa, la N - acetilglucosamina, la glucosa y la fucosa no son tan frecuentes (Meghji *et al.*, 1986). Estos hidratos de carbono están presentes en diferentes proporciones o en la totalidad de los AgESTc y se encuentran formando epítopes que

están vinculados con el complejo de la proteína del antígeno, ya sea de una manera fuerte o débil. Algunos de estos antígenos permanecen adheridos a la cutícula de la larva para después ser liberados lo cual es visto como un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica (Maizels *et al.*, 1984). Además, se ha establecido que la respuesta inmune se dirige principalmente hacia los complejos glicosilados de estos antígenos (Maizels *et al.*, 1987).

### **RESPUESTA INMUNOLÓGICA A *T. canis***

El tipo de respuesta inmune montada va a diferir dependiendo el tipo de hospedero (definitivo o paraténicos), de la edad del hospedero y de su estado fisiológico (como pueden ser el embarazo y la lactancia entre otros).

Durante la migración de las larvas dentro del hospedero se induce una respuesta de tipo adaptativo con aumento de linfocitos T CD4+ y T CD8+. Por otra parte los AgESTc estimulan a los macrófagos a producir IL-6 la cual va a promover una respuesta de tipo Th2 con aumento de citocinas como la IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Finkelman *et al.*, 2004; Valli *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2011). El aumento de IL-4 a su vez, estimula la proliferación y la maduración de los linfocitos B, la variación de isotipo de IgM a IgE y la producción de anticuerpos IgG específicos (Sher, 1995), además de contribuir a la estimulación de las células cebadas que, cuando degranulan, aumentan la respuesta inflamatoria (Figura 8).

Los AgESTc también inducen un aumento en las concentraciones de IL-5 que ha demostrado ser una poderosa inductora de eosinofilia, la cual es característica de esta infección (Yamaguchi *et al.*, 1998). Además de estimular una respuesta Th2, en modelos murinos, se ha observado un aumento en los niveles plasmáticos de IFN- $\gamma$  que es característico de una respuesta inmune tipo Th1 (Pecinali *et al.*, 2005). El IFN- $\gamma$  actúa sobre linfocitos T, linfocitos B, células NK y macrófagos siendo el mediador clave de la inmunidad mediada por células. Se ha descrito una asociación entre el IFN- $\gamma$  y la IL-13 en la formación de granulomas eosinofílicos en otras patologías tales como son enfermedades producidas por patógenos (esquistosomiasis) o enfermedades autoinmunes (asma, colitis ulcerativa). Estos granulomas también se presentan por la presencia crónica de larvas de *T. canis* en los distintos órganos y tejidos por los cuales realizan su migración (Meeusen y Balic, 2000; Nagy *et al.*, 2012).

En modelos de infección con *T. canis* al mismo tiempo que los procesos pro-inflamatorios se activan, las células T reguladoras (Treg) también se activan y comienzan a producir IL-10 (Torina *et al.*, 2005). Esta citocina se caracteriza por ser inmunosupresora y anti-inflamatoria que inhibe la respuesta granulomatosa a las larvas del parásito. Regula la inflamación y la fibrosis actuando directamente sobre los fibroblastos reduciendo la producción de colágeno (Arai *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2001). Este efecto regulador es aparentemente responsable del control de la respuesta inmune exagerada en el hospedero cuando las larvas de *T. canis* migran a través del organismo. Del mismo modo, se ha demostrado que el elevado número de eosinófilos pueden causar la activación de células Treg induciendo con ello la producción de IL-10 (Nagy *et al.*, 2012).

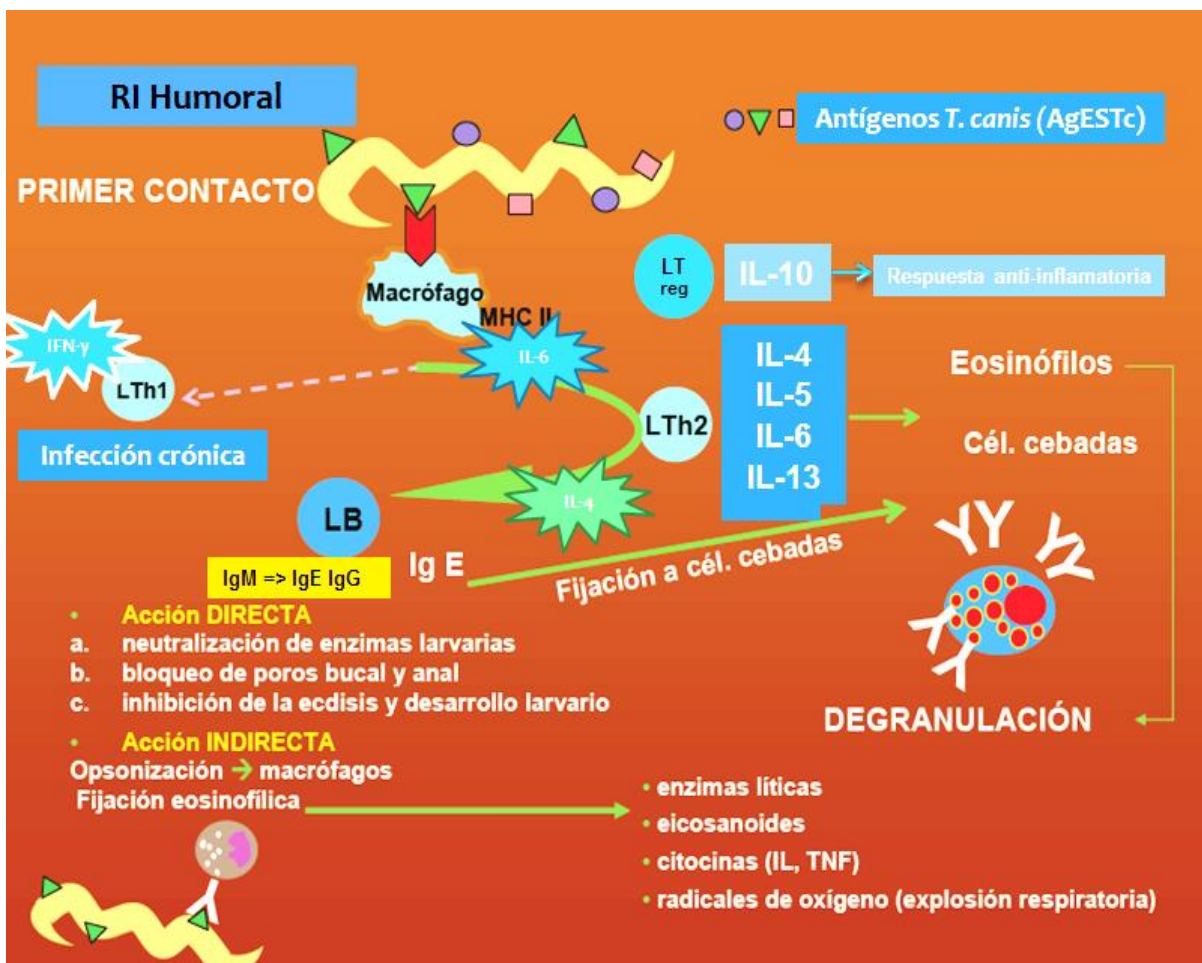


Figura 8. Respuesta inmune a L2 de *Toxocara canis*. Los antígenos del parásito estimulan la producción de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13) por parte de los linfocitos T cooperadores (LTh2).

A nivel intestinal en los hospederos definitivos, es posible que exista un efecto similar al que ocurre en otras enfermedades causadas por helmintos. La presencia y el daño producido por el parásito en el epitelio intestinal inducen la producción de alarminas (IL-25, IL-33) por parte de estas células. Estas alarminas a su vez estimulan a los linfocitos T a producir IL-4, IL-9 e IL-13 que polarizan la respuesta inmune hacia Th2. La IL-13 ejerce su efecto sobre las células caliciformes y estas comienzan a producir una gran cantidad de moco que contribuye a la eliminación del parásito (Allen *et al.*, 2011). Por otra parte, las células Treg aumentan a nivel de la pared intestinal de los perros cuando se producen infecciones intestinales por nematodos (Junginger *et al.*, 2012) lo que sugiere que la tolerancia de la mucosa intestinal está involucrada en la persistencia de la infección.

### **Respuesta inmune humoral**

En la toxocariosis canina, los títulos de anticuerpos específicos IgG e IgM se mantienen al cabo de varios meses después del contacto con el parásito. Estos títulos de anticuerpos no se correlacionan con la cantidad de parásitos adultos en el intestino pero si están relacionados con la cantidad de antígenos circulantes (Matsumura, 1983). En hospederos paraténicos, la producción de anticuerpos en un principio es similar a la observada en los hospederos definitivos pero, los anticuerpos isotipo IgM disminuyen durante los primeros 10 días post-infección, mientras que los anticuerpos IgG aumentan progresivamente hasta los 30 días post-infección y estos niveles permanecen constantes durante varios meses más. Estudios clínicos muestran que los pacientes con LMV o LMO tienen cantidades mayores de anticuerpos de la subclase IgG1 (específicos contra *T. canis*). También se ha observado que la cantidad total de anticuerpos IgE se encuentran incrementados (Kayes, 2006).

### **Eosinofilia**

La eosinofilia generalizada es uno de los signos más representativos de la infección con *T. canis*. Las características de esta eosinofilia varían dependiendo el tipo de hospedero: en los ratones y los jerbos se producen picos durante los primeros 40 días post-infección (Sugane y Oshima, 1982; Alba *et al.*, 2009) mientras que en los seres humanos hay una eosinofilia persistente hasta por un año (Beaver, 1952; Limaye *et al.*, 1990). En el caso de los hospederos definitivos, la eosinofilia aparece a los 7 días post-infección y desaparece a los 42 (Zimmermann *et al.*, 1985). En las crías con infección transplacentaria se observa un pico de eosinófilos 7 días después del nacimiento y disminuye lentamente hasta que llega a niveles fisiológicos 42 días después del nacimiento (Vossmann y Stoye, 1986).

La eosinofilia puede ser inducida por pequeñas cantidades de larvas y es dependiente de la IL-5. En modelos experimentales de la infección se ha demostrado que la administración de anticuerpos anti-IL-5 suprime el aumento de eosinófilos en sangre (Coffman *et al.*, 1989; Limaye *et al.*, 1990). También se ha demostrado que los linfocitos Th2 son los principales productores de IL-5 ya que cuando se aplican anticuerpos anti-CD4 en modelos murinos uno de los picos de eosinófilos se reduce. En general, el papel de los eosinófilos en la defensa contra infecciones causadas por helmintos ha generado controversia. Por una parte, experimentos *in vitro* indican que los eosinófilos pueden tener un efecto tóxico en ciertos parásitos y la eosinofilia se ha asociado a la eliminación de otros nematodos como en el caso de *Haemonchus contortus* (Alba y Muñoz, 2013). Sin embargo, en las infecciones por *T. canis* los eosinófilos aumentan a lo largo de la infección y rodean a las larvas en los tejidos pero, aparentemente, no producen daños graves a las mismas. En otro experimento *in vitro* se reportó que la incubación de larvas de *T. canis* con eosinófilos y suero hiperinmune causa la fijación y degranulación de los eosinófilos en la cutícula de las larvas pero, esto no afecta la motilidad o viabilidad de las mismas (Fattah *et al.*, 1986).

### **Consecuencias de la activación hiperinmune durante la infección: *T. canis* y asma**

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica del tracto respiratorio inferior que se caracteriza por un aumento en los niveles de IgE inducido por la inflamación eosinofílica, la hipersecreción de moco y la hiperreactividad bronquial después de someterse a la exposición a alérgenos. Esta enfermedad es el resultado de una respuesta de tipo Th2 a alérgenos aéreos (Weiss, 2000). Durante la enfermedad hay un aumento de IL-4, IL-5 e IL-13 que van a mediar la síntesis de IgE, la degranulación de eosinófilos y la hiperreactividad de las vías respiratorias (Holt *et al.*, 1999).

Existen estudios que relacionan la seroprevalencia a *Toxocara* con manifestaciones alérgicas como el asma. Sin embargo, también hay estudios en los cuales no se encontró dicha relación. Estas diferencias pueden deberse a la forma en la cual se llevaron a cabo los estudios (Buijs *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 2001; Sharghi *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2010). Entre estas diferencias encontramos aspectos como el tipo de prueba serológica utilizada, la diferencia de criterios para determinar la seropositividad, la edad y el sexo de la población en estudio. En general, se acepta que la infección con larvas de *Toxocara* está relacionada con la aparición de asma (Cooper, 2008), aunque, algunos investigadores han sugerido que las infecciones parasitarias por helmintos reducen el riesgo de padecer alergias debido a sus propiedades inmunosupresoras (Maizels, 2005). Sin embargo, la adaptación de los parásitos a sus hospederos debe ser tomada en cuenta en el caso específico de *T. canis*, ya que se adapta mejor a los hospederos definitivos que a los paraténicos, los cuales responden con mayor fuerza contra el parásito, por lo tanto, producen un efecto patogénico más grave (Maizels, 2013).

En modelos experimentales, las larvas de *T. canis* que se encuentran en los pulmones inducen una respuesta inmune de tipo Th2 en conjunto con un aumento en el número de eosinófilos, macrófagos, linfocitos e IgE. Aunque la mayoría de las larvas van a migrar de los pulmones a otros órganos, algunas permanecen atrapadas dentro de granulomas bien definidos con lo cual la inflamación pulmonar puede permanecer hasta por tres meses (Buijs *et al.*, 1994). Del mismo modo, algunas larvas pueden continuar su migración y regresar a los pulmones de tal manera que puede haber lesiones crónicas y agudas al mismo tiempo (Figura 9). El tipo de infiltrado celular en el tejido pulmonar de ratones infectados experimentalmente con *T. canis* es similar al observado en modelos experimentales de ratones con asma alérgica producida por la sensibilización con ovoalbúmina (Hessel *et al.*, 1995; Pinelli *et al.*, 2001).

Como se ha mencionado, la infección por *T. canis* desencadena una respuesta de tipo Th2, que se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5, IL-13 e infiltración de eosinófilos, macrófagos y células cebadas. La presencia de larvas vivas o muertas y la circulación de antígenos de parásitos tienen una actividad mitogénica en los linfocitos, por lo tanto, este tipo de respuesta inmune permanece durante largos períodos, además la IgE específica contra el parásito se incrementa. En individuos alérgicos, cuando el alérgeno penetra por las vías respiratorias, la IgE reacciona y se une a receptores de alta y baja afinidad de células cebadas, eosinófilos y macrófagos, que a su vez, secretan mediadores implicados en la respuesta asmática temprana (factor de activación de las

plaquetas y los leucotrienos C4) y en la respuesta tardía (prostaglandina y leucotrienos C4). Basado en este modelo (Figura 10), la respuesta inmune inducida después de la infección con *T. canis*, puede desencadenar manifestaciones alérgicas en personas que son alérgicas o que tienen predisposición genética a las alergias (Cooper, 2008; Pinelli y Aranzamendi, 2012).

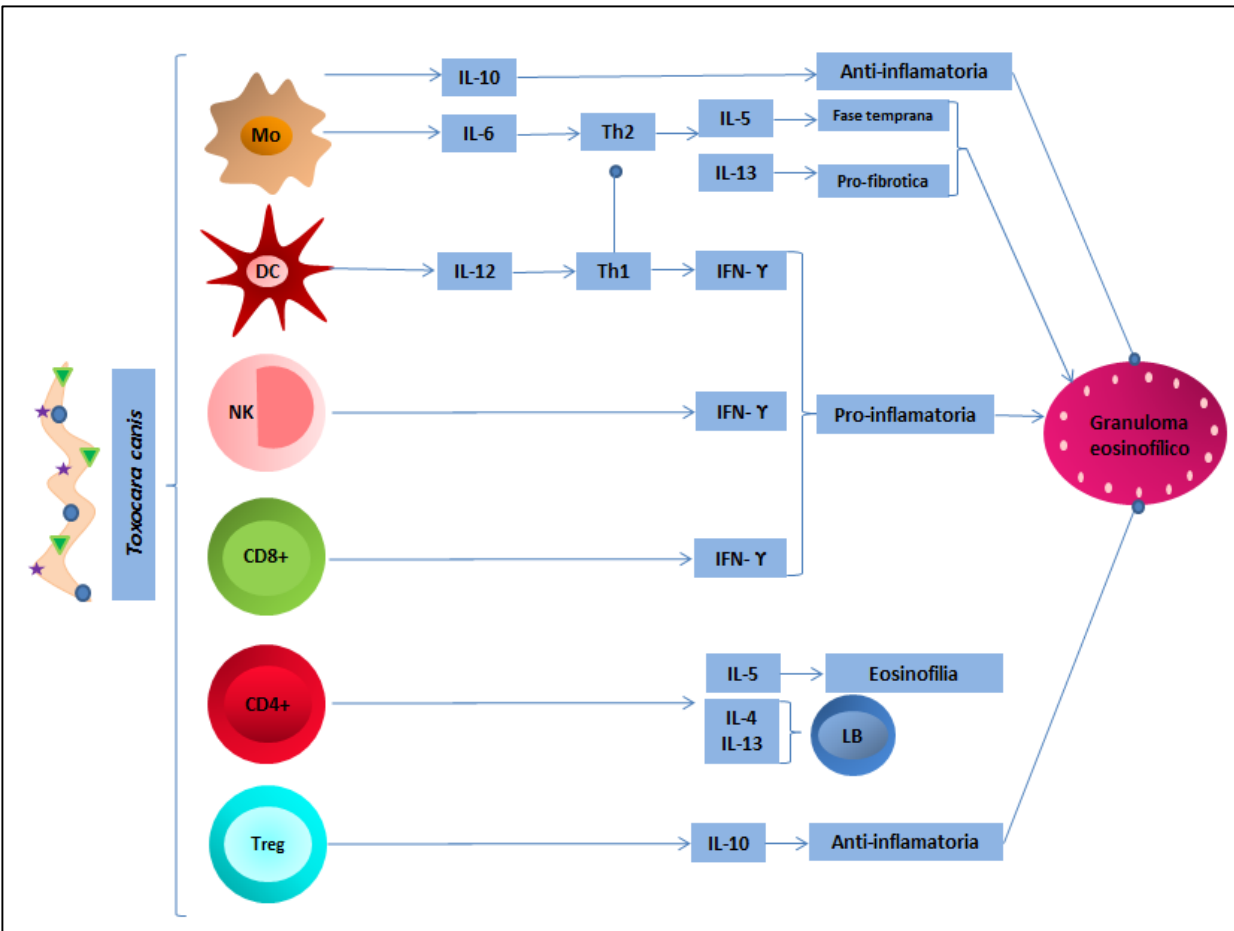


Figura 9. Esquema que muestra la respuesta por parte del hospedero a las larvas de *T. canis*, estas incluyen actividades anti-inflamatorias, proinflamatorias y profibróticas que van encaminadas a la localización y eliminación del parásito.

### **La red neuroinmunoendócrina en las enfermedades parasitarias**

La interacción entre los sistema inmune, endócrino y nervioso, forma una compleja red de comunicación directa y bidireccional que actúa de manera conjunta durante los procesos infecciosos para la eliminación adecuada de los patógenos y el mantenimiento de la homeostasis (Besedovsky y Del Rey, 1996). Anteriormente se consideraba que el



sistema inmunológico se regulaba de forma autónoma, dejando de lado la trascendental comunicación multidireccional que este sistema tiene con el sistema neuroendócrino. Esta relación se puso de manifiesto en estudios realizados donde se observó que el tamaño del timo era mayor en conejos castrados y que la restitución con andrógenos exógenos revertía la hipertrofia tímica (Chiodi, 1940). También se ha observado que la tasa de producción de anticuerpos es mayor en hembras que en machos, esto debido a la capacidad que tienen los estrógenos de estimular a los linfocitos B. Esto se ve reflejado en la predisposición que tienen las mujeres al padecimiento de enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, etc), donde, en algunas de estas enfermedades, 9 de 10 casos se presentan en mujeres (De León y Morales, 2006).

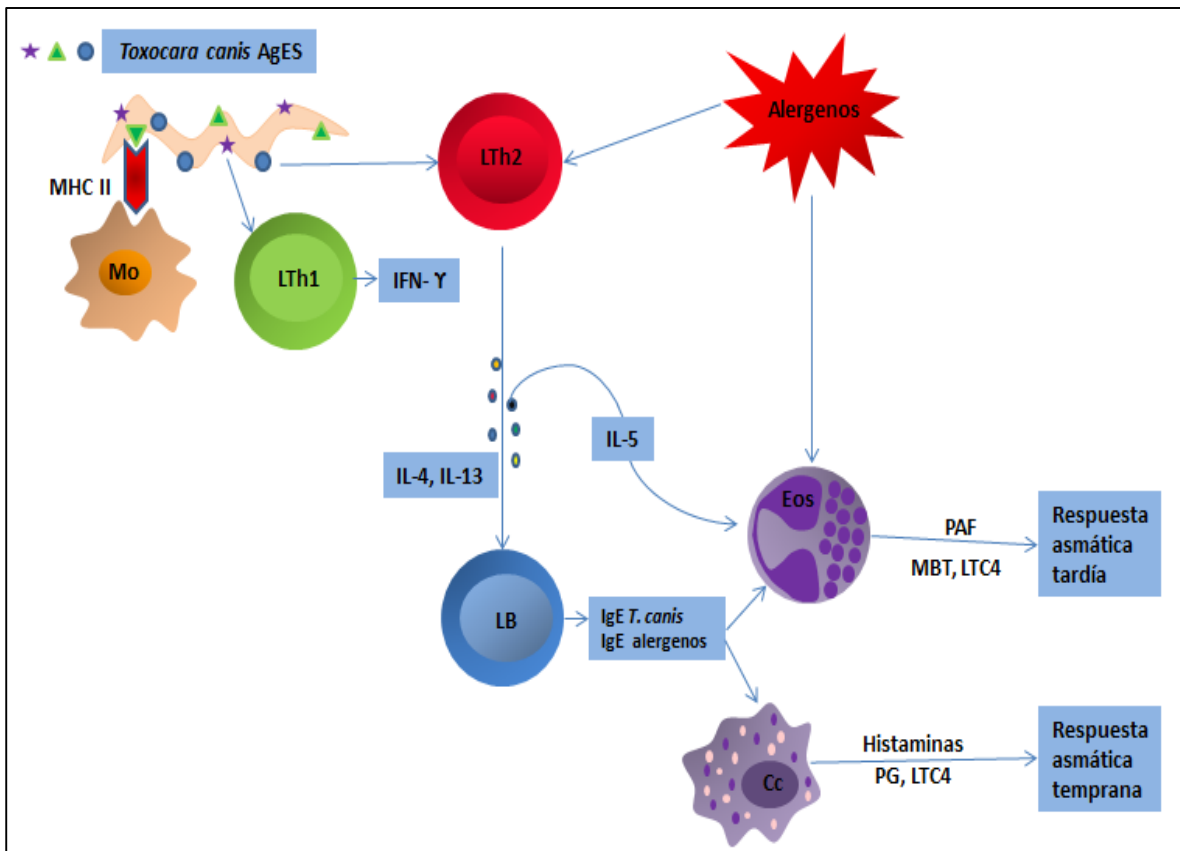


Figura 10. Mecanismo propuesto donde se resalta la asociación entre la infección por *T. canis* y el asma alérgica. Después de la exposición al alérgeno la IgE se unen a los receptores de alta y baja afinidad en las células cebadas (Cc) y eosinófilos (Eos), estos secretan varios mediadores implicados en la inducción de la respuesta asmática temprana (factor de activación de plaquetas (PAF), leucotrienos C4 (LTC4)) y en la respuesta asmática tardía (histamina, prostaglandinas (PG) y LTC4).

Aunado a esto se sabe que citocinas como la IL-6, la IL-1 $\beta$  y el factor inhibidor de la migración de macrófagos tienen efectos sobre neuronas hipocámpales e hipofisiarias (Tonelly y Postolache, 2005). Estas estructuras producen a su vez neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la somatostatina y la sustancia P, todas ellas con importantes repercusiones en la regulación de la inflamación sistémica y a nivel de mucosas (Agro y Stanisiz, 1995). Por otra parte, los glucocorticoides pueden reprimir la respuesta inflamatoria por medio de una disminución en los niveles de IFN- $\gamma$  y de IL-12 (Elenkov, 2004).

Estos ejemplos nos demuestran que el sistema inmunológico se regula y es regulado por el macrosistema neuroinmunoendócrino, a través del pleitropismo de los distintos mensajeros químicos que lo conforman, así como de la gama de receptores y moléculas efectoras compartidas entre los tres sistemas. Sin embargo el grado de complejidad no termina ahí: Un parásito, conformado por sus propias células, tejidos, órganos, etc, representa un nivel más en el escalonamiento de complejidad de la red neuroinmunoendócrina.

### ***Hormonas esteroideas y enfermedades parasitarias***

Las hormonas esteroideas además de participar y coordinar diversas funciones como el crecimiento, la reproducción, etc, también son capaces de regular la respuesta inmunológica contra algún patógeno (Akmaev, 1996). Por otra parte, los parásitos han desarrollado diversos mecanismos de sobrevivencia en el hospedero para facilitar la infección. Estos mecanismos se dividen en 3 tipos: la evasión de la respuesta inmunológica a través de distintas estrategias como la exclusión anatómica, el enmascaramiento y variación antigénica y el mimetismo molecular (Morales, 1995); la polarización de la respuesta inmune del hospedero hacia una respuesta permisiva de la infección; y la explotación de algún componente del hospedero por parte del parásito (Damian, 1997).

Evidencias recientes sugieren un nuevo mecanismo de explotación del hospedero por parte del parásito, en donde éste último aprovecha directa o indirectamente hormonas y factores de crecimiento del hospedero que le permiten un rápido establecimiento y una mayor efectividad en su tasa reproductiva, ambos, procesos claves en el mantenimiento del ciclo vital del parásito (Freilich *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2001). De manera específica, las hormonas producidas por el hospedero pueden regular funciones vitales del parásito. Este fenómeno, aunado a la respuesta inmunológica, podría decidir el rumbo de una infección parasitaria.

Estudios realizados con *Leishmania sp.* en modelos murinos, señalan que los machos desarrollan una fuerte respuesta inmune tipo Th1, mientras que en las hembras hay una respuesta más equilibrada o con una leve inclinación hacia un perfil Th2 (Roberts *et al.*, 2001). También se ha reportado que durante la gestación se incrementa la susceptibilidad de los ratones a *Leishmania major*, esto se asocia a un aumento en los niveles de estrógenos y progesterona, con una fuerte polarización hacia una respuesta inmune Th2 (Krishnan *et al.*, 1996).

Experimentos *in vitro* con el parásito *Schistosoma mansoni* demuestran que el tratamiento con dehidroepiandrosterona (DHEA), en cercarias, esquistosomulas y gusanos adultos inhibe hasta en un 100% la viabilidad y ovoposición, mientras que el tratamiento con cortisol afecta solo la ovoposición en el gusano adulto (Morales *et al.*, 2001). Por otro lado, amastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados *in vitro* con factor de crecimiento epidermal (EGF) murino, incrementan considerablemente su síntesis de ADN, crecimiento y actividad metabólica (Ghansan *et al.*, 2002).

En el caso de *Taenia crassiceps* se ha demostrado que el 17 $\beta$ -estradiol está implicado en el crecimiento y reproducción del parásito, con lo cual, existe una mayor carga parasitaria en las hembras. La infección de ratones macho con este parásito disminuye las concentraciones de testosterona, aumentando las concentraciones de estradiol y con ello inhibiendo conductas sexuales como la monta, la intromisión y la respuesta eyaculatoria (Morales *et al.*, 1996).

### **PRL y enfermedades parasitarias**

A raíz del descubrimiento de que la PRL polariza una respuesta inmune tipo Th1 se han realizado distintos experimentos en los cuales se ha visto el papel de esta hormona en el desarrollo de distintas enfermedades. Varios de estos estudios van enfocados a enfermedades parasitarias de importancia médica y veterinaria.

El efecto de la PRL durante las infecciones por protozoarios ha sido ampliamente estudiado en comparación de otros parásitos. Experimentos realizados en un modelo murino de toxoplasmosis sugieren que, tanto el TNF- $\alpha$  como la PRL pueden estimular a las células microgliales para montar una respuesta anti-toxoplasma induciendo la destrucción intracelular de los parásitos y la liberación de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-3 e IL-6 (Benedetto *et al.*, 2001).

Recientemente, se estudió la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en mujeres con niveles normales de PRL, con hiperprolactinemia e hipoprolactinemia. Las mujeres con hiperprolactinemia mostraron una seroprevalencia mas baja que aquellas con niveles de PRL normales (Dzitko *et al.*, 2008), esto sugiere que altos niveles de PRL pueden ser uno de los factores importantes para la prevención de la infección con *T. gondii* en mujeres.

En el caso de la Leishmaniasis, la posible participación de la PRL no se ha determinado totalmente. En un trabajo realizado por Gómez *et al.* (2003) se establece que hembras lactantes de hamster sirio que fueron infectadas con *Leishmania infantum* no desarrollaron la enfermedad, en comparación con las hembras infectadas no lactantes. Esto nos sugiere una función protectora de la PRL durante la infección por *Leishmania*, sin embargo, aún se necesita investigar mas con el fin de determinar las funciones específicas de la PRL para inducir la protección (Gómez *et al.*, 2003).

La malaria (enfermedad ocasionada por el protozoario *Plasmodium falciparum*) es un grave problema de salud entre las mujeres gestantes en zonas endémicas, en

comparación con las mujeres no gestantes. En un estudio realizado por Bayoumi *et al.* (2009) encontraron niveles de PRL bajos en mujeres embarazadas infectadas en comparación con mujeres embarazadas no infectadas. También encontró una correlación negativa entre la PRL y la IL-4 e IL-10, pero no encontró una correlación significativa entre la PRL y el cortisol, sugiriendo que los bajos niveles hormonales de PRL pueden incrementar la susceptibilidad a la infección (Bayoumi *et al.*, 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, en el caso de *T. canis* se sugiere que la PRL es la hormona responsable del fenómeno de reactivación larvaria. En el estudio realizado por Overgaauw (1998), relaciona el aumento de la PRL durante la gestación de las perras, con un aumento en los títulos de anticuerpos específicos anti-*T. canis*. En otro estudio realizado en ratones donde se administró PRL, se sugiere que esta hormona es la causal de la migración larvaria hacia la glándula mamaria (Jin *et al.*, 2008). Estos son dos de los hallazgos más importantes encontrados en la literatura pero cabe mencionar que estos estudios han sido realizados en hembras, donde el ambiente hormonal no solo está formado por PRL sino también por otras hormonas como la progesterona y el estradiol.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agro A., Stanisiz A.M. 1995. Neuroimmunomodulation: classical and non-classical cellular activation. *Adv. Neuroimmunol.* 5(3): 311-319.
- Akmaev I.G. 1996. Current concepts of the interactions of regulating systems: nervous, endocrine and immune. *Usp. Fiziol. Nauk.* 27(1): 3-20.
- Alba-Hurtado, F. 2011. Ascariosis. En Ibarra V.F., Figueroa C. J.A., Quiroz R.H.: *Parasitología Veterinaria Vol. II. Helmintos.* México, D.F.: 81-87.
- Alba-Hurtado F., Flores-Alatorre L, Cuéllar OJ, Martínez LJP. (editors). 1994. Desarrollo de un nuevo modelo de toxocariasis ocular. *Memorias del XXV Congreso Nacional de Microbiología.* Ciudad Obregón, Son. México.
- Alba-Hurtado F., Muñoz-Guzmán M.A. 2013. Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *Biomed. Res. Int.* 11 pp.
- Alba-Hurtado F., Muñoz-Guzmán M.A., Valdivia-Anda G., Tórtora J.L., Ortega-Pierres M.G. 2009. *Toxocara canis*: larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol.* 122(1): 1-5.
- Allen J.E., Maizels R.M. 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* 11(6): 375-388.
- Anteson R.K., Corkish J.D. 1975. An investigation of helminth parasites in well-cared for dogs in Accra. *Ghana Med. J.* 14(3): 193-195.

- Arai T., Abe K., Matsuoka H., Yoshida M., Mori M., Goya S., Kida H., Nishino K., Osaki T., Tachibana I., Kaneda Y., Hayashi S. 2000. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278(5): 914-922.
- Bardón I.M. 1992. Contribución a la biología e inmunología de *Toxocara canis*. Memoria. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Departamento de Parasitología. Madrid, España.
- Barutzki D., Schaper R. 2003. Endoparasites in Dogs and Cats in Germany 1999 – 2002. *Parasitol. Res.* 90: 148-150.
- Bass J.L., Mehta K.A., Glickman L.T., Eppes B.M. 1983. Clinically inapparent *Toxocara* infection in children. *N. Engl. J. Med.*, 308: 723-724.
- Bayoumi N.K., Elhassan E.M., Elbashir M.I., Adam I. 2009. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103(2): 111-117.
- Bazan J.F. 1989. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164(2): 788-795.
- Beaver P.C., Snyder H., Carrera M., Dent H., Lafferty W. 1952. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. *Pediatrics.* 9: 7-19.
- Becker A.C., Rohen M., Epe C., Schnieder T. 2012. Prevalence of endoparasites in stray and fostered dogs and cats in Northern Germany. *Parasitol. Res.* 111(2): 849-857.
- Benedetto N., Folgore A., Romano Carratelli C., Galdiero F. 2001. Effects of cytokines and prolactin on the replication of *Toxoplasma gondii* in murine microglia. *Eur. Cytokine Netw.* 12(2): 348-358.
- Ben-Jonathan N., Hnasko R. 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr. Rev.*, 22(6): 724-763.
- Besedovsky H.O., Del Rey A. 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Revs.* 17: 64-102.
- Boutin J.M., Jolicoeur C., Okamura H., Gagnon J., Edery M., Shirota M., Banville D., Dusanter-Fourt I., Djiane J., Kelly P.A. 1988. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell.* 53(1): 69-77.
- Buijs J., Borsboom G., Renting M., Hilgersom W.J., van Wieringen J.C., Jansen G., Neijens J. 1997. Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. *Eur. Respir. J.* 10: 1467-1475.

- Buijs J., Egbers M.W., Lokhorst W.H., Savelkoul H.F., Nijkamp F.P. 1995. *Toxocara*-induced eosinophilic inflammation. Airway function and effect of anti-IL-5. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 873-878.
- Buijs J., Lokhorst W.H., Robinson J., Nijkamp F.P. 1994. *Toxocara canis*-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. *Parasite Immunol.* 16(1): 1-9.
- Bradford M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brunaska M., Dubinsky P., Reiterova K. 1995. *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *Int. J. Parasitol.* 25: 683-690.
- Bwalya E.C., Nalubamba K.S., Hankanga C., Namangala B. 2011. Prevalence of canine gastrointestinal helminths in urban Lusaka and rural Katete Districts of Zambia. *Prev. Vet. Med.* 100(3-4): 252-255.
- Campos R.R., Quintanar S.A., Jarillo L.R., Oliver A.G., Ventura J.J., Rivera A.V., Berczi I., Kovacs K. 2006. Hypophysectomy and neurointermediate pituitary lobectomy reduce serum immunoglobulin M (IgM) and IgG and intestinal IgA responses to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in rats. *Infect immun.* 74(3): 1883-1889.
- Cantó G.J., García M.P., García A., Guerrero M.J., Mosqueda J. 2011. The prevalence and abundance of helminth parasites in stray dogs from the city of Queretaro in central Mexico. *J. Helminthol.* 85(3): 263-269.
- Chan P.W., Anuar A.K., Fong M.Y., Debruyne J.A., Ibrahim J. 2001. *Toxocara* seroprevalence and childhood asthma among Malaysian children. *Pediatr. Int.* 43(4): 350-353.
- Chieffi P.P., Müller E.E. 1976. Prevalence of parasitic diseases by *Toxocara canis* in dogs, and the finding of eggs of *Toxocara* species in the soil of public places in the urban area of Londrina, State of Parana, Brazil. *Rev. Salude Publica.* 10(4): 367-372.
- Chiodi H. 1940. The relationship between the thymus and the sexual organs. *Endocrinology.* 26: 107-116.
- Clevenger C.V., Russell D.H., Appasamy P.M., Prystowsky M.B. 1990. Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 87(16): 6460-6464.
- Cooper P.J. 2008. *Toxocara canis* infection: an important and neglected environmental risk factor for asthma? *Clin. Exp. Allergy.* 38(4): 551-553.
- Corbacho A.M., Macotela Y., Nava G., Torner L., Dueñas Z., Noris G., Morales M.A., Martínez De La Escalera G., Clapp C. 2000. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J. Endocrinol.* 166(1): 53-62.

- Cordero del C.M., Rojo F., Martínez A., Sánchez C., Hernández S., Navarrete I., Diez P., Quiroz R.H., Carballo M. 1999. Parasitología Veterinaria. Mc Graw Hill Interamericana. España.
- Cosman D., Lyman S.D., Idzerda R.L., Beckmann M.P., Park L.S., Goodwin R.G., March C.J. 1990. A new cytokine receptor superfamily. Trends. Biochem. Sci. 15(7): 265-270.
- Damian R.T. 1997. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. Parasitology. 115 suppl: S169-S175.
- Despommier D. 2003. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin. Microbiol. Rev. 16(2): 265-272.
- Dodge J.S. 1980. *Toxocara canis*: The risks of infection. N.Z. Med. J. 91(651): 24-26.
- De Leon-Nava M.A., Morales-Montor J. 2006. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? Rev. Invest. Clin. 58: 161-169.
- Dogusan Z., Hooghe R., Verdood P., Hooghe-Peters E.L. 2001. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. J. Neuroimmunol. 120(1-2): 58-66.
- Dzitko K., Malicki S., Komorowski J. 2008. Effect of hyperprolactinemia on *Toxoplasma gondii* prevalence in humans. Parasitol. Res. 102(4): 723-729.
- Eguía-Aguilar P., Cruz-Reyes A., Martínez-Maya J.J. 2005. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. Vet. Parasitol. 127(2): 139-146.
- Elenkov I.J. 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1024: 138-146.
- Epe C., Ising-Volmer S., Stoye M. 1993. Parasitological fecal studies of equids, dogs, cats and hedgehogs during the years 1984-1991. Dtsch Tiererztl Wochenschr. 100(11): 426-428.
- Fashuyi S.A. 1981. Diagnosis of gastro-intestinal helminths of dogs in Lagos area using the Kato-Katz technique. Bull. Anim. Health Prod. Afr. 29(4): 333-335.
- Fattah D.I., Maizels R.M., McLaren D.J., Spry C.J. 1986. *Toxocara canis*: interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. Exp. Parasitol. 61(3): 421-431.
- Finkelman F.D., Shea-Donohue T., Morris S.C., Gildea L., Strait R., Madden K.B., Schopf L., Urban J.F. Jr. 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. Immunol. Rev. 201: 139-155.
- Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol. Rev. 80(4): 1523-1631.

- Freilich D., Ferris S., Wallace M., Leach L., Kallen A., Frincke J., Ahlem C., Hacker M., Nelson D., Hebert J. 2000. 16-alpha-bromoepiandrosterone, a dehydroepiandrosterone (DHEA) analogue, inhibits *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* growth. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63(5-6): 280-283.
- Gellersen B., DiMattia G.E., Friesen H.G., Bohnet H.G. 1989. Regulation of prolactin secretion in the human B-lymphoblastoid cell line IM-9-P3 by dexamethasone but not other regulators of pituitary prolactin secretion. *Endocrinology.* 125(6): 2853-2861.
- Ghadirian E., Viens P., Strykowski H., Dubreuil F. 1976. Epidemiology of Toxocariasis in the Montreal area. Prevalence of *Toxocara* and other helminth ova in dogs and soil. *Can. J. Public Health.* 67(6): 495-498.
- Ghansah T.J., Ager E.C., Freeman-Junior P., Villalta F., Lima M.F. 2002. Epidermal growth factor binds to a receptor on *Trypanosoma cruzi* amastigotes inducing signal transduction events and cell proliferation. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49(5): 383-390.
- Gingrich E.N., Scorza A.V., Clifford E.L., Olea-Popelka F.J., Lappin MR. 2010. Intestinal parasites of dogs on the Galapagos Islands. *Vet. Parasitol.* 169(3-4): 404-407.
- Glickman L.T., Schantz P.M. 1981. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol. Rev.* 3: 230-250.
- Glickman L.T., Magnaval F., Domansky L., Shofer F., Lauria S., Gottstein b., Brochier B. 1987. Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome? *Am.J. Epidemiol.* 125: 1019-1034.
- Goffette S., Jeanjean A.P., Duprez T.P.J., Bigaignon G., Síndic C.J.M. 2000. Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. *Europ. J. Neurol.* 7: 703-706.
- Gomez-Ochoa P., Gascon F.M., Lucientes J., Larraga V., Castillo J.A. 2003. Lactating females Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) show protection against experimental *Leishmania infantum* infection. *Vet. Parasitol.* 116(1): 61-64.
- Gudelsky G.A., Porter J.C. 1980. Release of dopamine from tuberoinfundibular neurons into pituitary stalk blood after prolactin or haloperidol administration. *Endocrinology* 106(2): 526-529.
- Habluetzel A., Traldi G., Ruggieri S., Attili A.R., Scuppa P., Marchetti R., Menghini G., Esposito F. 2003. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet. Parasitol.* 13(3-4): 243-252.
- Hamidou M.A., Fradet G., Kadi A.M., Robin A., Moreau A., Magnaval J.F. 2002. Systemic vasculitis with lymphocytic temporal arteritis and *Toxocara canis* infection. *Arch. Intern. Med.* 162(13): 1521-1524.



- Hamilton C.M., Stafford P., Pinelli E., Holland C.V. 2006. A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. *Parasitology* 132(6): 791-801.
- Haralabidis S.t., Papazachariadou M.G., Koutinas A.F., Rallis T.S. 1988. A survey on the prevalence of gastrointestinal parasites of dogs in the area of Thessaloniki, Greece. *J. Helminthol.* 62(1): 45-49.
- Hartmann D.P., Holaday J.W., Bernton E.W. 1989. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB J.* 3(10): 2194-2202.
- Hassan I.C. 1984. A five-year analysis of diseases of dogs and cats in the Veterinary Clinic of Freetown, Sierra Leone. *Beitr. Trop. Landwirtsch Veterinarmed* 22(3): 305-308.
- Hessel E.M., Van Oosterhout A.J., Hofstra C.L., De Bie J.J., Garssen J., Van Loveren H., Verheyen A.K., Savelkoul H.F., Nijkamp F.P. 1995. Bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness after ovalbumin inhalation in sensitized mice. *Eur. J. Pharmacol.* 293(4): 401-412.
- Hinz E. 1980. Intestinal helminths in Bangkok stray dogs and their role in public health. *Zentralbl Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. B.* 171(1): 79-85.
- Hinz E., Blatz I. 1985. Intestinal helminths of domestic dogs in the Hessian Neckar Valley, Federal Republic of Germany. *Int. J. Zoonoses.* 12(3): 211-213.
- Holland C., O'Connor O., Taylor M.R., Hughes G, Girwood R.H., Smith H. 1991. Families, park, gardens and toxocariasis. *Scand J. Infect dist.* 23: 225-231.
- Holt P.G., Macaubas C., Stumbles P.A., Sly P.D. 1999. The role of allergy in the development of asthma. *Nature.* 402: B12-B17.
- Huapaya P., Espinoza Y., Roldán W., Jiménez S. 2009. Toxocariosis humana: ¿problema de salud pública? *An. Fac. Med. (Lima).* 70(4): 283-290.
- Humbert P., Niezborala M., Salembier R. 2000. Skin manifestations associated with toxocariasis: a case-control study. *Dermatology* 210: 230-234.
- Jin Z., Akaon N., Ohta N. 2008. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitology Int.* 57: 495-498.
- Johnston J., Gasser R.B. 1993. Copro-parasitological survey of dogs in southern Victoria. *Australian Veterinary Practitioner* 23:127-131.
- Jordan H.E., Mullins S.T., Stebbins M.E. 1993. Endoparasitism in dogs: 21, 583 cases (1981-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203(4): 547-549.
- Junginger J., Schwittlick U., Lemensieck F., Nolte I., Hewicker-Trautwein M. 2012. Immunohistochemical investigation of Foxp3 expression in the intestine in healthy and diseased dogs. *Vet. Res.* 43: 23.

- Kayes S.G. 2006. Inflammatory and immunological responses to *Toxocara canis*. In: C.V. H, H.V. S, editors. *Toxocara: the enigmatic parasite*. Trowbridge, UK: Cromwell Press 158-173.
- Khalil H.M. 1977. Toxocariasis in Egypt. *J. Egypt Public Health Assoc.* 52(5): 330-343.
- Kincekova J., Reiterova K., Dubinsky P. 1999. Larval toxocariasis and its clinical manifestation in childhood in the Slovak Republic. *J. Helminthol.* 73(4): 323-328.
- Kolbeková P., Kolárová L., Vetvicka D., Strycek M. 2011. Imaging of *Toxocara canis* larvae labelled by CFSE in BALB/c mice. *Parasitol. Res.* 108: 1007-1014.
- Kooijman R., Gerlo S., Coppens A., Hooghe-Peters E.L. 2000. Growth hormone and prolactin expression in the immune system. *Ann. NY. Acad. Sci.* 917: 534-540.
- Kramer F., Vollrath T., Schnieder T., Epe C. 2002. Improved detection of endoparasite DNA in soil sample PCR by the use of anti-inhibitory substances. *Vet. Parasitol.* 108: 217-226.
- Krishnan L., Guilbert L.J., Russell A.S., Wegmann T.G., Mosmann T.R., Belosevic M. 1996. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.* 156(2): 644-652.
- Kurtz A., Bristol L.A., Tóth B.E., Lazar-Wesley E., Takács L., Kacsóh B. 1993. Mammary epithelial cells of lactating rats express prolactin messenger ribonucleic acid. *Biol. Reprod.* 48(5): 1095-1103.
- Lamberts S.W., Macleod R.M. 1990. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol. Rev.* 70(2): 279-318.
- Lightner L., Christenses B.M., Beran G.W. 1978. Epidemiologic findings on canine and feline intestinal nematode infections from records of the Iowa state University Veterinary Clinic. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172(5): 564-567.
- Limaye A.P., Abrams J.S., Silver J.E., Ottesen E.A., Nutman T.B. 1990. Regulation of parasite-induced eosinophilia: selectively increased interleukin 5 production in helminth-infected patients. *J. Exp. Med.* 172(1): 399-402.
- Lombardero M., Quintanar S.A., Vidal S., Horvath E., Kovacs K., Lloid R.V., Scheithauer B.W. 2006. Vascularization of rat pituitary autografts. *J. Anat.* 208: 587-593.
- MacAdam I., Gudan D., Timbs D.V., Urguhart H.R., Sewell M.M. 1984. Metazoan parasites of dogs in Sabah, Malaysia. *Trop. Anim. Health Prod.* 16(1): 34-38.
- Magnaval J.F., Malard L., MOrassin B., Fabre R. 2002. Immunodiagnosis of ocular Toxocariasis usin western-blot for the detection of specific anti-*Toxocara* IgE. *J. Helminthol.* 76: 335-339.

- Maizels R.M. 2005. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 17(6): 656-661.
- Maizels R.M. 2013. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet. Parasitol.* 193(4): 365-374.
- Maizels R.M., Kennedy M.W., Meghji M., Robertson B.D., Smith H.V. 1987. Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J. Immunol.* 139(1): 207-214.
- Maizels R.M., Savigny D., Oglive B.M. 1984. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasitol. Immunol.* 6(1): 23-37.
- Marron J.A., Schroeder R.J. 1978. Survey of *Toxocara canis* infection rate in impounded dogs in Los Angeles County. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172(6): 713.
- Martínez-Barbosa I., Fernández Presas A.M., Vázquez Tsuji O., Ruiz Hernández A. 1998. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, Distrito Federal. *Vet. Méx.* 29(3): 239-244.
- Martínez-Moreno F.J., Hernández S., López-Cobos E., Becerra C., Acosta I., Martínez-Moreno A. 2007. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Vet. Parasitol.* 143(1): 7-13.
- Matera L. 1997. Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation* 4(4): 171-180.
- Matsumura K., Endo R. 1982. Investigation of antibodies against *Toxocara canis* in naturally infected puppies. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A.* 253(1): 139-143.
- Matsumura K., Kazuta Y., Endo R., Tanaka K. 1983. The IgM antibody activities in relation to the parasitologic status of *Toxocara canis* in dogs. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. A.* 255(2-3): 402-405.
- Meeusen E.N., Balic A. 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today.* 16(3): 95-101.
- Meghji M., Maizels R.M. 1986. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18(2): 155-170.
- Mendez I., Cariño C., Díaz L. 2005. La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Rev. Invest. Clin.* 57(3): 447-456.
- Mirzaei M., Fooladi M. 2012. Prevalence of intestinal helminthes in owned dogs in Kerman city, Iran. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5(9): 735-737.
- Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 683-765.

- Morales J., Larralde C., Arteaga M., Govezensky T., Romano M.C., Morali G. 1996. Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Parasitol.* 82(5): 689-693.
- Morales-Montor J. 1995. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune utilizados por los parásitos. *Bol. Educ. Bioq.* 14: 5-11.
- Morales-Montor J., Mohamed F., Ghaleb A.M., Baig S., Hallal-Calleros C., Damian R.T. 2001. *In vitro* effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 87(5): 1132-1139.
- Moreira-Silva S.F., Rodrigues M.G., Pimenta J.L., Gomes C.P., Freire L.H., Pereira F.E.L. 2004. Toxocariasis of the central nervous system: with report of two cases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37(2): 169-174.
- Mukaratirwa S., Singh VP. 2010. Prevalence of gastrointestinal parasites of stray dogs impounded by the Society for the Prevention of Cruelty to Animals (SPCA), Durban and Coast, South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 81(2): 123-125.
- Muñoz-Guzmán M.A., Del Río-Navarro B.E., Valdivia-Anda G., Alba-Hurtado F. 2010. The increase in seroprevalence to *Toxocara canis* in asthmatic children is related to cross-reaction with *Ascaris suum* antigens. *Allergol. Immunopathol.* 38(3): 115-121.
- Nagy D., Bede O., Danka J., Szénási Z., Sipka S. 2012. Analysis of serum cytokine levels in children with chronic cough associated with *Toxocara canis* infection. *Parasite Immunol.* 34(12): 581-588.
- Nagy E., Berczy I. 1978. Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta. Endocrinol.* 89(3): 530-537.
- Nagy E., Berczi I., Wren G.E., Asa S.L., Kovacs K. 1983. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* 6(3): 231-243.
- Nevalainen M.T., Valve E.M., Ingleton P.M., Nurmi M., Martikainen P.M., Harkonen P.L. 1997. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J. Clin. Invest.* 99(4): 618-627.
- Nichols R.L. 1956. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae. *J. Parasitol.* 42(4): 349-362.
- Norhaida A., Suharni M., Liza Sharmini A.T., Tuda J., Rahmah N. 2008. rTES-30USM: Cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of Toxocariasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 102(10): 151-160.
- Noya O., Alarcón de Noya B. 1998. The multiple antigen blot assay (MABA): A simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunol. Lett.* 63: 53-56.

- Oge H., Oge S. 2000. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. *Vet. Parasitol.* 92: 75-79.
- Oliveira-Sequeira T.C.G., Amarante A.F.T., Ferrari T.B., Nunes L.C. 2002. Prevalence of intestinal parasites in dogs from Sao Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 103: 19-27.
- O'Lorcain P. 1994. Epidemiology of *Toxocara spp.* in stray dogs and cats in Dublin, Ireland. *J. Helminthol.* 68(4): 331-336.
- Othman R.A. 2011. Prevalence of *Toxocara canis* in dogs, North West Bank of Palestine. *Korean J. Parasitol.* 49(2): 181-182.
- Overgaauw P.A. 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocariasis in dogs and cats. *Crit. Rev. Microbiol.* 23(3): 233-251.
- Overgaauw P.A. 1997. Prevalence of intestinal nematodes of dogs and cats in The Netherlands. *Vet. Q.* (b) 19(1): 14-17.
- Overgaauw P.A., Okkens A.C., Bevers M.M., Kortbeek L.M. 1998. Incidence of patent *Toxocara canis* infections on bitches during the oestrus cycle. *Vet. Quart.* 20(3): 104-107.
- Pearson J.C., Bowman D.D., Grieve R.B. 1986. Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35(5): 974-981.
- Pecinali N.R., Gomes R.N., Amendoeira F.C., Bastos A.C., Martins M.J., Pegado C.S., Bastos O.M., Bozza P.T., Castro-Faria-Neto H.C. 2005. Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet. Parasitol.* 134(1-2): 121-130.
- Peixoto P.L., Nascimento E., Cançado G.G., Miranda R.R., Rocha R.L., Araújo R.N., Fujiwara R.T. 2011. Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 106(2): 200-206.
- Pinelli E., Aranzamendi C. 2012. *Toxocara* infection and its association with allergic manifestations. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug. Targets.* 12(1): 33-44.
- Pinelli E., Dormans J., Fonville M., van der Giessen J. 2001. A comparative study of toxocariasis and allergic asthma in murine models. *J. Helminthol.* 75(2): 137-140.
- Posner B.I., Kelly P.A., Shiu R.P., Friesen H.G. 1974. Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology* 95(2): 521-531.
- Prigent-Tessier A., Tessier C., Hirosawa-Takamori M., Boyer C., Ferguson-Gottschall S., Gibori G. 1999. Rat decidual prolactin: Identification, molecular cloning, and characterization. *J. Biol. Chem.* 274(53): 37982-37989.

- Pullola T., Vierimaa J., Saari S., Virtala A.M., Nikander S., Sukura A. 2006. Canine intestinal helminths in Finland: prevalence, risk factors and endoparasite control practices. *Vet. Parasitol.* 140: 321-326.
- Quintanar S.A., Quintanar S.J.L. 1994. Hipofisectomía transfaríngea en la rata (Descripción de la técnica). *Vet. Méx.* 25(1): 13-17.
- Quiroz R. 2003. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Ed. Limusa. México, D.F.
- Ramírez-Barrios R.A., Barboza-Mena G., Muñoz J., Angulo-Cubillán F., Hernández E., González F., Escalona F. 2004. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. *Vet. Parasitol.* 121(1-2): 11-20.
- Rayes A.A., Lambertucci J.R. 2001. Human toxocariasis as a possible cause of eosinophilic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 40: 109-110.
- Roberts C.W., Walker W., Alexander J. 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3): 476-488.
- Rodríguez-Vivas R.I., Gutierrez-Ruiz E., Bolio-González M.E., Ruiz-Piña H., Ortega-Pacheco A., Reyes-Novelo E., Manrique-Saide P., Aranda-Cirerol F., Lugo-Perez J.A. 2011. An Epidemiological study of intestinal parasites of dogs from Yucatan, Mexico, and their risk to public health. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(8): 1141-1144.
- Roddie G., Stafford P., Holland C., Wolfe A. 2008. Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. *Vet. Parasitol.* 152(1-2): 85-93.
- Saeki H., Masu H., Yokoi H., Yamamoto M. 1997. Long-term survey on intestinal nematode and cestode infections in stray puppies Ibaraki Prefecture. *J. Vet. Med. Sci.* 59(8): 725-726.
- Saleh F.C., Kirkpatrick C.E., De Haseth O., Lok J.B. 1988. Occurrence of some blood and intestinal parasites in dogs in Curaçao, Netherlands Antilles. *Trop. Geogr. Med.* 40(4): 318-321.
- Seah S.K., Hucal G., Law C. 1975. Dogs and intestinal parasites: A public health problem. *Can. Med. Assoc. J.* 112(10): 1191-1194.
- Shah G.N., Laird H.E., Russell D.H. 1991. Identification and characterization of a prolactin-like polypeptide synthesized by mitogen-stimulated murine lymphocytes. *Int. Immunol.* 3(4): 297-304.
- Sharghi N., Schantz P.M., Caramico L., Ballas K., Teague B.A., Hotez P.J. 2001. Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinic-based case-control study. *Clin. Infect. Dis.* 32(7): E111-E116.

- Shaw-Bruha C.M., Pirruccello S.J., Shull J.D. 1997. Expression of the prolactin gene in normal and neoplastic human breast tissues and human mammary cell lines: promoter usage and alternative mRNA splicing. *Breast Cancer res. Treat.* 44(3): 243-253.
- Sher A. 1995. Regulation of cell-Mediated immunity by parasites: The ups and downs of an important host adaptation. *Mol. App. Parasitol.* 12: 431-442.
- Smith H.R.N. 2006. Diagnostic lilitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocarosis. C.V.H, H.V. S, editors. *Toxocara: the enigmatic parasite.* Towbridge, UK: Cromwell Press. 89-112.
- Smith H.V., Quinn R., Bruce R.G., Girdwood RW. 1982. Development of the serological response in rabbits infected with *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76(1): 89-94.
- Smith P.E. 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anatom. Rec.* 47: 119-129.
- Soulsby E.J. 1983. Toxocarosis. *Br Vet J.* 139(6): 471-475.
- Sowemimo O.A. 2009. The prevalence and intensity of gastrointestinal parasites of dogs in Ile-Ife, Nigeria. *J. Helminthol.* 83(1): 27-31.
- Spangelo B.L., Macleod R.M. 1990. The role immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol. Metab.* 1(8): 408-412.
- Sugane K., Oshima T. 1982. Eosinophilia, granuloma formation and migratory behaviour of larvae in the congenitally athymic mouse infected with *Toxocara canis*. *Parasite Immunol.* 4(5): 307- 318.
- Tarish J.H., Al-Saqur I.M., Al-Abbassy S.N., Kadhim F.S. 1986. The prevalence of parasitic helminths in stray dogs in the Baghdad area, Iraq. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 80(3): 329-331.
- Tonelli L.H., Postolache T.T. 2005. Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and major histocompatibility complex molecules in the normal brain and after peripheral immune challenge. *Neurol. Res.* 27(7): 679-684.
- Torina A., Caracappa S., Barera A., Dieli F., Sireci G., Genchi C., Deplazes P., Salerno A. 2005. *Toxocara canis* infection induces antigen-specific IL-10 and IFN $\gamma$  production in pregnant dogs and their puppies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108(1-2): 247-251.
- Turner T., Pegg E. 1977. A survey of patent nematode infestations in dogs. *Vet. rec.* 100(14): 284-285.
- Tylkowska A., Pilarczyk B., Gregorczyk A., Templin E. 2010. Gastrointestinal helminths of dogs in Western Pomerania, Poland. *Wiad. Parazytol.* 56(3): 269-276.

- Ugochukwu E.I., Ejimadu N.K. 1985. Studies on the prevalence of gastro-intestinal helminths of dogs in Calabar, Nigeria. *Int. J. Zoonoses* 12(3): 214-218.
- Valkounová J. 1982. Parasitological investigation of children's sandboxes and dog faeces from public areas of housing development in Prague. *Folia Parasitol.* 29(2): 133-138.
- Valli J.L., Williamson A., Sharif S., Rice J., Shewen P.E. 2010. *In vitro* cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134(3-4): 218-229.
- Vanparijs O., Hermans L., van der Flaes L. 1991. Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. *Vet. Parasitol.* 38(1): 67-73.
- Venturini L., Radman N. 1988. Frecuencia de *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* y *Giardia sp* según el sexo y la edad en caminos de La plata (Bs. AS., Argentina). *Rev. Med. Vet.* 69: 161-165.
- Verster A. 1979. Gastro-intestinal helminths of domestic dogs in the Republic of South Africa. Onderstepoort J. *Vet. Res.* 46(2): 79-82.
- Viselli S.M., Stanek E.M., Mukherjee P., Hymer W.C., Mastro A.M. 1991. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology.* 129(2): 983-990.
- Vossmann T., Stoye M. 1986. Clinical, hematologic and serologic findings in puppies after prenatal infection with *Toxocara canis* Werner 1782 (Anisakidae). *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 33(8): 574-585.
- Wachira T.M., Sattran M., Zeyhle E., Njega M.K. 1993. Intestinal helminths of public health importance in dogs in Nairobi. *East Afr. Med. J.* 70(10): 617-619.
- Wang C.R., Qiu J.H., Zhao J.P., Xu L.M., Yu W.C., Zhu X.Q. 2006. Prevalence of helminthes in adult dogs in Heilongjiang Province, the People's Republic of China. *Parasitol. res.* 99(5): 627-630.
- Weiss S.T. 2000. Parasites and asthma/allergy: what is the relationship? *J. Allergy Clin. Immunol.* 105(2 Pt 1): 205-210.
- Wilder H.R. 1950. Nematode endophthalmitis. *Trans. An. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* 55: 99-109.
- Xhaxhiu D., Kusi I, Rapti D., Kondi E., Postoli R., Rinaldi L., Dimitrova Z.M., Visser M., Knaus M., Rehbein S. 2011. Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitol. Res.* 108(2): 341-353.
- Xinou E., Lefkopoulos A., Gelagoti M., Drevelegas A., Diakou A., Milonas I., Dimitriadis A.S. 2003. CT and MR imaging findings in cerebral toxocaral disease. *Amer. J. Neuroradiol.* 24: 714-718.



- Yacob H.T., Ayele T., Fikru R., Basu A.K. 2007. Gastrointestinal nematodes in dogs from Debre Zeit, Ethiopia. *Vet. Parasitol.* 148(2): 144-148.
- Yamaguchi Y., Suda T., Suda J., Eguchi M., Miura Y., Harada N., Tominaga A., Takatsu K. 1998. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J. Exp. Med.* 167(1): 43-56.
- Zimmermann U., Löwenstein M.D., Stoye M. 1985. Migration and distribution of *Toxocara canis* Werner 1782 (Anisakidae) larvae in the definitive host (beagle) following primary infection and reinfection. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 32(1): 1-28.
- Zinger M., McFarland M., Ben-Jonathan N. 2003. Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(2): 689-696.

# **El bisfenol A y su relación con el sistema inmunológico y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas**

Del Río-Araiza V.H,<sup>1</sup> Nava-Castro K.E,<sup>2</sup>  
Chávez-Rueda K,<sup>3</sup> Muñoz-Cruz S,<sup>4</sup> Morales-Montor J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Laboratorio de Genotoxicología y Mutagénesis Ambiental, Departamento de Ciencias Ambientales, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>3</sup> Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

<sup>4</sup> Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

## Resumen

El bisfenol A es un compuesto disruptor endocrino con actividad estrogénica que tiene afinidad en los receptores nucleares de estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) y en los membranales. Es utilizado como monómero en la elaboración de plásticos de policarbonatos, resinas epóxicas (usadas en la fabricación de envases de alimentos y recubrimientos de latas, respectivamente) y selladores dentales, todos ellos materiales de uso cotidiano. El compuesto puede liberarse de estos materiales debido a una polimerización incompleta o hidrólisis de los enlaces éster de los polímeros que lo contienen, lo cual puede ocurrir al someterlos a altas temperaturas, condiciones ácidas o por mecanismos enzimáticos. La principal fuente de exposición en animales y humanos, son alimentos y bebidas que han estado en contacto con materiales fabricados con BPA (envases de almacenamiento de comida, botellas de agua, entre otros) que se desprenden y son ingeridos vía oral. Por otra parte, es importante destacar que los efectos del BPA sobre el funcionamiento del sistema inmunológico han sido poco estudiados. En los trabajos existentes se han reportado efectos muy diversos sobre componentes del sistema inmune, lo cual es atribuido a la enorme variedad de modelos animales usados, las diferentes dosis de BPA, los esquemas de tratamientos experimentales y retos antigénicos usados. La mayoría de estudios del efecto del BPA sobre la función inmune son *in vitro*, y los estudios *in vivo* no toman en cuenta que la función inmune se debe estudiar bajo un reto antigénico, por lo que se sabe muy poco acerca de los efectos que el BPA pueda ejercer sobre la función del sistema inmune. En la presente revisión se pretende abordar el efecto que ejerce el BPA sobre las células del sistema inmunológico, así como sus efectos durante distintos procesos infecciosos.

# Introducción

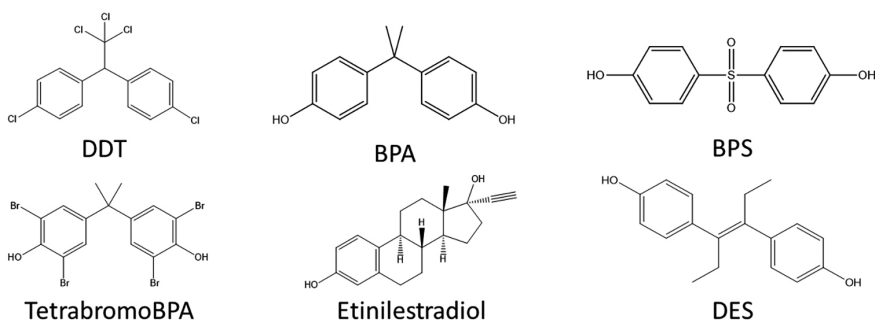
## *Compuestos disruptores endocrinos (CDE)*

Los compuestos disruptores endocrinos son sustancias que existen en el ambiente como consecuencia de la actividad agrícola e industrial (dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), bisfenol A (BPA), bisfenol S (BPS), etc.), aunque también se pueden encontrar en productos de uso farmacéutico (etinilestradiol, dietil-estil-bestrol (DES)) o de manera natural en distintas plantas como la soya (fitoestrógenos; genisteína, daidzeína, coumestrol) (Fig.1) (Guzmán-Arriaga and Zambrano, 2007). Los CDE pueden presentar actividad estrogénica, antiestrogénica o antiandrogénica. Además, estos compuestos son altamente lipofílicos y se pueden almacenar por periodos prolongados de tiempo en el tejido adiposo. Durante el embarazo, el feto puede ser expuesto a ellos compuestos por vía transplacentaria y al momento del nacimiento por la vía lactogénica (Guzmán-Arriaga and Zambrano, 2007).

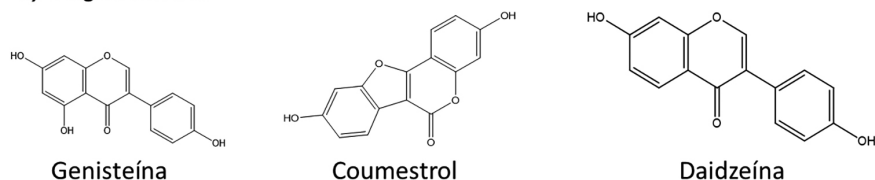
En distintos estudios se ha observado que los CDE pueden generar en diferentes especies alteraciones irreversibles en el eje reproductivo y en el sistema nervioso central de la descendencia, como consecuencia de la exposición transplacentaria y neonatal. La susceptibilidad a estos compuestos se presenta en cualquier edad, sin embargo, se ha observado que las etapas prenatal y neonatal son cruciales para el desarrollo de diferentes padecimientos durante la vida adulta (Sweeney, 2002).

## Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs)

### a) Origen sintético



### b) Origen natural

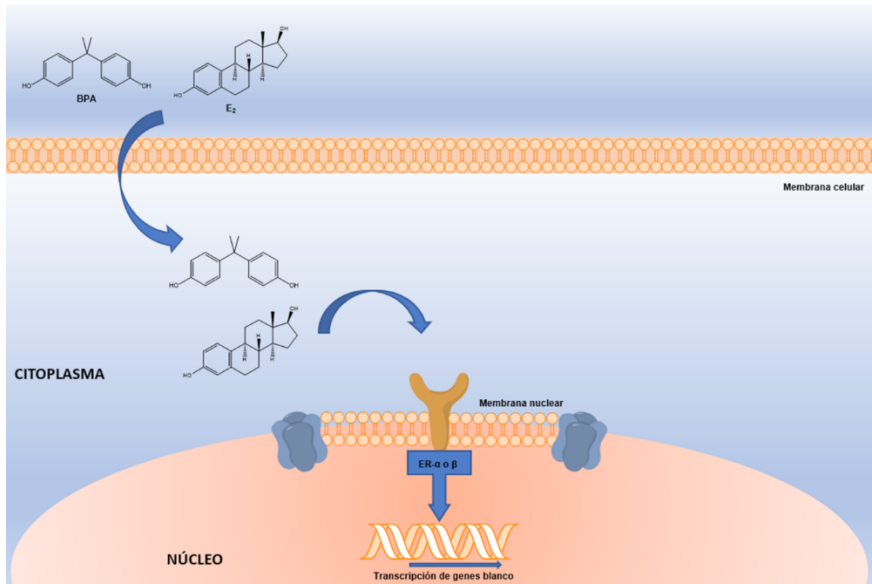


**Figura 1.** Estructura química de varios compuestos disruptores endócrinos (CDEs). a) Origen sintético: dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), bisfenol A (BPA), bisfenol S (BPS), tetrabromo bisfenol A (TetrabromoBPA), etinilestradiol, dietilestilbestrol (DES). b) Origen natural; genisteína, coumestrol, daidzeína.

## Bisfenol A (BPA)

El BPA es ampliamente utilizado como monómero en la elaboración de plásticos como policarbonatos, resinas epóxicas y selladores dentales (Amaral Mendes, 2002). Este compuesto puede liberarse de dichos materiales debido a una polimerización incompleta o por hidrólisis de los enlaces éster de los polímeros que lo contienen, lo cual puede ocurrir al someterlos a altas temperaturas, condiciones ácidas o por mecanismos enzimáticos. La principal fuente de exposición en animales y humanos son los alimentos y bebidas que han estado en contacto con materiales fabricados con BPA (envases de almacenamiento de comida, botellas de agua, entre otros), el cual se desprende de su matriz y es ingerido vía oral (Welschons et al., 2006). El BPA es catalogado como un CDE con carácter estrogénico debido a que se puede unir a los receptores nucleares de estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), pero con una afinidad mucho menor (<1,000) que su ligando natural, el 17 $\beta$ -estradiol (Fig. 2) (Kuiper et al., 1998). Además, también puede unirse al receptor arilhidro-

carburo (AhR) (Bonefeld-Jørgensen et al., 2007) y al receptor de hormona tiroidea (ThR) (Zoeller et al., 2005). La Food and Drug Administration (FDA) y la European Food Safety Agency (EFSA) calculan la ingesta diaria tolerable de BPA en  $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Environmental Protection Agency, 2011). Además, la FDA estima la exposición a BPA por envases de alimentos en  $0.185\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  en adultos y hasta  $2.42\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  en niños de 1 a 2 meses de edad (Environmental Protection Agency, 2011).



**Figura 2.** Representación esquemática de la interacción del  $E_2$  y el BPA con los receptores nucleares para estrógenos. El BPA interactúa con los receptores nucleares para esteroideos. BPA: bisfenol A,  $E_2$ : estradiol; ER- $\alpha$  o  $\beta$ : receptor de estrógenos alfa o beta.

### Efectos del BPA en el sistema inmunológico

Se han reportado distintos efectos del BPA sobre el sistema inmunológico, sin embargo éstos varían dependiendo si son realizados *in vivo* o *in vitro*, de la especie animal utilizada, de la dosis, de la vía de administración y de la etapa del desarrollo en el que se administra. Además, en los estudios *in vivo* muchas veces no se toma en cuenta que la función de la respuesta inmune debe ser estudiada bajo algún reto antigénico, por lo que existe poca información acerca de los efectos que el BPA puede estar ejerciendo sobre el sistema inmunológico durante un proceso infeccioso.

## Efectos sobre células de la inmunidad innata

### *Macrófagos*

Los macrófagos son una de las principales células fagocíticas, desempeñan un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis en el organismo, además, se ha demostrado que expresan las dos isoformas del receptor a estrógenos (ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ ) (Campesi et al., 2017; Wang et al., 2005), con lo cual el BPA podría ejercer sus efectos uniéndose a dichos receptores.

En cuanto a los trabajos en los cuales se reporta un efecto estimulador del BPA sobre los macrófagos, Hong y cols. (2004), usando la línea celular de macrófagos murinos RAW264, indican que el BPA a una concentración de 43nM potenció la producción de óxido nítrico (ON) inducida por lipopolisacárido (LPS), mientras que la producción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) no se vio alterada (Hong et al., 2004). En otro experimento realizado por Yamashita y cols. (2005), se reporta que el BPA a una concentración de 0.1 $\mu$ M estimula la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 e IL-12, además de aumentar la expresión de la molécula coestimuladora CD86 en macrófagos peritoneales murinos (Yamashita et al., 2005). En otro estudio donde se evaluó el efecto de un análogo del BPA (BPA-glicidil-metacrilato (BisGMA)), sobre la función de la línea celular de macrófagos RAW264.7, se reporta un aumento en la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), además de la expresión de moléculas de superficie como CD11, CD14, CD40, CD45, CD54 y CD80 (Y. H. Kuan et al., 2012). También se ha reportado un aumento en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, ON y la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) de una forma dosis dependiente, además de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intra y extracelular (Yu Hsiang Kuan et al., 2012). En otro reporte, utilizando la línea celular de macrófagos humanos THP1, Liu y cols (2014) reportan que el BPA a una concentración de 0.1 $\mu$ M incrementa la producción de citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6, y una disminución de las citocinas reguladoras IL-10 y TGF- $\beta$ . Se observa que el uso del antagonista del receptor de estrógenos (ER) ICI 182,780 invierte la producción de estas citocinas, lo cual es un indicativo de que el BPA puede actuar por medio de estos receptores (Liu et al., 2014). Teixeira y cols. (2015), utilizando macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana (PBMCs), estimulados o no con LPS o IL-4, reportan efectos distintos del BPA en la producción de citocinas en macrófagos clásicamente activados (M1) o alternativamente activados (M2). Ellos reportan que el BPA estimula la migración de M2, pero disminuye la producción de IL-6, IL-10 e IL-1 $\beta$  en estas células. En el caso de los M1 reportan un aumento en la producción de IL-10

y una disminución de IL-6 (Teixeira et al., 2016). Finalmente, Yang y cols. (2015), utilizando macrófagos de carpa (*Cyprinus carpio*), reportan que el BPA incrementó la producción de ON y de ROS de una forma dosis-dependiente (Yang et al., 2015).

Por otra parte, también se han reportado efectos inhibitorios de BPA sobre la función de los macrófagos. Segura y cols. (1999) evaluaron la capacidad de adherencia de macrófagos peritoneales de rata expuestos a BPA, indicando que el BPA a una concentración de 10nM inhibe la adherencia de los macrófagos pero no altera su viabilidad (Segura et al., 1999). En otro estudio, Kim y Jeong (2003) evaluaron el efecto del BPA sobre la producción de ON, TNF- $\alpha$  e iNOS en macrófagos peritoneales de ratón. Ellos reportan que el BPA a una concentración de 50 $\mu$ M no afecta la producción de ON o de TNF- $\alpha$ , por el contrario, el BPA inhibe su producción cuando se da un estímulo con LPS, también disminuye la expresión de iNOS con un efecto dosis-dependiente (Kim and Jeong, 2003). Byun y cols. (2005) indican que macrófagos peritoneales de ratones tratados con BPA (500mg/kg/día) por 5 días consecutivos por 4 semanas y cultivados por 2 o 4 días con LPS tienen una disminución en la secreción de TNF- $\alpha$  y en la producción de ON, además, la administración de BPA a una concentración de 10 y 100 $\mu$ M al cultivo de macrófagos tiene el mismo efecto en la secreción de TNF- $\alpha$  y en la producción de ON (Byun et al., 2005). En otro reporte, utilizando la línea celular RAW 264, Ohnishi y cols. reportan que el BPA a una concentración de 100 $\mu$ M inhibe la activación del promotor de IFN- $\beta$  cuando es inducido por LPS (Ohnishi et al., 2008). Utilizando la misma línea celular, Yoshitake y cols. (2008) reportan que el BPA suprime la producción de ON y la activación de NF  $\kappa$ B cuando es inducida por LPS de una forma dosis-dependiente. Además indican que estos efectos fueron bloqueados al usar el antagonista del ER ICI182780 (Yoshitake et al., 2008). Kim y cols. (2014) reportan que el tratamiento con BPA a una dosis de 200 $\mu$ M reduce la producción de ON e induce muerte celular por apoptosis en la línea celular RAW 264.7 (Kim et al., 2014).

### *Células dendríticas*

Las células dendríticas (DCs) son las células presentadoras de antígeno por excelencia y juegan un papel fundamental en la regulación y polarización de las respuestas inmunológicas, además, se ha reportado que estas células también expresan el ER- $\alpha$  y el ER- $\beta$  (Kovats, 2015).

Acerca de las acciones que puede tener el BPA sobre estas células, Guo y cols. (2010) reportan que DCs derivadas de PBMCs en presencia de TNF- $\alpha$  incrementan la expresión del ligando de la quimiocina 1 (CCL1), además de generar un aumento en la producción de IL-5, IL-10 e IL-13, así como en la expresión de GATA3 (Guo et



al., 2010). En otro experimento, Pisapia y cols. (2012) reportan un aumento en la diferenciación de las DCs, así como un aumento en la expresión de MHCII y CD86 en estas células (Pisapia et al., 2012). Por otra parte, Švajger y cols. (2016) indican que el BPA a una concentración de 50 $\mu$ M disminuye la capacidad endocítica de las DCs, así como la expresión de CD1a (Švajger et al., 2016) BPF and BPAF, on vitro differentiation and maturation of MDDCs. Monocytes were treated with 17 $\beta$ -estradiol (E2). En otro reporte, Camarca y cols. (2016) indican que el BPA a una concentración de 1nM genera un aumento en la densidad de DCs que expresan CD1a, pero a su vez hay una disminución en la expresión de los marcadores de activación HLA-DR y CD86 en DCs diferenciadas de PMBCs humanas (Camarca et al., 2016).

### ***Granulocitos***

Los granulocitos son las células de la inmunidad innata más abundantes en el organismo. Se dividen en neutrófilos, que constituyen entre 90 y el 95% de su totalidad, los eosinófilos de 3 a 5% y los basófilos menos del 1%. En la literatura existen muy pocos reportes acerca del efecto que puede tener el BPA sobre estas células. En un experimento realizado por He y cols. (2016) se reporta que el BPA a dosis de 1mg/kg aumenta el reclutamiento de eosinófilos inducidos por OVA en los alveolos y submucosa de las vías aéreas (He et al., 2016). También se ha reportado que la exposición perinatal a BPA genera un aumento en la inflamación eosinofílica en las vías aéreas (Midoro-Horiuti et al., 2010).

En el caso de los neutrófilos, Watanbe y cols. (2003) evaluaron el efecto del BPA sobre la diferenciación neutrofilica de las células HL-60 inducida por dimetilsulfóxido (DMSO) y G-CSF, reportando que el BPA a dosis bajas genera un aumento en la diferenciación neutrofilica, además de una elevación de aproximadamente 20% la producción de superóxido y la expresión de CD18 en células HL-60 diferenciadas (Watanabe et al., 2003). Adicionalmente, reportan que al agregar tamoxifen (inhibidor competitivo del ER) no se suprime el efecto del BPA, lo cual sugiere que este efecto potenciador en la diferenciación de los neutrófilos se da por una vía independiente del ER (Watanabe et al., 2003). En otro estudio donde se revisó el efecto del tetrabromobisfenol A (TBBPA), se indica que el TBBPA propicia la producción de especies reactivas de oxígeno en los neutrófilos de forma dosis dependiente (Reistad et al., 2005).

## Efectos sobre células de la inmunidad adaptativa

### *Linfocitos T*

Los linfocitos T (TL) son células de la inmunidad adaptativa que se pueden dividir en linfocitos T citotóxicos (TcL) o en linfocitos T cooperadores (ThL), y éstos a su vez en Th1, Th2, Th9, Th17, etc., con base en el patrón de citocinas que secretan. Estas células han demostrado poseer receptores para distintas hormonas, entre los cuales podemos mencionar a los esteroides sexuales (Klein and Flanagan, 2016). Los esteroides sexuales a su vez pueden estar modulando la diferenciación de los TL y, con esto, regulando la respuesta inmune (Ansar Ahmed et al., 1985; Labib Salem et al., 2000). Al tener receptores para dichas hormonas, el BPA puede estar ejerciendo su efecto a través de ellos, como se ha reportado en distintos estudios, en los cuales hay diferentes resultados que difieren en cuanto a la polarización de la respuesta de los TL (Th1, Th2, Th17).

Entre los reportes que indican una polarización de la respuesta inmune hacia Th1, Youn y cols. (2002) cultivaron esplenocitos activados con concanavalina A (Con-A) de ratones expuestos a BPA por 4 semanas en el agua de bebida, donde reportaron que la exposición a BPA aumenta la proliferación de esplenocitos, sin que exista diferencia en los porcentajes de las distintas subpoblaciones celulares (ThL, TcL), además hubo un aumento en la expresión de IFN- $\gamma$  y una reducción de IL-4 (Youn et al., 2002). Del mismo modo, Yoshino y cols. (2003) evalúan el efecto del BPA en un modelo de inmunización con lisozima de huevo de gallina (HEL), reportando que el tratamiento con BPA a dosis de 30 y 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aumentó significativamente la secreción de IFN- $\gamma$ , mientras que la producción de IL-4 aumentó a dosis de 300 y 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , con lo cual indican que existe una predominancia de la respuesta tipo Th1 (Yoshino et al., 2003); además, usando un esquema de exposición prenatal al BPA, donde las crías macho expuestas al BPA posteriormente fueron inmunizadas en la edad adulta con HLE, mostraron que el BPA generó un aumento tanto en los parámetros de respuesta Th1 (IFN- $\gamma$ ) como de Th2 (IL-4), pero el aumento en la respuesta Th1 fue mayor que en la Th2 (Yoshino et al., 2004). Alizadeh y cols. (2006), utilizando un modelo de alergia inducido por OVA, indican que hay un aumento en la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  en cultivo de esplenocitos provenientes de animales expuestos a BPA (Alizadeh et al., 2006). Menard y cols. (2014) evaluaron el efecto de la exposición a BPA sobre la respuesta inmune específica contra el antígeno OVA, donde reportan que la exposición a BPA genera un aumento

en el porcentaje de LTh y en la secreción de IFN- $\gamma$  (Menard et al., 2014). En un estudio donde se analizó el efecto de la exposición perinatal a BPA Holladay y cols. (2010) reportan que a nivel sérico, existe un aumento de G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y Rantes (Holladay et al., 2010). Igualmente indican que en esplenocitos estimulados con Con-A hay un aumento de G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, IL-17, IL-4, IL-6 y TNF- $\alpha$ , además que en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados con LPS hay aumento de GM-CSF, IFN- $\gamma$  e IL-17, con lo cual concuerdan que existe un aumento en las citocinas Th1 con sesgo hacia una respuesta de tipo Th17 (Holladay et al., 2010).

Respecto a lo anterior, Luo y cols. (2016) reportan que la exposición perinatal a BPA aumenta la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ t de manera dosis-dependiente, además de generar un aumento en la producción de IL-17, IL-21; IL-6 e IL-23, tanto en machos como en hembras, citocinas típicas de una respuesta Th17 (Luo et al., 2016) como anteriormente se había reportado (Holladay et al., 2010).

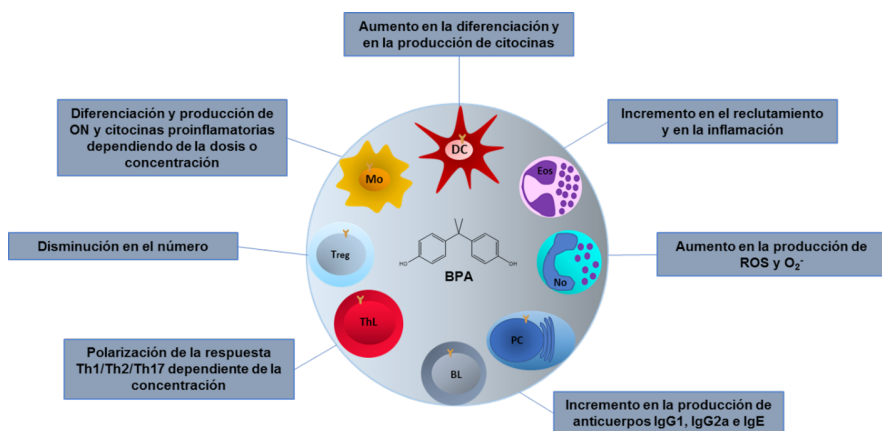
En cuanto a los estudios donde se reporta que el BPA genera polarización hacia una respuesta Th2, Lee y cols. (2010), en un experimento *in vitro*, utilizando BPA a una concentración de 50 $\mu$ M, reportan que los linfocitos aumentan la expresión de GATA-3, IL-4 e IL-10 y disminuye la de Tbet, lo que es un indicativo de que se genera una polarización hacia una respuesta Th2 (Lee and Lim, 2010). Similarmente, Lee y cols. (2003) indican que a la misma concentración de BPA aumenta la producción de IL-4 en linfocitos T activados (Lee et al., 2003). Tian y cols. (2003) reportan que el BPA a una concentración de 3 $\mu$ M genera un aumento en la producción de IL-4 por parte de células Th2 provenientes de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) obtenidos de ratones infectados con *Trichinella spiralis* y estimuladas con antígenos del parásito (Tian et al., 2003). Reportan que el BPA en una concentración de 3 y 10 $\mu$ M, generó un aumento en la producción de IL-4 en cultivos de esplenocitos provenientes de ratones infectados con *Leishmania major* y estimulados con antígenos del parásito (Tian et al., 2003). Adicionalmente, Miao y cols. (2008) utilizando un esquema de exposición gestacional, reportan que la exposición a BPA a dosis de 40 y 400  $\mu$ g/kg/día y donde posteriormente se evaluó la respuesta inmune en esplenocitos, genera que la expresión del ER $\alpha$  se encuentre disminuida en machos e incrementada en hembras mientras que la expresión de citocinas Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) se encuentra disminuida tanto en machos como en hembras (Miao et al., 2008). Sawai y cols. (2003), mediante experimentos

|242 •

*in vitro* en esplenocitos estimulados con Con-A, reportan que los machos expuestos a BPA producían en promedio 40% menos de IFN- $\gamma$  y las hembras 28% menos, en comparación con los controles (Sawai et al., 2003). En cuanto a las células T reguladoras (Tregs), Oshima y cols. (2007) reportan que la administración perinatal de BPA genera una disminución en el número de células Tregs (Ohshima et al., 2007).

### **Linfocitos B y células plasmáticas**

Yoshino y cols. (2003) reportan que el BPA incrementa la proliferación de esplenocitos, además de un aumento en la producción de anticuerpos de una forma dosis-dependiente; a 300 $\mu$ g/kg hay un aumento de IgG2 anti-HEL y a 3000 $\mu$ g/kg hay una producción mayor de IgG1 anti-HEL (Yoshino et al., 2003). Reportan que la exposición gestacional a BPA generó aumento en la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a, con predominio de anticuerpos IgG2a (Yoshino et al., 2004). Menard y cols. encuentran que existe un aumento en los anticuerpos anti-OVA IgG en ratas expuestas al BPA a dosis de 5 y 50 $\mu$ g/kg/día (Menard et al., 2014). Alizadeh y cols. (2006) indican que la exposición a BPA genera menores títulos de anticuerpos IgE y mayores niveles de IgG2a (Alizadeh et al., 2006). Lee y cols. (2003) similarmente indican que existe un aumento de IgE en ratones expuestos a BPA en la vida adulta (Lee et al., 2003). En otro estudio, utilizando ratonas NZB/NZW que fueron expuestas a BPA, se reporta que cuando existe una exposición a la sustancia se disminuye la producción de IgG2a (Sawai et al., 2003). Yurino y cols. (2004), utilizando ratones BWF1 (modelo de lupus eritematoso sistémico), reportan que la exposición a BPA genera un aumento en la producción de anticuerpos por parte de las células B1, así como la expresión de ER $\alpha$  tanto *in vitro* como *in vivo* (Yurino et al., 2004). Goto y cols. (2007), administrando BPA en ratones con TCR transgénico, reportan un aumento en la producción de IgG e IgA (Goto et al., 2007). Horiuti y cols. (2010), utilizando un modelo de asma, indican que la exposición perinatal a BPA aumenta los niveles de IgG anti-OVA (Midoro-Horiuti et al., 2010).



**Figura 3.** Efectos del BPA sobre las células del sistema inmunológico. Los efectos son muy variables dependiendo si son realizados *in vivo* o *in vitro*, de la especie animal utilizada, de la dosis, de la vía de administración y de la etapa del desarrollo en el que se administra. Mo: Macrófagos, DC: células dendríticas, Eos: eosinófilos, No: neutrófilos, PC: células plasmáticas, BL: linfocitos B, ThL: linfocitos T cooperadores, Treg: linfocitos T reguladores.

### Efectos del BPA en infecciones

Roy y cols. (2012) evaluaron el efecto de la exposición perinatal a BPA sobre la respuesta inmune asociada a la infección por Influenza A durante la vida adulta en un modelo murino. En su reporte se indica que la exposición perinatal al CDE no afecta la respuesta inmune adaptativa específica contra el virus de la influenza a nivel pulmonar. Sin embargo, esta exposición reduce temporalmente el grado de inflamación pulmonar asociado a la infección, además de la expresión de genes antivirales ( $\text{IFN-}\gamma$  e  $i\text{NOS}$ ) en el tejido pulmonar, con lo cual concluyen que la exposición perinatal a BPA modula la respuesta innata en la etapa adulta, pero no la respuesta adaptativa, que es fundamental para la eliminación del virus de la influenza (Roy et al., 2012).

En un experimento realizado por Konishi y cols. (2003), en el que determinaron el efecto del BPA sobre la defensa no específica contra *Escherichia coli* no patogénica K12, se indica que la administración de BPA disminuyó la capacidad para eliminar a la bacteria a las 24 horas postinfección. Además, el BPA indujo la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal, pero redujo su capacidad fagocítica contra *E. coli* K12. Esto, aunado a una reducción en la población de macrófagos y linfocitos (Sugita-Konishi et al., 2003). En el análisis de la cantidad de bacterias en la cavidad peritoneal se indica que existe una mayor cantidad de unidades for-

madoras de colonias en los animales expuestos a dosis de BPA de 5mg/kg (Sugita-Konishi et al., 2003).

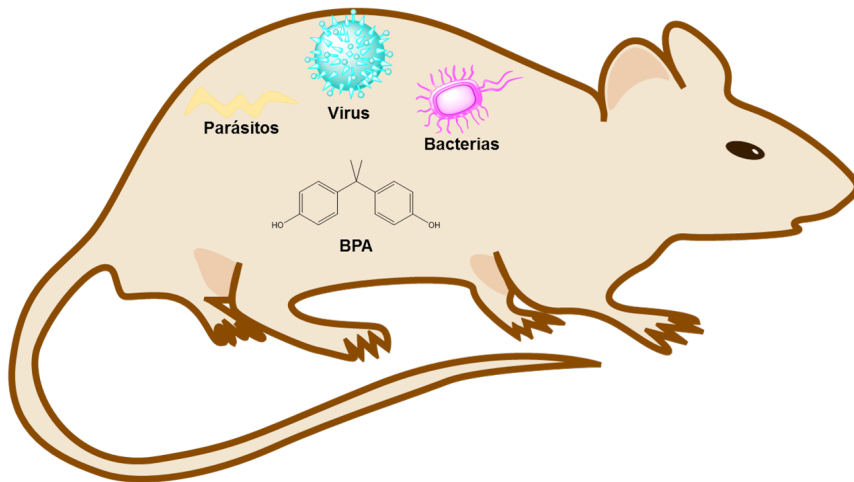
Yan y cols. (2008) evaluaron el efecto de la administración prenatal o en la etapa adulta de BPA sobre la respuesta inmune asociada a la infección con *L. major*. Ellos indican que existe un aumento en la inflamación del cojinete plantar dosis dependiente, después de la infección con *L. major*, además de una reducción en el número de células Tregs a nivel esplénico, tanto en los ratones que fueron expuestos al BPA prenatalmente o en la etapa adulta (Yan et al., 2008). Adicionalmente reportan que en los animales expuestos en la etapa adulta tienen un aumento en la producción de IL-4, IL-10 e IL-13 después de la infección y en el caso de los animales expuestos prenatalmente existe un aumento en los niveles de IL-4 e IFN- $\gamma$  (Yan et al., 2008).

Tian y cols. (2003) reportan que la administración de BPA a una sola dosis de 228 $\mu$ g/ratón, en ratones adultos, dos horas después de la infección con *T. spiralis* y los cuales fueron sacrificados a los 42 días postinfección (dpi), genera un menor número de larvas musculares, lo cual es un indicativo de que el BPA en este caso, ocasiona una disminución en la susceptibilidad a la infección por *T. spiralis* (Tian et al., 2003).

Ménard y cols. (2014), utilizando un modelo de administración perinatal (día 15 de gestación-destete) de BPA en ratas, a una dosis de 5 $\mu$ g/kg/día en el agua de bebida e infectando con el parásito *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*), reportan un incremento en la susceptibilidad a la infección en las crías hembras jóvenes (25 días de edad) que fueron expuestas al BPA de manera perinatal (Ménard et al., 2014)humoral and cellular responses after oral tolerance or immunization protocol to ovalbumin (OVA).

En cuanto a los efectos directos que ejerce el BPA sobre los parásitos, Tan y cols. (2015) reportan que al exponer al nematodo *Caenorhabditis elegans* directamente a este compuesto, se reduce su esperanza de vida y acelera el proceso de envejecimiento mediante el incremento del estrés oxidativo mitocondrial y citosólico, así como por la generación de ROS (Tan et al., 2015). En otro reporte Mersha y cols. (2015) indican que la exposición de los embriones de *C. elegans* al BPA a concentraciones de 1 a 10 $\mu$ M disminuye la ovoposición de los parásitos durante la vida adulta (Mersha et al., 2015). Por otra parte, Zhou y cols. (2015), en un estudio multigeneracional usando como modelo a *C. elegans*, reportan que los cambios en los efectos fisiológicos a lo largo de cuatro generaciones varían, dependiendo de las concentraciones de exposición. En la primera generación, los parásitos expuestos al BPA tuvieron un crecimiento menor, se movían más lentamente y produjeron

menor descendencia que los controles no expuestos (Zhou et al., 2016b). También refieren que la exposición a largo plazo genera toxicidad crónica, referida como una baja en los indicadores fisiológicos (tamaño corporal, contracciones de la cabeza, curvatura del cuerpo, vida media), aunado a una respuesta de estrés mayor y a una disminución en el tamaño de la población (Zhou et al., 2016a).



**Figura 4.** Efecto del BPA sobre la susceptibilidad a distintas infecciones.

## Conclusiones

Los compuestos disruptores endocrinos son sustancias que, por su parecido con los esteroides endógenos, pueden estar uniéndose a dichos receptores modulando distintas funciones. Aunque sus efectos más estudiados son a nivel reproductivo, también pueden estar modulando la respuesta inmunológica a distintos patógenos, debido a que estas células poseen receptores para estas hormonas y se pueden estar uniendo a ellos. Aunque los resultados obtenidos en los distintos estudios son variables, el común entre ellos es que, independientemente de la concentración o dosis, de la etapa en la que se administre, o del reto antigénico utilizado, el BPA en todos los casos modula de manera diferencial la respuesta inmunológica. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder dilucidar los posibles mecanismos por los cuales lleva esto a cabo.

## **Agradecimientos**

El presente trabajo fue apoyado con fondos del donativo IN-208105 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.



## Bibliografia

- Agency, U.S.E.P., Environmental Protection Agency, 2011. Bisphenol A Action Plan [WWW Document]. Environ. Heal. URL [http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol\\_A#Environmental\\_risk%5Cnhttp://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/action-plans/bpa\\_action\\_plan.pdf](http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol_A#Environmental_risk%5Cnhttp://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/action-plans/bpa_action_plan.pdf)
- Alizadeh, M., Ota, F., Hosoi, K., Kato, M., Sakai, T., Satter, M., 2006. Altered allergic cytokine and antibody response in mice treated with Bisphenol A. *J. Med. Invest.* 53, 70–80.
- Amaral Mendes, J.J., 2002. The endocrine disruptors: A major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* 40, 781–788. doi:10.1016/S0278-6915(02)00018-2
- Ansar Ahmed, S., Penhale, W.J., Talal, N., 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am. J. Pathol.* 121, 531–551.
- Bonefeld-Jørgensen, E.C., Long, M., Hofmeister, M. V., Vinggaard, A.M., 2007. Endocrine-disrupting potential of Bisphenol A, Bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: New data and a brief review. *Environ. Health Perspect.* 115, 69–76. doi:10.1289/ehp.9368
- Byun, J.A., Heo, Y., Kim, Y.O., Pyo, M.Y., 2005. Bisphenol A-induced downregulation of murine macrophage activities in vitro and ex vivo. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 19–24. doi:10.1016/j.etap.2004.02.006
- Camarca, A., Gianfrani, C., Ariemma, F., Cimmino, I., Bruzzese, D., Scerbo, R., Picascia, S., D’Esposito, V., Beguinot, F., Formisano, P., Valentino, R.V., 2016. Human peripheral blood mononuclear cell function and dendritic cell differentiation are affected by bisphenol-A exposure. *PLoS One* 11, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0161122
- Camposi, I., Marino, M., Montella, A., Pais, S., Franconi, F., 2017. Sex Differences in Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Levels and Activation Status in LPS-Stimulated Human Macrophages. *J. Cell. Physiol.* doi:10.1002/jcp.25425
- Goto, M., Takano-Ishikawa, Y., Ono, H., Yoshida, M., Yamaki, K., Shinmoto, H., 2007. Orally administered bisphenol A disturbed antigen specific immunoresponses in the naïve condition. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2136–43. doi:10.1271/bbb.70004

- Guo, H., Liu, T., Uemura, Y., Jiao, S., Wang, D., Lin, Z., Narita, Y., Suzuki, M., Hirose, N., Ichihara, Y., Ishihara, O., Kikuchi, H., Sakamoto, Y., Senju, S., Zhang, Q., Ling, F., 2010. Bisphenol A in combination with TNF- $\alpha$  selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity. *Cell. Mol. Immunol.* 7, 227–34. doi:10.1038/cmi.2010.14
- Guzmán-Arriaga, C., Zambrano, E., 2007. Endocrine disruptor compounds and their role in the developmental programming of the reproductive axis. *Rev. Investig. Clin.* 59, 73–81.
- He, M., Ichinose, T., Yoshida, S., Takano, H., Nishikawa, M., Shibamoto, T., Sun, G., 2016. Exposure to bisphenol A enhanced lung eosinophilia in adult male mice. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 12, 16. doi:10.1186/s13223-016-0122-4
- Holladay, S.D., Xiao, S., Diao, H., Barber, J., Nagy, T., Ye, X., Goyal, R.M., 2010. Perinatal bisphenol a exposure in C57B6/129svj male mice: Potential altered cytokine/chemokine production in adulthood. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2845–2852. doi:10.3390/ijerph7072845
- Hong, C.-C., Shimomura-Shimizu, M., Muroi, M., Tanamoto, K., 2004. Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production by mouse macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1136–1139. doi:10.1248/bpb.27.1136
- Kim, J.Y., Jeong, H.G., 2003. Down-regulation of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by bisphenol A via nuclear factor- $\kappa$ B inactivation in macrophages. *Cancer Lett.* 196, 69–76. doi:10.1016/S0304-3835(03)00219-2
- Kim, K.H., Yeon, S.M., Kim, H.G., Choi, H.S., Kang, H., Park, H.D., Park, T.W., Pack, S.P., Lee, E.H., Byun, Y., Choi, S.E., Lee, K.S., Ha, U.H., Jung, Y.W., 2014. Diverse influences of androgen-disrupting chemicals on immune responses mounted by macrophages. *Inflammation* 37, 649–656. doi:10.1007/s10753-013-9781-1
- Klein, S.L., Flanagan, K.L., 2016. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* advance on. doi:10.1038/nri.2016.90
- Kovats, S., 2015. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell. Immunol.* 294, 63–69. doi:10.1016/j.cellimm.2015.01.018
- Kuan, Y.H., Huang, F.M., Li, Y.C., Chang, Y.C., 2012. Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NF- $\kappa$ B activation via PI3K/Akt pathway. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4003–4009. doi:10.1016/j.fct.2012.08.019
- Kuan, Y.H., Li, Y.C., Huang, F.M., Chang, Y.C., 2012. The upregulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  and surface antigens expression on macrophages by bisphe-

- nol A-glycidyl-methacrylate. *Int. Endod. J.* 45, 619–626. doi:10.1111/j.1365-2591.2012.02017.x
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J. a., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and pytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252–4263. doi:10.1210/endo.139.10.6216
- Labib Salem, M., Sohrab Hossain, M., Nomoto, K., 2000. Mediation of the Immunomodulatory Effect of  $\beta$ -Estradiol on Inflammatory Responses by Inhibition of Recruitment and Activation of Inflammatory Cells and Their Gene Expression of TNF- and IFN- $\alpha$ . *Int Arch Allergy Immunol* 121121.
- Lee, J., Lim, K.-T., 2010. Plant-originated glycoprotein (36 kDa) suppresses interleukin-4 and -10 in bisphenol A-stimulated primary cultured mouse lymphocytes. *Drug Chem. Toxicol.* 33, 421–9. doi:10.3109/01480541003739229
- Lee, M.H., Chung, S.W., Kang, B.Y., Park, J., Lee, C.H., Hwang, S.Y., Kim, T.S., 2003. Enhanced interleukin-4 production in CD4+ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: Involvement of nuclear factor-AT and CA2+. *Immunology* 109, 76–86. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01631.x
- Liu, Y., Mei, C., Liu, H., Wang, H., Zeng, G., Lin, J., Xu, M., 2014. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 592–598. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.031
- Luo, S., Li, Y., Li, Y., Zhu, Q., Jiang, J., Wu, C., Shen, T., 2016. Gestational and lactational exposure to low-dose bisphenol A increases Th17 cells in mice offspring. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 47, 149–158. doi:10.1016/j.etap.2016.09.017
- Ménard, S., Guzylack-Piriou, L., Lencina, C., Leveque, M., Naturel, M., Sekkal, S., Harkat, C., Gaultier, E., Olier, M., Garcia-Villar, R., Theodorou, V., Houdeau, E., 2014. Perinatal exposure to a low dose of bisphenol a impaired systemic cellular immune response and predisposes young rats to intestinal parasitic infection. *PLoS One* 9, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0112752
- Menard, S., Guzylack-Piriou, L., Leveque, M., Braniste, V., Lencina, C., Naturel, M., Moussa, L., Sekkal, S., Harkat, C., Gaultier, E., Theodorou, V., Houdeau, E., 2014. Food intolerance at adulthood after perinatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A. *FASEB J.* 28, 4893–4900. doi:10.1096/fj.14-255380
- Mersha, M.D., Patel, B.M., Patel, D., Richardson, B.N., Dhillon, H.S., 2015. Effects of BPA and BPS exposure limited to early embryogenesis persist to impair non-associative learning in adults. *Behav. Brain Funct.* 11, 27. doi:10.1186/s12993-015-0071-y

- Miao, S., Gao, Z., Kou, Z., Xu, G., Su, C., Liu, N., 2008. Influence of bisphenol a on developing rat estrogen receptors and some cytokines in rats: a two-generational study. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 71, 1000–1008. doi:10.1080/15287390801907467
- Midoro-Horiuti, T., Tiwari, R., Watson, C.S., Goldblum, R.M., 2010. Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups. *Environ. Health Perspect.* 118, 273–277. doi:10.1289/ehp.0901259
- Ohnishi, T., Yoshida, T., Igarashi, A., Muroi, M., Tanamoto, K.I., 2008. Effects of possible endocrine disruptors on MyD88-independent TLR4 signaling. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 293–295. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00355.x
- Ohshima, Y., Yamada, A., Tokuriki, S., Yasutomi, M., Omata, N., Mayumi, M., 2007. Transmaternal exposure to bisphenol a modulates the development of oral tolerance. *Pediatr. Res.* 62, 60–64. doi:10.1203/PDR.0b013e3180674dae
- Pisapia, L., Del Pozzo, G., Barba, P., Caputo, L., Mita, L., Viggiano, E., Russo, G.L., Nicolucci, C., Rossi, S., Bencivenga, U., Mita, D.G., Diano, N., 2012. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 178, 54–63. doi:10.1016/j.ygcen.2012.04.005
- Reistad, T., Mariussen, E., Fonnum, F., 2005. The effect of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol-A, on free radical formation in human neutrophil granulocytes: The involvement of the MAP kinase pathway and protein kinase C. *Toxicol. Sci.* 83, 89–100. doi:10.1093/toxsci/kfh298
- Roy, A., Bauer, S.M., Lawrence, B.P., 2012. Developmental exposure to bisphenol a modulates innate but not adaptive immune responses to influenza a virus infection. *PLoS One* 7, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0038448
- Sawai, C., Anderson, K., Walser-Kuntz, D., 2003. Effect of bisphenol A on murine immune function: Modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB ?? NZW F1 mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 1883–1887. doi:10.1289/ehp.6359
- Segura, J.J., Jiménez-Rubio, A., Pulgar, R., Olea, N., Guerrero, J.M., Calvo, J.R., 1999. In Vitro Effect of the Resin Component Bisphenol A on Substrate Adherence Capacity of Macrophages. *J. Endod.* 25, 341–344.
- Sugita-Konishi, Y., Shimura, S., Nishikawa, T., Sunaga, F., Naito, H., Suzuki, Y., 2003. Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli*. *Toxicol. Lett.* 136, 217–227. doi:10.1016/S0378-4274(02)00388-0
- Švajger, U., Dolenc, M.S., Jeras, M., 2016. In vitro impact of bisphenols BPA, BPF, BPAF and 17 $\beta$ -estradiol (E2) on human monocyte-derived dendritic cell generation, maturation and function. *Int. Immunopharmacol.* 34, 146–154. doi:10.1016/j.intimp.2016.02.030

- Sweeney, T., 2002. Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 203–209. doi:10.1016/S0739-7240(02)00157-1
- Tan, L., Wang, S., Wang, Y., He, M., Liu, D., 2015. Bisphenol A exposure accelerated the aging process in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Lett.* 235, 75–83. doi:10.1016/j.toxlet.2015.03.010
- Teixeira, D., Marques, C., Pestana, D., Faria, A., Norberto, S., Calhau, C., Monteiro, R., 2016. Effects of xenoestrogens in human M1 and M2 macrophage migration, cytokine release, and estrogen-related signaling pathways. *Environ. Toxicol.* 31, 1496–1509. doi:10.1002/tox
- Tian, X., Takamoto, M., Sugane, K., 2003. Bisphenol A promotes IL-4 production by Th2 cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132, 240–247. doi:10.1159/000074305
- Wang, Y., Wang, L., Zhao, J., Qiao, Z., 2005. Estrogen, but not testosterone, down-regulates cytokine production in nicotine-induced murine macrophage. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27, 311–316. doi:10.1358/mf.2005.27.5.893666
- Watanabe, H., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Kasahara, T., Suzuki, K., 2003. Bisphenol A significantly enhances the neutrophilic differentiation of promyelocytic HL-60 cells. *Int. Immunopharmacol.* 3, 1601–1608. doi:10.1016/S1567-5769(03)00182-6
- Welshons, W. V., Nagel, S.C., Vom Saal, F.S., 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147, 56–69. doi:10.1210/en.2005-1159
- Yamashita, U., Sugiura, T., Yoshida, Y., Kuroda, E., 2005. Effect of endocrine disrupters on macrophage functions in vitro. *J. UOEH* 27, 1–10.
- Yan, H., Takamoto, M., Sugane, K., 2008. Exposure to bisphenol A prenatally or in adulthood promotes TH2 cytokine production associated with reduction of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Environ. Health Perspect.* 116, 514–519. doi:10.1289/ehp.10829
- Yang, M., Qiu, W., Chen, B., Chen, J., Liu, S., Wu, M., Wang, K.J., 2015. The in vitro immune modulatory effect of bisphenol a on fish macrophages via estrogen receptor ?? and Nuclear Factor-??B signaling. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1888–1895. doi:10.1021/es505163v
- Yoshino, S., Yamaki, K., Li, X., Sai, T.A.O., Takano, H., Hayashi, H., 2004. Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses , including T helper 1 and T helper 2 responses , in mice. *Immunology* 112, 495. doi:10.1046/j.1365-2567.2004.01900.x
- Yoshino, S., Yamaki, K., Yanagisawa, R., Takano, H., Hayashi, H., Mori, Y., 2003. Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of

- lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice. *Br. J. Pharmacol.* 138, 1271–6. doi:10.1038/sj.bjp.0705166
- Yoshitake, J., Kato, K., Yoshioka, D., Sueishi, Y., Sawa, T., Akaike, T., Yoshimura, T., 2008. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways. *Nitric oxide Biol. Chem.* 18, 223–8. doi:10.1016/j.niox.2008.01.003
- Youn, J.-Y., Park, H.-Y., Lee, J.-W., Jung, I.-O., Choi, K.-H., Kim, K., Cho, K.-H., 2002. Evaluation of the immune response following exposure of mice to bisphenol A: induction of Th1 cytokine and prolactin by BPA exposure in the mouse spleen cells. *Arch. Pharm. Res.* 25, 946–53. doi:10.1007/BF02977018
- Yurino, H., Ishikawa, S., Sato, T., Akadegawa, K., Ito, T., Ueha, S., Inadera, H., Matsushima, K., 2004. Endocrine disruptors (environmental estrogens) enhance autoantibody production by B1 cells. *Toxicol. Sci.* 81, 139–147. doi:10.1093/toxsci/kfh179
- Zhou, D., Yang, J., Li, H., Cui, C., Yu, Y., Liu, Y., Lin, K., 2016a. The chronic toxicity of bisphenol A to *Caenorhabditis elegans* after long-term exposure at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere* 154, 546–551. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.04.011
- Zhou, D., Yang, J., Li, H., Lu, Q., Liu, Y., Di, Lin, K.F., 2016b. Ecotoxicity of bisphenol A to *Caenorhabditis elegans* by multigenerational exposure and variations of stress response in vivo across generations. *Environ. Pollut.* 208, 767–773. doi:10.1016/j.envpol.2015.10.057
- Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607–612. doi:10.1210/en.2004-1018